

Ida Hattunen
Ida Nissinen
Julia Olin

Aerococcus urinae -bakteerin penisilliini-, kefu- roksiimi- ja keftriaksoniherkkyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

17.4.2018

Tekijät Otsikko Sivumäärä Aika	Ida Hattunen, Iida Nissinen ja Julia Olin <i>Aerococcus urinae</i> -bakteerin penisilliini-, kefuroksiimi-, ja keftriaksoniherkkyys 28 sivua 17.4.2018
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri, v.a. osastonylilääkäri Anu Pätäri-Sampo, HUSLAB Lehtori Reetta Sihvonon, Metropolia ammattikorkeakoulu
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, korreloiko <i>Aerococcus urinae</i> -bakteerin kefuroksiimin antibioottilherkkyystulokset kiekkodiffuusiomenetelmällä suhteessa penisilliiniin, sekä voidaanko kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyudet mahdollisesti vastata jo olemassa olevien EUCASTin määrittämien penisilliiniä koskevien rajojen perusteella. <i>A. urinae</i> mikrobi-lääkeherkkyyttä bentsyylipenisilliiniä eli penisilliiniä, kefuroksiimia ja keftriaksonia kohtaan tutkittiin kiekko- ja gradienttidiffuusiomenetelmän avulla yhteistyössä HUSLABin bakteriologian osaston kanssa.</p> <p>Tutkimusmateriaalina käytettiin HUSLABin bakteriologian osaston keräämiä <i>A. urinae</i> virtsa- ja veriviljelykantoja. Kannat tunnistettiin MALDI-TOFin avulla. Antibioottilherkkyys-määritykset tehtiin tunnistetuilla kannoilla rinnakkaisina käyttäen sekä kiekko- että gradienttidiffuusiomenetelmää. Herkkyystulokset luettiin kolmen lukijan toimesta. Tulokset analysoi-tiin tilastollisin menetelmin SPSS-ohjelmalla.</p> <p>Tutkimustulosten perusteella pystyttiin osoittamaan kiekkodiffuusioiden vahva positiivi-nen korrelaatio penisilliinin ja kefuroksiimin, sekä penisilliinin ja keftriaksonin välillä Pearso-nin korrelaatiokertoimen avulla. Myös gradienttidiffuusiomenetelmän tuloksissa penisilliinin ja kefuroksiimin välillä havaittiin vahva korrelaatio, joskin gradienttidiffuusiomenetelmä ei ole EUCASTin standardin mukainen herkkyysmääritysmenetelmä. Penisilliinin kiekkodiffuusio- ja gradienttidiffuusioiden vertailtaessa havaittiin vahva negatiivinen korrelaatio, eli kiek-kodiffuusioiden estorenkkaan millimetrituloksen kasvaessa MIC-arvo laskee ja millimetritu-loksen laskiessa MIC-arvo nousee. Kefuroksiimin vastaavien testien kohdalla havaittiin koh-talainen korrelaatio.</p> <p>Johtopäätöksenä voidaan todeta, että <i>Aerococcus urinae</i> penisilliinin ja kefuroksiimin anti-bioottilherkkyystulosten välillä on vahva positiivinen korrelaatio kiekkoherkkyysmenetelmää käytettäessä. Tulosten perusteella voidaan myös ehdottaa, että <i>A. urinae</i> kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyystulokset voidaan vastata penisilliinin jo olemassa olevien herkkyysra-jojen perusteella, jotka EUCAST on määrittänyt kyseiselle bakteerille.</p>	
Avainsanat	<i>Aerococcus urinae</i> , penisilliini, kefuroksiimi, keftriaksoni, antibi-oottilherkkyysmääritys

Authors Title Number of Pages Date	Ida Hattunen, Iida Nissinen and Julia Olin In Vitro Antimicrobial Susceptibility of <i>Aerococcus urinae</i> to Penicillin, Cefuroxime and Ceftriaxone 28 pages 17 April 2018
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Anu Pätäri-Sampo, Senior Physician in Clinical Microbiology, HUSLAB Reetta Sihvonen, Principal Lecturer, Metropolia UAS
<p>The aim of this study was to find out, whether <i>Aerococcus urinae</i>'s antimicrobial susceptibility results of cefuroxime using disk diffusion correlated with penicillin using the same method, and if the clinical breakpoints of <i>Aerococcus urinae</i> for penicillin established by EUCAST could be used to interpret antimicrobial susceptibility for cefuroxime and ceftriaxone. Two susceptibility testing methods were used: disk diffusion method (EUCAST) and MIC determination using Etest. All tests were conducted in cooperation with the Clinical Division of Microbiology, HUSLAB.</p> <p><i>Aerococcus urinae</i> isolates from blood and urine culture samples for this study were pre-collected and stored by HUSLAB and we reidentified them by using MALDI-TOF. Duplicate samples were used in both susceptibility testing methods and all results were interpreted by three students. We analyzed the results using a statistical program SPSS.</p> <p>The results showed a strong positive correlation (Pearson's correlation) between penicillin and cefuroxime and also with penicillin and ceftriaxone using disk diffusion method. There was also a strong positive correlation between penicillin and cefuroxime MIC values using Etest, however it is not an EUCAST approved test method. In addition, the disk diffusion results and MIC values for penicillin had a strong negative correlation and for cefuroxime a moderate negative correlation.</p> <p>We conclude that <i>Aerococcus urinae</i>'s antimicrobial susceptibility for penicillin and cefuroxime have a strong positive correlation using disk diffusion method. Based on the results we draw to the conclusion that breakpoints for penicillin established by EUCAST could be used to interpret susceptibility to cefuroxime and ceftriaxone.</p>	
Keywords	<i>Aerococcus urinae</i> , penicillin, cefuroxime, ceftriaxone, antimicrobial susceptibility

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Työn tausta, tarve ja tavoitteet	2
3	<i>Aerococcus urinae</i>	2
3.1	Bakteerin tunnistamisen haasteet	3
3.2	MALDI-TOFin käyttö <i>Aerococcus urinae</i> n tunnistuksessa	3
3.3	Aikaisemmat <i>Aerococcus urinae</i> n antibioottiherkkyydestä tehdyt tutkimukset	4
4	Antibiootit	5
4.1	Tutkimuksessa käytettävät antibiootit	6
4.2	Penisilliini	6
4.3	Kefuroksiimi	7
4.4	Keftriaksoni	7
5	Antibioottiherkkyyسمääritys	7
5.1	Kiekkodiffuusiomenetelmä	8
5.2	Gradienttidiffuusiomenetelmä	10
5.3	<i>Aerococcus urinae</i> n EUCASTin standardin mukainen herkkyسمääritys	10
6	Tutkimuksen toteutus	11
6.1	Bakteerikannat ja niiden käsittely	12
6.2	Antibioottiherkkyyسمäärityksien tekeminen	12
7	Tulokset ja niiden tarkastelu	13
7.1	Virtsan- ja verikantojen tunnistaminen	14
7.2	Antibioottiherkkyyستulosten tulkinta ja tilastollinen vertailu	15
7.3	Antibioottiherkkyyستjakaumat	16
7.3.1	Penisilliini	16
7.3.2	Kefuroksiimi	17
7.3.3	Keftriaksoni	19
7.4	Antibioottien väliset korrelaatiot	19
8	Pohdinta	20
9	Sopimukset, luvat ja eettisyys	23
10	Luotettavuus	24

1 Johdanto

Vuosittain HUSLABin bakteriologian osastolle tulee noin 30 tapausta veriviljelyistä ja noin 400 tapausta virtsaviiljelyistä, joissa viljelylöydöksenä on *Aerococcus urinae* -bakteeri. *A. urinae* on esiintyvyydeltään harvinainen ja sen on todettu aiheuttavan bakteremiaa, endokardiittia, sekä virtsatieinfektioita. Laboratoriodiagnostiikan kehittymisen myötä *A. urinae* tunnistetaan nykyisin entistä paremmin ja varmemmin massaspektrometrian avulla, mikä on mahdollistanut paremmin myös sen patogeenisyyden tutkimisen. Suomessa ensisijainen käytettävä mikrobilääke *A. urinae* aiheuttamiin infektioihin on kefalosporiinien toisen sukupolven antibiootti kefuroksiimi. Ongelmana kuitenkin on, että The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing eli EUCAST, ei ole määrittänyt antibioottilherkkyysrajoja lainkaan kefalosporiineille.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, korreloiko *Aerococcus urinae* kohdalla kefuroksiimin antibioottilherkkyystulokset kiekкодиффуusiomenetelmällä suhteessa penisilliiniin, sekä voidaanko kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyystulokset tehdä jo olemassa olevien EUCASTin määrittämien penisilliiniä koskevien rajojen perusteella. Tutkimusmateriaalina käytettiin HUSLABin bakteriologian osaston keräämiä ja pakastamia *A. urinae* -kantoja, joiden mikrobilääkeherkkyyttä bentsyylipenisilliiniä eli penisilliiniä, kefuroksiimia ja keftriaksonia kohtaan tutkittiin kiekko- ja gradienttidiffuusiomenetelmien avulla.

*A. urinae*sta tehtyjä tutkimuksia on niukasti sen vähäisen esiintyvyyden sekä haastavan tunnistamisen vuoksi. Opinnäytetyössä suoritettavan tutkimuksen tarkoituksena oli siis tuoda lisää tietoa *A. urinae* aiheuttamien infektioiden hoitoon käytännössä. Opinnäytetyön tulosten perusteella voidaan sanoa, että kefuroksiimin sekä keftriaksonin herkkyystulokset korreloivat penisilliinin tulosten kanssa. Täten voidaan ehdottaa, että kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyystulokset on mahdollista tehdä EUCASTin jo määrittämien penisilliinin *Aerococcus urinae*lle suunnattujen herkkyysrajojen perusteella.

2 Työn tausta, tarve ja tavoitteet

Opinnäytetyön taustalla oli tarve selvittää, korreloiko kefuroksiimin antibioottil herkkyystulokset suhteessa penisilliiniin *Aerococcus urinae* kohdalla, sekä voidaanko kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyystulokset mahdollisesti tehdä jo olemassa olevien EUCAS-Tin määrittämien penisilliiniä koskevien rajojen perusteella. Suomessa kefuroksiimia käytetään ensisijaisena mikrobilääkkeenä *A. urinae* aiheuttamiin infektioihin. EUCAST, jonka mukaan antibioottil herkkyysmääritykset tehdään Suomessa ja yleisesti muualla Euroopassa, ei ole määrittänyt herkkyysrajoja kefuroksiimille, vaikka Suomessa kyseiselle tiedolle olisi tarve. Antibioottipaneeliin valittiin penisilliini ja kefalosporiineista kefuroksiimi (toinen polvi), sekä keftriaksoni (kolmas polvi). Toimeksiantajana opinnäytetyölle toimi HUSLABin bakteriologian osasto ja kliinisen mikrobiologian v.a. osastonylilääkäri Anu Pätäri-Sampo. Toiminnallinen osio toteutettiin bakteriologian tiloissa.

Tutkimuskysymykset työssä olivat:

- Korreloiko kefuroksiimin antibioottil herkkyystulokset kiekkoherkkyysmenetelmällä suhteessa penisilliiniin *Aerococcus urinae* kohdalla?
- Voiko jo olemassa olevien EUCASTin määrittämien penisilliiniä koskevien rajojen perusteella vastata myös kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyudet *Aerococcus urinaelle*?

3 *Aerococcus urinae*

Aerococcus urinae -bakteeri kuuluu aerokokkien sukuun ja on niistä yleisin taudinaiheuttaja. Aerokokkien normaali elinympäristö ei ole tiedossa, mutta niitä esiintyy muun muassa virtsateiden normaalifloorassa, sekä sytostaattihoidoista saavien potilaiden suun mikrobistossa. (Rasmussen 2016: 22–23.) Kyseessä on grampositiivinen kokki, joka kasvaa pareittain ja ryhminä. *A. urinae* on katalaasi-negatiivinen ja verimaljalla alfa-hemolyytinen. (Attorri – Clarridge – Kwoh – Zhang 2000: 1703.) Bakterin on osoitettu olevan osallisena yleisimmin virtsatieinfektioissa. Sen tiedetään aiheuttaneen myös invasiivisia infektioita, kuten virtsatieperäistä bakteremiaa eli verenmyrkytystä ja endokardiitit eli sydänlappien ja sydämen sisäkalvon tulehdusta. (Humphries – Hindler 2014: 2177.) Tyy-

pillinen potilas on iäkäs mies, jolla on virtsatieongelmia, sekä oheissairauksia. Virtsaviljely voi myös *Aerococcus* -infektiossa jäädä negatiiviseksi, koska virtsaviljelyitä ei normaalisti kasvateta aerokokille otollisessa kasvatusympäristössä hiilidioksidikaapissa. (Rasmussen 2016: 22–25.)

3.1 Bakteerin tunnistamisen haasteet

Aerococcus urinae muodostaa verimaljalle viljeltynä 24 tunnin inkubaatioajalla hiilidioksidiolosuhteissa pieniä noin 0,5 mm kokoisia pesäkkeitä, jotka ovat ulkonäöltään kupe-ria, läpikuultavia ja kiiltäviä (Christensen – Ruoff 2015: 428). Pesäkemorfologialtaan se muistuttaa *viridans* -ryhmän streptokokkia ja antibioottiherkkyyksiltään on samankaltainen kuin enterokokit. *A. urinae* voi muodostaa biofilmiä pinnoille ja tarttua verihutaleisiin, jotka molemmat ovat mahdollisia virulenssimekanismeja. Aerokokit voidaan sekoittaa streptokokkeihin ja enterokokkeihin, mikä on johtanut niiden aliarviointiin infektioiden aiheuttajana. (Rasmussen 2016: 22.) *A. urinae* vaatii lähes aina ihanteellisesti kasvaakseen hiilidioksidipitoisen kasvuympäristön, minkä takia se kasvaa usein niukasti normaali-ilmasfäärissä. Se voi myös osaltaan hankaloittaa tunnistusta. (Carkaci – Nielsen – Fursted – Skov – Skovgaard – Trallero – Lienhard – Åhman – Matuschek – Kahlmeter – Christensen 2017: 161.)

3.2 MALDI-TOFin käyttö *Aerococcus urinae* tunnistuksessa

A. urinae tunnistuu nykyisin hyvin massaspektrometrisella (MALDI-TOF) menetelmällä. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) on spesifinen ja herkkä tunnistamaan *A. urinae*, kun taas jotkin biokemiallisiin ominaisuuksiin keskittyvät kaupalliset menetelmät voivat sekoittaa eri aerokokit keskenään. Sekvensoinnilla voidaan erotella suurin osa aerokokeista, mutta massaspektrometrian käyttö tunnistuksessa on kätevämpää. (Rasmussen 2016: 22.) MALDI-TOF-menetelmällä tutkitaan tuntemattoman bakteerin tiettyjä proteiineja, joiden esiintyvyydestä muodostetaan proteiiniprofiili. Tätä bakteerin proteiiniprofiilia verrataan proteiiniprofiilikirjastoon sen tunnistamiseksi. Menetelmässä pieni määrä tutkittavaa bakteeria levitetään näytelevylle tiettyyn näytepaikkaan ja sen päälle pipetoidaan 1 µl matriisi-liuosta. Näytteen kuivuttua näytelevy viedään massaspektrometriin analysoitavaksi. Jokaista näytettä säteilytetään erikseen laserpulsseilla, jolloin saadaan aikaan magneettikentässä lentäviä varautuneita proteiineja, jotka kiihdytetään TOF (Time-of-Flight) –analysaattoriin mitattavaksi. Ionien

määrä sekä niiden kulku aika rekisteröidään ja saaduista tiedoista muodostetaan massa-asteikko, jossa vaaka-akselilla on ilmoitettu ionin massa ja pystyakselilla ionien määrä. (Andrews 2014: 29; Duncan – Nedelkov – Walsh – Hattan 2015; Guo – Ye – Zhao – Ma – Yang – Luo 2014.)

3.3 Aikaisemmat *Aerococcus urinae* antibioottilherkkyydestä tehdyt tutkimukset

Harvinaisen esiintyvyyden ja mahdollisesti myös virheellisen tunnistuksen takia *A. urinae* -bakteerista ja sen herkkyysmäärittämisistä ei ole paljoa kliinisistä tutkimuksista saatua tietoa. Tutkimuksissa on käytetty myös vaihtelevasti eri herkkyysmäärittämismenetelmiä. (Humphries – Hindler 2014: 2177– 2179.) Useimmissa tutkimuksissa on käytetty tulkin-tarajoina *viridans* -ryhmän streptokokeille suunnattuja arvoja *A. urinae* antibioottilherkkyttä arvioitaessa, ja toisaalla taas stafylokokkeille tai enterokokeille suunnattuja arvoja. Puuttuvat standardit aerokokkien antibioottilherkkyyden määrittämiseen ja tulkinnan kri-teereihin ovat vaikeuttaneet kliinisten laboratorioden ja klinikoiden työtä. (Carkaci ym. 2017: 161.) Vuotta 2010 aiemmat kliiniset havainnot pohjautuvat lähinnä yksittäisiin tai muutamiin raportoituihin tapauksiin, joissa potilaalla on ollut vakava *A. urinae* aiheut-tama virtsatieinfektioista alkunsa saanut sepsis eli verenmyrkytys (Rasmussen 2016: 22).

Aikaisemmin tehdyistä tutkimuksista opinnäytetyön aihetta lähinnä on alkuvuodesta 2017 julkaistu artikkeli, jossa testattiin 120 *Aerococcus urinae* ja *A. sanguinicola*-kanta-a käyttäen kuutta eri antibioottia. Tutkimus on tehty yhteistyössä usean eri laboratorion kanssa neljän maan kesken. Kahta aerokokki -lajia testattiin kolmella eri herkkyysmeto-dilla: EUCASTin standardin mukaisella kiekkodiffuusio- ja liemilaimennusmenetelmällä, sekä gradienttidiffuusioimenetelmällä. Kyseisen tutkimuksen tuloksia käytettiin määritet-täessä EUCASTin raja-arvoja antibioottilherkkyyksiin *A. urinaelle* ja *A. sanguinicolalle*. Gradienttidiffuusio- ja liemilaimennusmenetelmällä saadut MIC-arvot korreloivat tutki-muksen mukaan hyvin kiekkodiffuusioimenetelmän tulosten kanssa. Käytetyt kuusi anti-bioottia olivat penisilliini, kefotaksiimi, meropeneemi, vankomysiini, linetsolidi ja rifampi-siini. Kaikki tutkimuksessa käytetyt aerokokki-kannat olivat herkkiä kaikille kuudelle anti-biootille. Kaikkiaan kantoja oli 120, joista *A. urinae* oli 81 kappaletta. 58 *A. urinae* -kannoista oli peräisin virtsasta, 22 verestä ja lisäksi mukana oli yksi jalan haavanäyte. Näytteet tulivat Sveitsistä, Tanskasta sekä Espanjasta ja niiden tunnistamiseen käytettiin MALDI-TOFia. Vaikka kyseisen tutkimuksen perusteella *A. urinae* todettiin herkäksi

kefotaksiimille, tutkijat eivät antaneet suositusta kefotaksiimin herkkyysrajoiksi, koska joidenkin kantojen kohdalla MIC-arvot olivat korkeita (kolme kantaa 1 mg/l, yksi kanta 2 mg/l). (Carkaci ym. 2017: 161–166.)

Humphries ja Hindler ovat tutkineet myös *A. urinaen* antibioottiherkkyttä. Tutkimuksessa käytettiin 128 *A. urinae* -kantaa, joita testattiin CLSI:n (Clinical and Laboratory Standards Institute) standardoidulla liemilaimennosmenetelmällä 14 eri antibioottia kohtaan. Saadut tulokset tulkittiin käyttäen CLSI:n *viridans* -ryhmän streptokokkien rajoja, joiden mukaan *A. urinae* -kannat olivat 99 % herkkiä kefotaksiimille ja 96 % herkkiä keftiaksonille. (Humphries – Hindler 2014: 2177–2179.)

Mainittakoon myös USA:ssa tehty tutkimus vuodelta 2011, jossa tutkittiin *Aerococcus urinaen* ja *A. sanguinicolan* kliinistä merkitystä ja antibioottiherkkyttä. Tutkimuksessa käytettiin 66 eri *A. urinae* -kantaa. Antibiootteina käytettiin muun muassa keftiaksonia ja penisilliiniä, joille kaikki kannat olivat herkkiä. Tutkijat totesivat lisätutkimuksen olevan tarpeen molempien lajien kohdalla, jotta niiden merkitsevyys virtsasta eristettynä sekä antibioottiherkkyys voidaan selvittää. (Shelton-Dodge – Vetter – Kohner – Nyre – Patel 2011: 448, 450.)

4 Antibiootit

Antibiootit ovat mikrobilääkkeitä, joita käytetään bakteeri-infektioiden hoitoon (Lumio 2017). Antibiootit jaotellaan niiden vaikutustavan ja vaikutuskohteen perusteella. Ne voidaan jakaa bakterisidisiin ja bakteriostaattisiin lääkkeisiin. Bakterisidiset lääkkeet kykenevät tappamaan niille herkät bakteerit kliinisesti oikeissa pitoisuuksissa sekä niille suotuisissa olosuhteissa. Bakteriostaattiset lääkkeet taas estävät bakteerien kasvun ja lisääntymisen, kuitenkin tappamatta kyseistä bakteeria. Bakteriostaattiset lääkkeet voivat muuttua bakteriosidisiksi lääkkeen pitoisuuden suurentuessa. Toinen tapa jaotella antibiootteja perustuu siihen, kuinka moneen rakenteeltaan ja luonteeltaan erilaiseen bakteeriin ne tehoavat: laajakirjoiset ja kapeakirjoiset antibiootit. Jos antibiootti tehoaa suureen joukkoon grampositiivisia ja gramnegatiivisia bakteereita, sitä kutsutaan laajakirjoiseksi. Kapeakirjoiset antibiootit tehoavat vain joko grampositiivisiin tai gramnegatiivisiin bakteereihin. Antibiootit voidaan luokitella vaikutusmekanisminsa perusteella neljään eri ryhmään: bakteerin soluseinämän peptidoglykaanisynteesiä estävät aineet, bakteerin proteiinisynteesin translaatiovaihetta estävät aineet, bakteerin nukleiinihappojen

synteesiin vaikuttavat aineet ja bakteerin solukalvoa vaurioittavat aineet. (Järvinen – Huovinen – Vaara 2011b; Huupponen 2014d.)

Kefalosporiinit ovat bakteerilääkkeitä, jotka kuuluvat beetalaktaamirakenteiseen bakteerilääkeryhmään. Käytössä olevat kefalosporiinit ovat *Cephalosporium* -sienen erittämän antibiootin puolisynteettisiä johdannaisia. Kefalosporiinien vaikutusmekanismi on samankaltainen kuin penisilliineillä ja ne ovat myös bakterisidisiä. Kefalosporiinit eivät hajoa penisilliiniä hajottavien entsyymien (penisillinaasit) vaikutuksesta, ja niillä on tehoa useimmiten myös gramnegatiivisia bakteereja kohtaan. (Järvinen ym. 2011a; Huupponen 2014a.)

4.1 Tutkimuksessa käytettävät antibiootit

Työssä testattavat antibiootit valikoituivat EUCASTin ennestään määrittämien *A. urinae* -bakteerin herkkyystulkintarajojen ja Suomessa käypähoitosuosituksen suosittelemien hoitolääkkeiden mukaan (Sepsis 2014; Virtsatieinfektiot 2015). Antibioottipaneeliin valittiin bentsyylipenisilliini eli G-penisilliini, kefuroksiimi (toinen polvi) ja keftriaksoni (kolmas polvi).

4.2 Penisilliini

Penisilliinit ovat vanhimpia tunnetuimpia antibiootteja, joista osa on niin sanottuja luonnollisia penisilliinejä. Luonnollisiin penisilliineihin luokitellaan bentsyylipenisilliini (G-penisilliini) ja fenoksimetyylipenisilliini (V-penisilliini), jotka on eristetty *Penicillium chrysogenum* -homeen kasvuliuksesta. Penisilliinejä on sekä luontaisia, että puolisynteettisiä ja niille on yhteistä niiden beetalaktaamirakenne. Beetalaktaamit sisältävä rakenne muistuttaa peptidoglykaanin perusyksikön pentapeptidin D-alanyyli-D-alaniini-osaa, joka on keskeinen substraatti monille entsyymeille. Tämän takia beetalaktaamit pystyvät sitoutumaan tällaisiin entsyymeihin bakteerissa samalla tavalla kuin substraatti muokaten tai inhiboiden niiden toimintaa. Kaikki beetalaktaamirakenteiset bakteerilääkkeet ovat bakterisidisiä, mutta vaikuttaen yleensä vain kasvaviin soluihin. (Järvinen – Huovinen – Vaara 2011a; Huupponen 2014b.)

G-penisilliini on kapeakirjoinen bakteerilääke, joka tehoaa useisiin grampositiivisiin bakteereihin, kuten *A. urinae* -bakteeriin (Carkaci ym. 2017: 161; Järvinen ym. 2011a). G-

penisilliini hajoaa nopeasti matalassa pH:ssa, jolloin suun kautta annettuna se hajoaa jo mahalaukussa. Tämän takia G-penisilliiniä käytetään vain parenteraalisesti eli se annostellaan suonensisäisesti. G-penisilliiniä käytetään penisilliiniherkkien bakteerien vakavissa tai vaikeasti hoidettavissa infektioidissa. (Järvinen ym. 2011a; Huupponen 2014c.)

4.3 Kefuroksiimi

Suomessa eniten käytetty toisen polven kefalosporiini on kefuroksiimi, jota käytetään suonensisäisesti. Kefuroksiimi tehoaa hyvin grampositiivisten bakteerien lisäksi useimpiin gramnegatiivisiin kokkeihin sekä gramnegatiivisiin enterobakteereihin. (Järvinen ym. 2011a; Huupponen 2014a.) Kefuroksiimia voidaan käyttää moniin erilaisiin käyttötarkoituksiin, joista tärkein on avohoidossa alkaneen kuumeisen virtsatieinfektion hoito. Kefuroksiimi on myös hyvä antibioottivalmiste silloin, kun joudutaan hoitamaan yleiskunnoltaan huonoa potilasta sairaalassa ennen kuin infektion aiheuttaja tiedetään. Kefuroksiimi erittyy virtsaan muuttumattomana munuaisten kautta, ja sen puoliintumisaika on hieman yli tunnin verran. (Järvinen ym. 2011a.)

4.4 Keftriaksoni

Kolmannen polven suonensisäisistä kefalosporiineista keftriaksoni sitoutuu huomattavissa määrin plasmaproteiineihin ja sen puoliintumisaika, noin 8 tuntia, seerumissa on hitaampaa kuin muilla kefalosporiineilla, joten sitä voidaan annostella harvemmin. Keftriaksonia erittyy myös sapsen kautta, jolloin se voi saostua sappiteihin aiheuttaen kolekystiitin oireita. (Järvinen ym. 2011a.)

5 Antibioottiherkkyysmäärittäminen

EUCAST eli European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing on komitea, joka pyrkii yhtenäistämään antibioottiherkkyysmäärittämenetelmät Euroopan alueella. EUCAST toimii EMA:n eli Euroopan lääkeviraston ja ECDC:n, eli Euroopan tautien ehkäisy- ja valvontakeskuksen raja-arvo-komiteana. EUCAST on kehittänyt standardit sekä bakteerien että sienien antibioottiherkkyysmäärittäykseen aina määrittäykseen käytettävistä materiaaleista tulosten tulkintaan asti. (EUCAST 2018.) USA:ssa vastaava toimija CLSI

on myös julkaissut elokuussa 2016 *A. urinaelle* ja *A. sanguinicolalle* lajikohtaiset herkkyystulkintarajat. EUCAST taas on vuoden 2017 aikana ottanut kyseiset bakteerit mukaan omaan ohjeistukseensa herkkyysmääritysten osalta. EUCASTin määrittämässä kliinissä herkkyystulkintataulukoissa herkkyudet *A. urinaen* kohdalla on määritetty vain muutamalle penisilliinille (bentsyylipenisilliini, ampisilliini ja amoksisilliini), karbapeneemille (meropeneemi) ja fluorokinoloneille (siprofloksasiini, levofloksasiini ja norfloksasiini) sekä glykopeptideistä vankomysiinille. Kefalosporiineille, kefuroksiimi ja keftriaksoni mukaan lukien, ei ole määritetty herkkyystulkintarajoja. Tätä ennen molemmat edellä mainituista toimijoista käyttivät *A. urinaen* ja *A. sanguinicolan* herkkyysien tulkintaan *viridans* -ryhmän streptokokeille asetettuja rajoja. *Aerococcus urinaen* antibioottiherkkyysmäärittäminen suositellaan tehtäväksi kiekkodiffuusio- ja liemilaimennosmenetelmällä, eli ns. Sensititre-menetelmällä. (Carkaci ym. 2017: 161; EUCAST 2018.)

5.1 Kiekkodiffuusio menetelmä

Antibioottiherkkyysmäärittämisestä kiekkodiffuusio menetelmä on käytetyin, sillä se on yksinkertainen menetelmä, jolla voidaan testata herkkyys suurimmalle osalle patogeenisistä bakteereista. Määrittäminen tehdään suosituksen mukaisella bakteerin vaatimalla kasvatusalustalle lisäämällä standardoidun bakteerisiirrosteen päälle tietyn antibioottipitoisuuden sisältävät antibiootitkiekot, jotka estävät bakteerin kasvua maljalla. Antibioottiherkkyystulokset tulkitaan bakteerin suositellun kasvatusajan jälkeen silmämääräisesti. (Andrews 2014: 54; Matuschek – Brown – Kahlmeter 2014; Stenholm 2012.)

EUCASTin mukaan kiekkodiffuusio menetelmässä käytettävät kasvualustat ovat Müller-Hinton (MH) sekä Müller-Hinton Fastidious (MH-F) agarmaljat. MH-malja on lisäaineeton agarmalja, jota käytetään helposti kasvaville bakteereille. MH-F-maljalle sen sijaan on lisätty lisäaineita, jotta kasvuolosuhteiltaan vaativammatkin bakteerit kasvaisivat riittävän hyvin. (Matuschek ym. 2014.) Agar on valettuna petrimaljalle tasaisesti, niin että se on joka kohdassa maljaa 4 mm paksuinen. Agarin paksuus saa vaihdella maksimissaan \pm 0,5 mm suuntaansa, sillä väärän paksuinen kasvualusta aiheuttaa virheitä herkkyystuloksissa. Liian ohut kasvualusta aiheuttaa virheellisen isoja antibiootin estorenkaita, kun taas liian paksu agarkerros aiheuttaa virheellisen pieniä estorenkaita. (Andrews 2014: 55; Matuschek ym. 2014.)

Kiekkodiffuusiomenetelmässä tutkittavasta bakteerista tehdään suspensio, jota siirretään agarmaljalle. Suspension valmistusta varten tutkittavaa bakteeria viljellään lisääneettomalle agarmaljalle, jota kasvatetaan yön yli (16–24 tuntia). Tämän jälkeen bakteerikasvustosta kerätään steriilillä silmukalla tai pumpulitikulla useita morfologialtaan samankaltaisia bakteeripesäkkeitä, jotka sekoitetaan steriiliin keittosuolaliuokseen. Bakteerisuspension vahvuus tulee olla McFarland-standardin asteikolla 0,5, mikä vastaa $1-2 \times 10^8$ pesäkettä/ml *Escherichia coli* -bakteeria. Suspension vahvuus tarkistetaan densitometrillä tai vertaamalla silmämääräisesti suspension sameutta valmiiseen 0,5 McFarlandin standardiliuokseen. Suspensio suositellaan käyttämään 15 minuutin kuluttua sen valmistamisesta, mutta viimeistään tunnin kuluttua. Bakteerisuspension siirrostaminen agarmaljalle tehdään steriilillä pumpulipuikolla. Pumpulipuikko kastellaan suspensiossa, jonka jälkeen siitä poistetaan ylimääräinen neste painamalla puikkoa suspensioputken seinämää vasten. Tällä vältetään liian paksun siirrosteen muodostuminen. Suspensiota levitetään pumpulipuikolla tasaisesti joka puolelle maljaa, joko pyyhkimällä puikolla kolmeen suuntaan maljan pinnalla tai käyttämällä maljaa pyörittävää dreijaa. (Matuschek ym. 2014.)

Kiekkoherkkyyismäärityksessä käytettävät antibioottikiekot ovat paperisia, tietyn antibioottipitoisuuden sisältäviä kiekkoja. Ennen käyttöä kiekkoja tulee säilyttää valmistajan ohjeen mukaan, jotta antibiootin teho ei heikkene. Altistus valolle, lämmölle sekä kosteudelle voi heikentää antibiootin toimivuutta. Ennen käyttöä antibioottikiekkojen tulee antaa lämmitä huoneenlämpöiseksi. Antibioottikiekot tulee asettaa maljalle 15 minuutin kuluessa bakteerisuspension siirrostamisesta. Kiekot asetetaan tiiviisti maljan pinnalle steriileillä pinseteillä tai antibioottikiekkojen annostelulaitteella. Jotta antibioottien estorenkaut eivät kasvaisi toistensa päälle ja tulokset saadaan luotettavasti mitattua, on määritelty, että 90 mm halkaisijaltaan olevalle maljalle mahtuu korkeintaan kuusi antibioottikiekkoa. (Andrews 2014: 55; Matuschek ym. 2014.)

15 minuutin kuluessa antibioottikiekkojen lisäämisen jälkeen herkkyysmääritysmalja laitetaan kasvamaan eli inkuboitumaan ylösalaisin 35 ± 1 °C lämpötilaan 16–20 tunnin ajaksi. Inkubaation aikana bakteerit kasvavat agarmaljalla, mutta antibioottikiekkojen ympärille muodostuu bakteerin kasvua estävät alueet. Lisäaineeton Müller-Hinton-malja kasvatetaan hapellisissa olosuhteissa, kun taas lisäaineellinen Müller-Hinton Fastidious-malja kasvatetaan 5 ± 1 % hiilidioksidiolosuhteissa. Inkubaation jälkeen maljalta tarkistetaan bakteerikasvuston tasaisuus. Mikäli maljalta on erotettavissa yksittäisiä bakteeripesäkkeitä, siirros on liian ohut ja tutkimus tulee tehdä uudelleen. (Matuschek ym. 2014.)

Antibiootin estorenkfaat luetaan maljalta paljaalla silmällä pitämällä maljaa 30 cm:n etäisyydellä. Estorenkkaan halkaisija mitataan bakteerikasvun rajalta viivoittimella, harpilla tai automaattisella mittarilla millimetrin tarkkuudella. Mikäli estorenkaita on kaksi sisäkkäin, tulos tulkitaan sisemmän estorenkkaan halkaisijan mukaan. Müller-Hinton-maljojen tulokset luetaan valoa apuna käyttäen maljan takapuolelta tummaa taustaa vasten, kun taas Müller-Hinton Fastidious-maljat tulkitaan valon avulla maljan etupuolelta kansi poistettuna. Saadut millimetrimäärät tulkitaan EUCASTin antibiootiherkkyysrajojen mukaan niin, että bakteeri on antibiootille herkkä (S), herkkyys on alentunut (I) tai bakteeri on kokonaan resistentti (R) kyseiselle antibiootille. Alentunut herkkyys tarkoittaa, että bakteeri on osittain herkkä antibiootille, mutta normaali annos antibioottia ei välttämättä riitä saavuttamaan tarvittavaa lääkinnällistä annosta, vaan infektio todennäköisesti hoituu käyttäen maksimiannostusta. (Matuschek ym. 2014; Stenholm 2012.)

5.2 Gradienttidiffuusiomenetelmä

Gradienttidiffuusiomenetelmällä saadaan selville estorenkkaan halkaisijan sijaan numeraalinen MIC-arvo, eli pienin bakteerin kasvua estävä antibiootipitoisuus (minimum inhibitory concentration). Gradienttidiffuusiomenetelmässä käytetään testiliuskaa, johon on imeytetty tietty antibiootipitoisuusgradientti. Antibiootin pitoisuus eri kohdissa liuskaa nähdään testiliuskaan tehdystä mitta-asteikosta. Kuten kiekkodiffuusiomenetelmässä, myös gradienttidiffuusiomenetelmää varten valmistetaan bakteerisuspensio puhdasviljelmästä. Suspensio levitetään tasaisesti herkkyysmaljalle, jonka jälkeen testiliuska asetetaan agarin pinnalle. Testiliuskan antibioottigradientti imeytyy kasvatusalustaan ja yön yli inkubaation aikana antibiootti estää bakteerin kasvua, mikä ilmenee ellipsin muotoisena estoalueena testiliuskan ympärillä. MIC-arvo luetaan testiliuskan mitta-asteikosta siltä kohdalta, jossa bakteerin kasvun raja kulkee. (Andrews 2014: 60; Stenholm 2012.)

5.3 *Aerococcus urinae*n EUCASTin standardin mukainen herkkyysmäärittäminen

EUCASTin mukaan herkkyysmäärittäykset tehdään *A. urinae*lle kiekkodiffuusiomenetelmällä Müller-Hinton Fastidious-agarmaljalle 0,5 McFarlandin bakteerisuspensiosta. Maljoja inkuboidaan 5 % CO₂ olosuhteissa, 35 ±1 °C lämpötilassa 18±2 tuntia. Mikäli pesäkkeet eivät ole 16–20 tunnin inkubaation jälkeen kasvaneet tarpeeksi, ne laitetaan välittömästi uudelleen inkuboitumaan, ja estorenkfaat luetaan 40–44 tunnin kokonaisinkubaatioajan jälkeen. Antibiootin estoraja luetaan maljan etupuolelta, maljan kansi poistettuna

ja apuna luennassa käytetään valoa. Estorajan reuna on se, missä bakteerikasvua ei enää ole näkyvässä. Vaihtoehtoisesti määrittäminen voidaan myös tehdä käyttäen liemilaimennos- tai gradienttidiffuusiomenetelmää. (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018.)

EUCASTin mukaan *A. urinae* ja *A. sanguinicola* ovat herkkiä bentsyylipenisilliinille, kun MIC-arvo on $\leq 0,125$ mg/l tai antibiootin estoreenkaan halkaisija on ≥ 21 mm. Resistenttejä bakteerit ovat silloin kun MIC-arvo on $> 0,125$ mg/l tai antibiootin estoreenkaan halkaisija on < 21 mm. (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018.)

6 Tutkimuksen toteutus

Opinnäytetyöprosessi ja tutkimuksen toteuttaminen aloitettiin 18.4.2017 opinnäytetyön aloitusinfolla. Tutkimuksen aihe täsmentyi 3.10.2017, jolloin pidettiin suunnittelupalaveri ohjaavan opettajan lehtori Reetta Sihvosen ja kliinisen mikrobiologian v.a. osastonlääkärin Anu Pätäri-Sammon kanssa. Opinnäytetyö toteutettiin HUSLABin bakteriologian laboratorion tiloissa kolmen viikon aikana 22.1 – 9.2.2018. Osaston erikoislääkäri, nimetty työelämän ohjaaja ja Metropolian opettaja toimivat tutkimuksen ohjaajina. Tarvitavat välineet, laitteet ja työtilat bakteerikantojen käsittelyyn, antibioottiliherkkymäärityksien tekoon, sekä analysointiin saatiin HUSLABin bakteriologian osastolta.

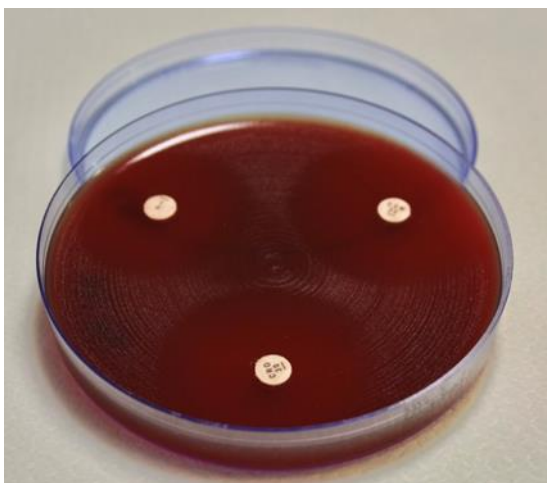
Opinnäytetyön työnjako oli seuraava: Julia Olin toimi opinnäytetyön projektipäällikkönä, jolloin Julian tehtävänä oli varmistaa, että opinnäytetyö eteni aikataulussa suunnittelusta aina sen julkaisemiseen asti. Julia vastasi myös raportin jäsentelystä ja otsikoinneista. Julian tehtäviin kuului myös Excel-tilukoiden luominen antibioottiliherkkyyksille tutkimuksen toiminnallista osiota varten. Ulkoisen viestinnän vastuuhenkilönä toimi Ida Hattunen, joka oli pääasiassa sähköpostitse yhteydessä opettajiin, sekä HUSLABin yhteys henkilöihin. Ida myös koordinoi ryhmäkohtaiset tapaamiset. Iida Nissinen vastasi raportin ulko- ja kirjoitusasusta, sekä otti päävastuun toteutusvaiheen aikatauluttamisesta. Tulosten syöttäminen taulukoihin, tulosten analysointi ja tekstin tuottaminen opinnäytetyön raporttiin oli kaikkien ryhmän jäsenten yhteinen tehtävä.

6.1 Bakteerikannat ja niiden käsittely

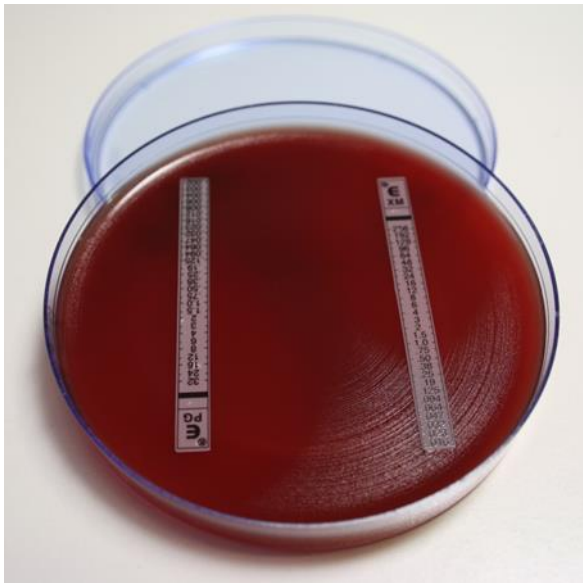
Tutkimuksessa käytettiin HUSLABin bakteriologian osaston etukäteen keräämiä ja pakaseen taltioituja virtsa- ja veriviljelynäytteistä eristettyjä *A. urinae* -kantoja. Kantoja oli yhteensä 112, joista virtsakantoja oli 61 ja veriviljelykantoja 51. Näytteet etsittiin taltiointinumeroiden avulla -70°C-asteisesta pakkasesta, viljeltiin verimaljoille ja inkuboitiin 5 % CO₂ -olosuhteessa, + 35°C lämpötilassa 18 tuntia. Inkuboinnin jälkeen bakteerien tunnistus tapahtui bioMérieuxin Vitek MS-laiteella, eli MALDI-TOFilla, käyttäen kontrollikantana *Escherichia coli* ATCC 8739 -kantaa.

6.2 Antibioottiherkkyysmäärityksiä tekeminen

Antibioottiherkkyysien määrittämiseen käytettiin sekä EUCASTin standardin mukaista kiekko-diffuusiomenetelmää (kuvio 1), että gradienttidiffuusiomenetelmää (kuvio 2). Herkkyysmääritykset tehtiin molemmilla menetelmillä rinnakkaisnäytteinä, jolla pyrittiin lisäämään tulosten luotettavuutta. EUCASTin standardin mukainen MIC-arvojen määrittäminen liemilaimennosmenetelmällä, mutta HUSLABin bakteriologian osastolla tätä menetelmää ei ole vielä sovellettu grampositiivisiin kokkeihin, joten kiekkoherkkyysmenetelmän rinnalle valittiin gradienttidiffuusiomenetelmä. Työssä käytettävät antibiootit olivat penisilliini, kefuroksiimi sekä keftriaksoni. Kiekkoherkkyysmäärittämisessä käytettiin kaikkia kolmea antibioottikiekkoa, mutta gradienttidiffuusiomenetelmässä keftriaksoniliuska jouduttiin jättämään pois toimitusongelmien vuoksi.



Kuvio 1. *Aerococcus urinae* antibioottiherkkyys kiekkoherkkyysmenetelmällä Müller-Hinton Fastidious-maljalla (kuva Julia Olin).



Kuvio 2. *Aerococcus urinae* antibioottiherkkyys gradienttidiiffuusiomenetelmällä Müller-Hinton Fastidious-maljalla (kuva Julia Olin).

Antibioottikiekot sekä -liuskat kontrolloitiin EUCASTin ohjeiden mukaan *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 -kannalla. MALDI-TOF-tunnistamisen jälkeen testattiin kymmenen kannan testierä koeasetelman havainnollistamiseksi, jonka jälkeen tutkittiin loput kannat. Määritykset tehtiin EUCASTin ohjeita noudattaen. Testierän herkkyystulokset luettiin 18 tuntia kasvaneilta maljoilta, jotka kokeellisesti kasvatettiin vielä toiset 18 tuntia. Herkkyysmaljat luettiin kolmen eri lukijan toimesta EUCASTin standardin ohjeistamalla tavalla.

7 Tulokset ja niiden tarkastelu

Tutkimuksen alussa bakteerikantoja oli yhteensä 112, joista virtsaviljelynäytteitä oli 61 ja veriviljelynäytteitä 51. Lopullinen näytemäärä tutkimuksen herkkyysmäärityksissä oli 86 bakteerikantaa. Kantoja karsiutui muun muassa sen vuoksi, että osa kannoista ei herännyt pakkasesta sekä osa oli liian niukkakasvuista herkkyysmääritystä varten. Tilastollisiin analyysihin valittiin kolmen lukijan sijasta vain kahden lukijan tulokset, sillä kolmannen lukijan tulokset poikkesivat käytännön kannalta liikaa muista tuloksista. Tutkimuksen otannasta (86 kantaa) miehiä oli 62,8 % ja naisia 37,2 %. Kantojen ikäjakauman keskiarvo molempien sukupuolien kohdalla oli 79 vuotta vaihteluvälin ollessa 67–91 ikävuo- sien väliltä. Sukupuoli- ja ikäjakauma vastasi aikaisempien tutkimusten havaintoja.

7.1 Virtsa- ja verikantojen tunnistaminen

Viisi virtsakantaa vaati ensimmäisen inkuboinnin jälkeen vielä +20 tuntia kasvaakseen ja/tai uuden puhtasviljelyn teon ja yksi kanta ei kasvanut ollenkaan ensimmäisen inkuboinnin jälkeen. Tämä kanta jouduttiin hylkäämään, sillä lisäinkubaatio tai toinen herätyskerta ei tuottanut tulosta. Ensimmäisessä MALDI-TOF-ajossa 48% kannoista antoi tuloksen *A. urinae* 99,9%. Loppuja kantoja MALDI-TOF ei kyennyt tunnistamaan tai näytteen laatu oli huono. Toisessa ajossa 31:stä kannasta 16 oli *Aerococcus urinaeta*, yksi kanta *A. urinae* 33,3 %, *Lactobacillus acidophilus* 33,3 % sekä *Lactobacillus gasseri* 33,3 % ja yhdessä 99,9% *Brevibacillus*-lajia. Kolmas MALDI-TOF-ajo tunnisti kaikki loput 15:sta *A. urinae* -kannasta, sillä MALDI-TOF:ssa matriisiin lisäksi käytettiin tällöin myös muurahaishappoa. Muurahaishappoa on tapana käyttää muun muassa hankalasti MALDI-TOF:lla tunnistettavien tai esimerkiksi limaaisten bakteerien kohdalla. Tämä selvästi paransi *A. urinae* kohdalla tunnistamista.

Verikannoista kaksi pakkasesta herätettyä kantaa ei kasvanut toisenkaan yrittämisen jälkeen ja kaksi kantaa oli liian niukkakasvuisia edes tunnistettavaksi, joka johti hylkäämiseen. Kahta kantaa ei taltiointinumerosta huolimatta löytynyt pakkasesta ja yhdeltä kannalta puuttui kokonaan taltiointinumbero. Verikantojen kohdalla päädyttiin lisäämään heti muurahaishappoa MALDI-TOF-tunnistuksen helpottamiseksi. Ensimmäisessä MALDI-TOF-ajossa 87% kannoista oli *A. urinaeta*, joten muurahaishapon lisääminen paransi tunnistustuloksen onnistumista. Yksi kannoista oli 99,9 % *Brevibacillus*-lajia ja yksi *Aerococcus viridans* 99,9 %. Nämä kannat hylättiin tutkimuksesta. Kuusi kantaa, jotka eivät menneet ensimmäisellä MALDI-TOF-ajolla läpi, antoivat virheilmoitukseksi huonon spektrin tai ei tunnistusta. Toisessa MALDI-TOF-ajossa yksi kannoista osoittautui *Brevibacillus*-lajiksi 99,9 % ja kaksi oli *A. urinae* 99,9 %.

Muutama kanta ajettiin vielä useamman kerran MALDI-TOF:lla, mutta tulosta ei saatu. Yksi kannoista oli ensimmäisessä MALDI-ajossa 50,0 % *A. urinae* ja *Actinotignum schaalii* 50,0%, mutta kuudennella kerralla kanta osoittautui *Actinotignum schaalii* 99,9 % varmuudella, joten kanta hylättiin. Loppuja kantoja ei onnistuttu tunnistamaan. Lisäksi yksi kanta hylättiin, sillä sen todettiin autolysoituvan nopeasti, eikä herkkyysmääritys olisi tullut onnistumaan. 86,7 % (39/45) kannoista pystyttiin tunnistamaan yhdellä MALDI-ajolla muurahaishappoa käytettäessä. MALDI-TOF-tunnistuksen jälkeen käytettäviä verikantoja jäi yhteensä 40 kappaletta.

7.2 Antibioottiherkkyystulosten tulkinta ja tilastollinen vertailu

Antibioottiherkkyysmaljat luettiin kolmen lukijan toimesta noudattaen EUCASTin suosituksia, mutta tilastollisissa analyyseissä käytettiin vain kahden lukijan tuloksia, koska kolmannen lukijan tulokset poikkesivat käytännön kannalta liikaa muista tuloksista. Antibioottiherkkyys saatiin määritettyä 59:lle virtsaviljely- ja 39:lle veriviljelykannalle. Kokonaisnäytämäärä oli siis yhteensä 98 kantaa. Virtsakannoista kolmea kantaa lisäkasvatettiin 40–44 tuntiin asti, jotta herkkyystulokset voitiin tulkita. Verikannoista lisäkasvatusta vaati yksi kanta. Herkkyysmääritystä ei saatu tehtyä MH-F-maljalta yhdestä virtsakanasta sekä yhdestä verikannasta. Kyseiset kannat kasvoivat vain suklaamaljalla, joten ne hylättiin tutkimuksesta.

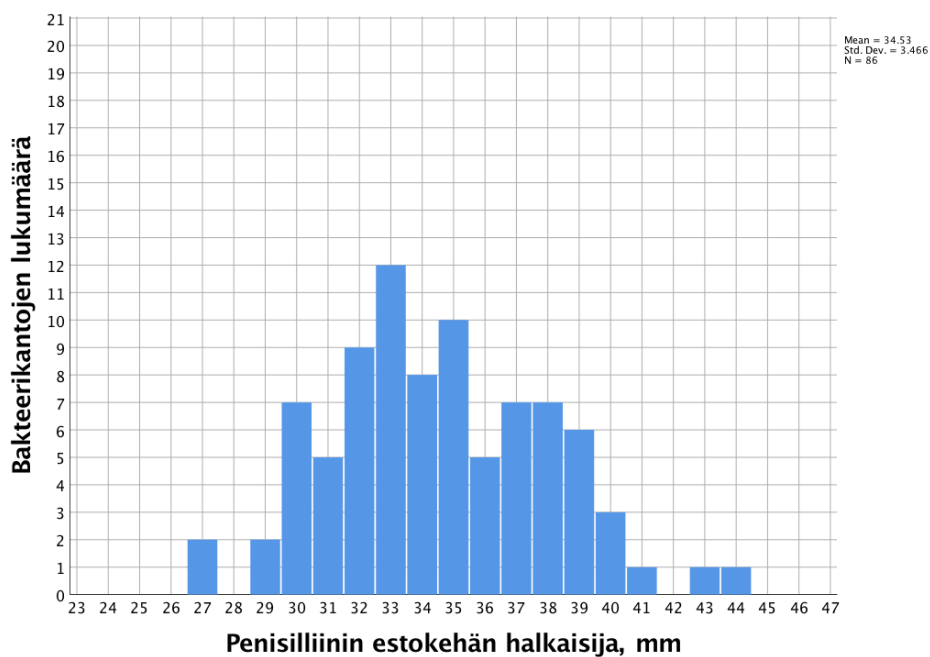
Tulokset analysoitiin käyttäen SPSS-ohjelmaa (IBM SPSS Statistics. Version 25). Lukijoiden omien kiekkoherkkyysien rinnakkaisista tuloksista laskettiin bakteerikohtaiset keskiarvot, joiden avulla pystyttiin vertailemaan keskenään eri lukijoiden tuloksien välisiä eroja parillisten otosten t-testin avulla. Penisilliinin ja kefuroksiimin kohdalla p-arvo oli $>0,05$, jolloin tuloksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa: penisilliini $t(97) = 0.354$ ja kefuroksiimi: $t(85) = 0.682$. Keftriaksonin kohdalla p-arvo oli $0,002$, jolloin erot olivat tilastollisesti merkittäviä: $t(85) = -3,145$. Ero lukijoiden tulosten keskiarvojen välillä oli kuitenkin vain $0,51$ mm, joka on käytännön kannalta riittävän pieni. Lukijoiden keskinäisistä keskiarvoista laskettiin vielä keskiarvo eri antibioottien kohdalle, joka pyöristettiin alempaan kokonaislukuun. Keskiarvo pyöristettiin alaspäin, sillä kiekkoherkkyttä tulkittaessa antibiootin estohalkaisija ilmoitetaan pienemmän millimetрилukeman mukaan, mikäli halkaisija ei osu kokonaisluvun kohdalle. Gradienttidiffuusiomenetelmän MIC-arvoista käsiteltäväksi valittiin suurin arvo jokaisen bakteerikannan kohdalla. Antibioottien välistä korrelaatiota testattiin Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla. Samaa menetelmää käytettiin myös penisilliinin kiekkodiffuusioherkkyysien ja gradienttidiffuusiomenetelmän MIC-arvojen vertailuun. Saatuja penisilliinituloksia verrattiin EUCASTin julkaisemiin *A. urinae* -bakteerin antibioottiherkkyysrajoihin penisilliinin osalta, sekä EUCASTin julkaisemiin penisilliinin antibioottiestojen histogrammijakaumiin. Lopullinen näytämäärä tutkimuksessa oli 86 bakteerikantaa. 12 kantaa jätettiin pois saaduista herkkyystuloksista, sillä lukijoiden välinen millimetriero saman kannan tuloksissa oli käytännön kannalta liian suuri. Bakteerin niukkasvuisuudesta johtuvan vaikealukuisuuden vuoksi korkeintaan kolmen millimetrin erot lukutuloksissa sallittiin ja sitä suuremmilla eroilla olevat tulokset jätettiin analysoimatta.

7.3 Antibioottilherkkyyssjakaumat

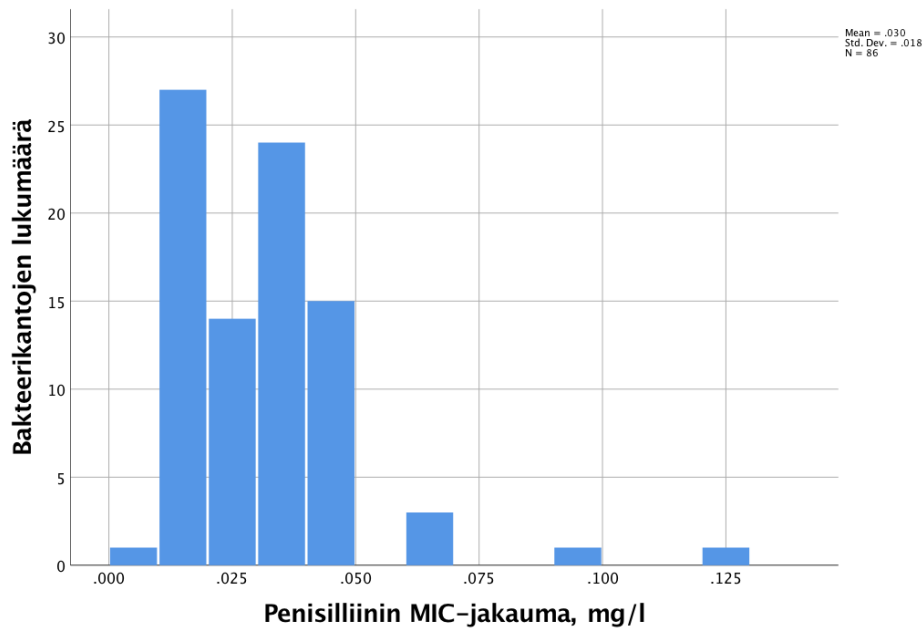
Antibioottilherkkyytuloksista tehtiin tilasto-ohjelman avulla histogrammit, jotka kuvaavat tutkittavien *Aerococcus urinae* -bakteerikantojen herkkyytulosten jakaumaa millimetrituloksen tai MIC-arvon perusteella.

7.3.1 Penisilliini

EUCASTin mukaan *A. urinae* on herkkä bentsyylipenisilliinille, kun MIC-arvo on $\leq 0,125$ mg/l tai antibiootin estokehän halkaisija on ≥ 21 mm (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018). Penisilliinin kohdalla antibiootin estokehän halkaisijat olivat väliltä 27–44 mm (kuvio 3) ja MIC-arvot olivat väliltä 0,006–0,125 mg/l (kuvio 4). Tulokset osoittivat, että kaikki tutkimuksessa käytetyt kannat olivat herkkiä penisilliinille.



Kuvio 3. Penisilliinin kiekkoherkkyyssmääritystulosten jakauma.



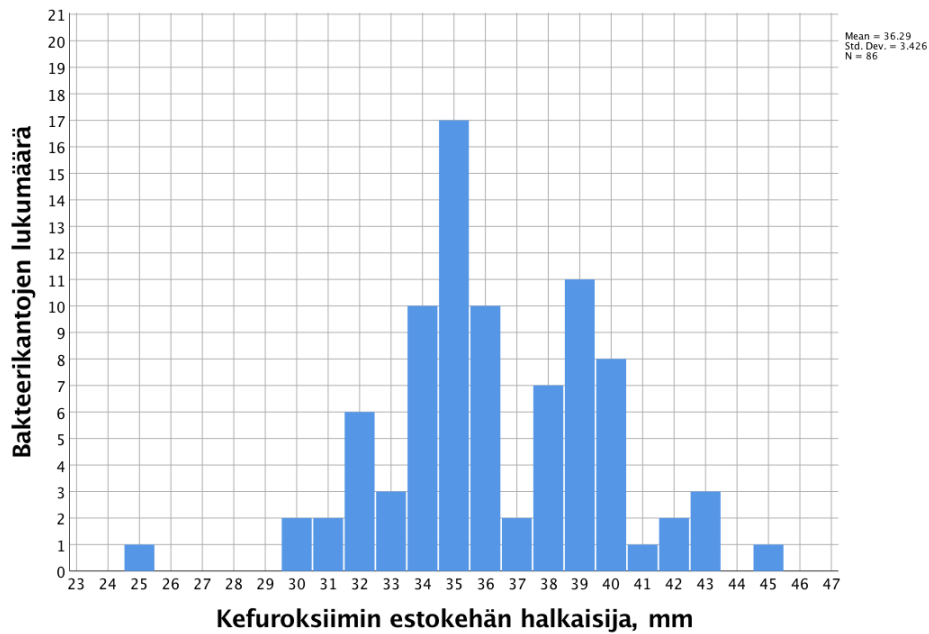
Kuvio 4. Penisilliinin MIC-arvojen jakauma.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on käytetty tulkintarajoina *viridans* -ryhmän streptokokeille suunnattuja arvoja *A. urinae*n antibioottiherkkyyttä arvioitaessa (Carkaci ym. 2017: 161). EUCASTin *viridans* -ryhmän streptokokkien bentsyylipenisilliinin MIC-arvo rajat ovat S \leq 0,25 mg/l, I 0,30–2 mg/l ja R > 2 mg/l. Bentsyylipenisilliinin estokehän halkaisijan rajat EUCASTilla *viridans* -ryhmän streptokokeille ovat S \geq 18 mm, I 12–17 mm ja R < 12 mm. Tulokset osoittivat, että kaikki tutkimuksessa testatut kannat olivat herkkiä penisilliinille myös EUCASTin *viridans* -ryhmän streptokokkien tulkintarajojen mukaan. (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018.)

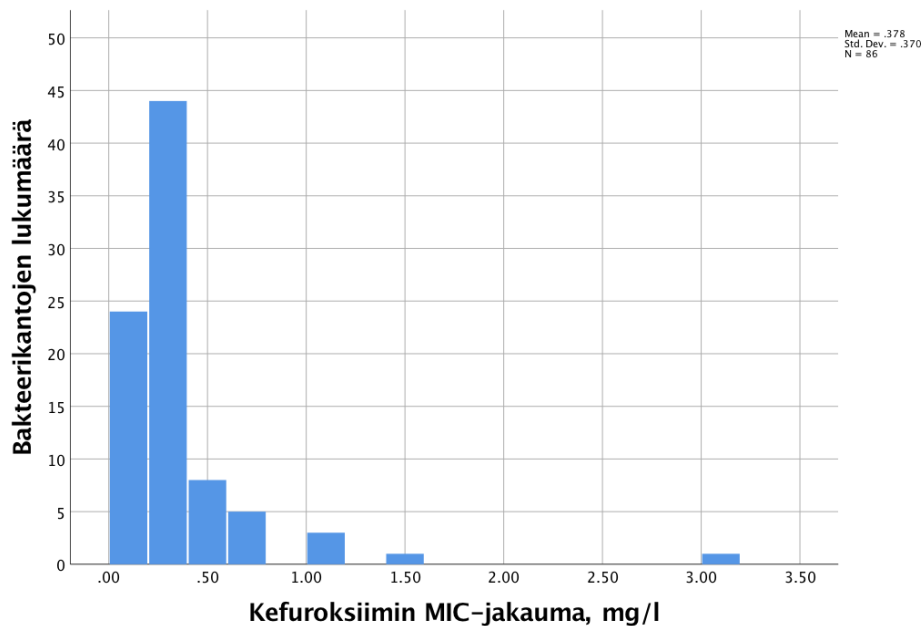
EUCAST on määrittänyt antibiootikohtaiset MIC-tulkintarajat myös niille bakteereille (PK-PD breakpoints), joilla ei ole olemassa omia herkkyystulkintarajoja. EUCASTin bentsyylipenisilliinin rajat ovat S \leq 0,25 mg/l, I 0,30–2 mg/l ja R > 2 mg/l. Tutkimuksen tulokset osoittivat, että kaikki käytetyt kannat olivat herkkiä bentsyylipenisilliinille myös PK-PD-tulkintarajojen mukaan. (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018.)

7.3.2 Kefuroksiimi

Kefuroksiimin kohdalla estokehän halkaisijat olivat väliltä 25–45 mm (kuvio 5). MIC-arvoista pienin oli 0,032 mg/l ja suurin 3 mg/l (kuvio 6).



Kuvio 5. Kefuroksimiin kiekkoherkkyysmäärittystulosten jakauma.

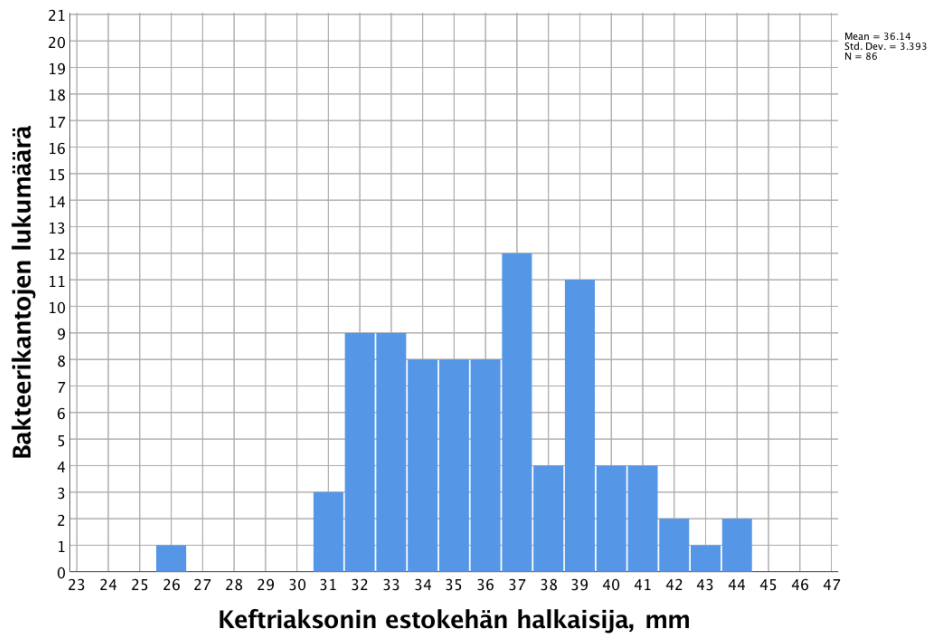


Kuvio 6. Kefuroksimiin MIC-arvojen jakauma.

Tutkimuksessa saatuja MIC-arvoja verrattiin myös EUCASTin julkaisemiin PK-PD MIC-tulkintarajoihin kefuroksimiin kohdalla. Kefuroksimiin MIC-tulkintarajat ovat S \leq 4 mg/l, I 5–8 mg/l ja R $>$ 8 mg/l. Tulokset osoittivat, että kaikki tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat olivat herkkiä kefuroksimiinille PK-PD:n tulkintarajojen mukaan. (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018.)

7.3.3 Keftriaksoni

Keftriaksonin kohdalla saatiin vain kiekkoherkkyystulokset, sillä MIC-liuskojen toimituksessa oli häiriö. Estokehän halkaisijat olivat väliltä 26–44 mm (kuvio 7).



Kuvio 7. Keftriaksonin kiekkoherkkyysmäärittäytystulosten jakauma.

7.4 Antibioottien väliset korrelaatiot

Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla testattiin penisilliinin ja kefuroksiimin, penisilliinin ja keftriaksonin sekä kefuroksiimin ja keftriaksonin kiekkoherkkyystulosten välistä korrelaatiota. Lisäksi testattiin penisilliinin ja kefuroksiimin MIC-arvojen välistä korrelaatiota. Taulukossa 1 on esitetty antibioottien väliset korrelaatiokertoimet ja p-arvot. Tulokset osoittavat, että kaikkien tutkittavien kiekkoherkkyystulosten välillä on vahva positiivinen riippuvuus. Myös penisilliinin ja kefuroksiimin MIC-arvojen välillä on vahva positiivinen korrelaatio.

Taulukko 1. Antibioottien väliset korrelaatiokertoimet ja p-arvot.

Antibiootit	Pearsonin korrelaatiokerroin	P-arvo
Penisilliini ja kefuroksiimi (mm)	0,885	<0,001
Penisilliini ja kefuroksiimi (MIC)	0,726	<0,001
Penisilliini ja keftriaksoni (mm)	0,884	<0,001
Kefuroksiimi ja keftriaksoni (mm)	0,956	<0,001

Eri antibioottien välisen korrelaatioiden lisäksi testattiin penisilliinin kiekkoherkkyystulosten ja MIC-arvojen välistä korrelaatiota sekä kefuroksiimin kiekkoherkkyystulosten ja MIC-arvojen välistä korrelaatiota. Penisilliinin kiekkoherkkyuden ja MIC-arvojen välillä on vahva negatiivinen korrelaatio, sillä korrelaatiokerroin (r) on $-0,713$ ja p -arvo $<0,001$. Kefuroksiimin kiekkoherkkyuden ja MIC-arvojen välillä on kohtalainen negatiivinen korrelaatio, sillä korrelaatiokerroin on $-0,616$ ja p -arvo on $<0,001$.

8 Pohdinta

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää korreloiko kefuroksiimin antibioottiherkkyystulokset kiekkoherkkyysmenetelmällä suhteessa penisilliiniin, sekä voiko jo olemassa olevien EUCASTin määrittämien penisilliiniä koskevien rajojen perusteella vastata myös kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyystuloksinat *Aerococcus urinae*n kohdalla. Tutkimustuloksien perusteella pystyttiin osoittamaan kiekkoherkkyystulosten vahva positiivinen korrelaatio penisilliinin ja kefuroksiimin, sekä penisilliinin ja keftriaksonin välille Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla. Myös MIC-arvoissa penisilliinin ja kefuroksiimin välillä havaittiin vahva korrelaatio, joskin tutkimuksessa käytetty gradienttidiffuusio-menetelmä ei ole EUCASTin standardin mukainen herkkyysmäärittäminen. Penisilliinin kiekkoherkkyys- ja MIC-arvoja vertailtaessa havaittiin vahva negatiivinen korre-

laatio, eli kiekkoherkkyystuloksen kasvaessa MIC-arvo laskee ja millimetrituloksen las-
kiessa MIC-arvo nousee. Kefuroksiimin kiekkoherkkyystulosten ja MIC-arvojen kohdalla
havaittiin kohtalainen negatiivinen korrelaatio. Johtopäätöksenä voidaan todeta, että *Ae-
rococcus urinae* -bakteerin penisilliinin ja kefuroksiimin antibioottiherkkyystulosten välillä
on vahva positiivinen korrelaatio kiekkodiffuusiomenetelmää käytettäessä. Tulosten pe-
rusteella voidaan myös ehdottaa, että *A. urinae* kefuroksiimin ja keftriaksonin herkkyys-
tulokset voidaan vastata penisilliinin jo olemassa olevien herkkyysrajojen perusteella,
jotka EUCAST on määrittänyt kyseiselle bakteerille.

Aerococcus urinae -bakteerista ja sen herkkyysmäärityksistä on vähän kliinisistä tutki-
muksista saatua tietoa harvinaisen esiintyvyyden ja mahdollisesti myös virheellisen tun-
nistuksen takia (Humphries – Hindler 2014: 2177–2179). Se on osaltaan vaikeuttanut
kliinisten laboratoriodien ja klinikoiden työtä (Carkaci ym. 2017: 161). Opinnäytetyön ta-
voitteena oli tuottaa lisää arvokasta tietoa *A. urinae* antibioottiherkkyysistä, sekä tuoda
lisätietoa bakteerin aiheuttamien infektioiden hoitoon käytännössä. Massaspektromet-
rian lisääntynyt käyttö bakteerien tunnistuksessa ja vasta viime vuonna julkaistut EU-
CASTin standardit aerokokkien antibioottiherkkyysmääritysten määrittämiseen ovat luo-
neet pohjan *Aerococcus urinae* antibioottiherkkyiden tutkimiselle luotettavasti ja vertai-
lukelpoisesti laajemmassa mittakaavassa. Kefuroksiimin ollessa Suomessa ensisijainen
käytettävä mikrobilääke *A. urinae* aiheuttamiin infektoihin tutkimuksessa tuotettu tieto
tuo arvokkaan lisän kliniseen laboratoriotyöhön EUCASTin määrittämien antibioottiherk-
kyysrajojen puuttuessa kefalosporiinien kohdalla. Näin ollen tutkimus on tarpeellinen,
sekä ajankohtainen HUSLABin bakteriologian osastolle. Toisaalta tutkimus osoitti, että
kaikki otannan *A. urinae* -kannat olivat herkkiä penisilliinille, joten mikrobilääkeresistens-
sin lisääntyessä globaalisti voisi olla järkevää kaventaa empiirisesti aloitettu suhteellisen
laajakirjoinen kefuroksiimi bakteremisen *A. urinae* -infektion varmistuttua G-penisillii-
niksi. Tällöin infektiota hoidettaisiin mahdollisimman kapeakirjoisella, mutta kuitenkin te-
hoavalla antibiootilla.

Antibioottiherkkyysmääritystä tehdessä bakteerisuspension ohjeenmukainen vahvuus
korostui, kun käsittelyssä oli vaativa ja heikosti kasvava bakteeri. Niukkakasvuisuus joi-
denkin kantojen kohdalla tuotti ongelmia, sillä bakteerisuspensiosta oli hankala saada
0,5 McFarlandin vahvuista. Rinnakkaismaljojen käyttö tuki lukua niukkakasvuisten
kantojen kohdalla. Tarpeettoman lisäkasvatuksen taas havaittiin osalla kannoista vain
hankaloittavan lukemista tai mahdollisesti suurentavan estorenkään halkaisijaa antibiooi-
tin imeytyessä maljalla laajemmalle alueelle. Eräät niukkakasvuisimmista kannoista

saattoivat myös autolysoitua lisääinkubaation aikana. Näin ollen tutkimuksen pohjalta ehdotetaan, että lisääinkubaatioaikaa käytettäessä herkkyysmaljat luetaan alustavasti jo ensimmäisen 18 ± 2 tunnin inkubaation jälkeen, jos lisäkasvatuksessa ilmenee ongelmia, kuten autolysoitumista. Herkkyysmäärittämissä vastaan tuli kaksi kantaa, jotka kasvoivat hyvin herkkyyksissä perämaljana käytetyllä verimaljalla, mutta itse herkkyysmaljalla bakteeripesäkkeitä ei ollut lisääinkubaationkaan jälkeen. Herkkyysmäärittäystä uusittaessa herkkyysmaljana käytettiin näiden kahden kannan kohdalla MH-F:n lisäksi suklaamaljaa, jossa bakteeri kasvoi yhtä hyvin kuin verimaljalla. Vaihtoehtoisesti olisi voinut myös kokeilla verimaljaa herkkyysmaljana. Käytännön työn osalta ehdotetaan suklaamaljan käyttöä Müller-Hinton Fastidious-maljan rinnalla, jos MH-F:llä ei ole kasvua ensimmäisen inkubaatioajan jälkeen. Käytännön työn toiminnan kehittämiseksi ehdotetaan myös muurahaishapon käyttöä MALDI-TOFissa matriisi-liuoksen lisänä epäiltäessä tunnistettavan bakteerin olevan aerokokki ja pesäkkeen ollessa niukka tai MALDI-levylle huonosti leviävä. Tutkimuksessa sen havaittiin parantavan tunnistusta huomattavasti, ja näin ollen voidaan mahdollisesti säästää aikaa ja nopeuttaa diagnoosin tekoa vähentäen uusintakertoja MALDI-TOFilla.

Jatkokehittämisen kannalta ehdotetaan, että tutkimuksessa saatuja MIC-arvoja verrataan samoista kannoista liemilaimennosmenetelmällä määritettyihin MIC-arvoihin samansuuntaisuuden selvittämiseksi. MIC-arvojen luotettavuuden arvioimiseksi ehdotetaan *A. urinaen* antibioottilherkkyyden määrittämistä rinnakkain liemilaimennosmenetelmällä ja gradienttidiffuusiomenetelmällä, jotta voidaan selvittää gradienttidiffuusiomenetelmän sopivuus *A. urinaen* herkkyysmäärittämissä.

Tässä tutkimuksessa keftriaksonille saatiin vain kiekkoherkkyystulokset MIC-liuskojen toimituksen häiriön takia. Kefalosporiineista kefotaksiimin ja keftriaksonin kohdalla on havaittu aikaisemmissa tutkimuksissa korkeita MIC-arvoja CLSI:n streptokokkien herkkyysrajoihin verrattaessa, mutta kannat ovat olleet kuitenkin herkkiä (Rasmussen 2016: 25). Tulevaisuudessa tulisi siis tutkia vielä *A. urinaen* antibioottilherkkyyttä keftriaksonille liemilaimennos- ja gradienttidiffuusiomenetelmällä ja verrata tuloksia tässä tutkimuksessa saatuihin penisilliinin ja kefuroksiimin MIC-arvoihin. Samalla keftriaksonin MIC-arvojen avulla saataisiin lisää tietoa siitä, voiko jo olemassa olevien EUCASTin määrittämien penisilliiniä koskevien rajojen perusteella vastata myös keftriaksonin MIC-arvojen herkkyudet *Aerococcus urinaelle*.

Yhden virtsasta löytyneen bakteerikannan herkkyystulokset olivat korkeampia kefalosporiinien MIC-arvoiltaan, sekä pienempiä antibioottikiekon halkaisijaltaan verrattuna

muiden bakteerikantojen tuloksiin. Kuitenkin kyseinen bakteerikanta oli herkkä penisilliinille verrattaessa *Aerococcus urinaelle* määritettyihin penisilliinin herkkyystulkintarajoihin. Vielä ei ole tiedossa onko *A. urinaella* olemassa jonkinlaisia resistenssimekanismeja, joten tiedon lisäämiseksi ehdotetaan, että kyseistä bakteerikantaa tutkitaan vielä lisää eri menetelmillä sen poikkeavan herkkyuden takia.

Ongelmaksi herkkyysmaljojen luvussa mainittakoon kokemattomien lukijoiden käyttö. Niukkakasvuisen bakteerin kohdalla näytemäärästä jouduttiin karsimaan kantoja käytännön kannalta liian suurien lukuerojen vuoksi ja tulokset analysoitiin kahden lukijan tulosten pohjalta alkuperäisen kolmen lukijan sijaan. Tutkimuksen heikkouksiin lukeutuivat myös vain suomalaisten bakteerikantojen käyttö, MIC-arvojen puuttuminen keftriaksonin kohdalla, sekä käytetyissä menetelmissä liemilaimennosmenetelmän puute. Lisäksi bakteerikannat oli kerätty HUSLABin toiminta-alueelta, joka kattaa vain eteläisimmät osat maasta Hangosta Loviisaan pohjoisimman paikkakunnan ollessa Hyvinkää. Luotettavuutta olisi voinut lisätä, jos samoja kantoja olisi tutkittu myös muissa Suomen laboratorioissa. Suomessa ja Tanskassa käytetään kefuroksiimia *A. urinaen* aiheuttamien infektioiden hoitoon. Kefuroksiimin antibioottiherkkyttä *Aerococcus urinaelle* ei ole aikaisemmin tutkittu, joten verrattavissa olevia tutkimuksia aiheesta ei ollut.

9 Sopimukset, luvat ja eettisyys

Opinnäytetyötä varten Metropolian ja HUSLABin bakteriologian osaston välille tehtiin sopimus opintoihin liittyvästä projektista ennen toteutusosion alkua. HUSLABiin toimitettiin myös opinnäytetyön tutkimuslupahakemus, joka hyväksyttiin marraskuussa 2017. Lisäksi henkilökohtaiset vaitiolo- ja salassapitolomakkeet allekirjoitettiin ennen tutkimuksen aloitusta.

Tutkimus toteutettiin noudattaen bioanalyttikoiden eettisiä ohjeita kliinisen laboratoriotyön osalta, jotka pohjautuvat EN ISO 15189:2013 -standardiin, lakiin terveydenhuollon ammattihenkilöistä 559/1994, sekä lakiin kansanterveyslain muuttamisesta 928/2005. Opinnäytetyössä noudatettiin hyväksytyjä toimintatapoja taaten tutkimusten hyvä laatu ja luotettavuus koko prosessin ajan. (Suomen Bioanalyttikkoliitto ry 2017.) Opinnäytetyö suoritettiin myös hyvän tieteellisen käytännön edellyttämällä tavalla pyrkien rehellisyyteen ja läpinäkyvyyteen toimien huolellisesti ja tarkasti läpi prosessin niin laboratorio-

töissä, kuin kirjallisissa osioissa. Aikaisempien tutkimusten ja tiedonlähteiden työt ja saavutukset huomioitiin huolellisilla lähdemerkinnöillä ja työhön vaadittavat luvat hankittiin ennen tutkimuksen aloitusta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2017.)

Tutkimuksessa käytetyt *A. urinae* -bakteerikannat tulivat HUSLABin bakteriologian osaston arkistoista ja eettisyyden takaamiseksi ne eivät sisältäneet henkilötietoja. Näytteet etsittiin taltiointinumeroiden perusteella ja nimettiin työtä varten juoksevin numeroin. Taustatietoina näytteistä olivat pakastuksen yhteydessä taulukoidut ikä ja sukupuoli, sekä oliko kyseessä veri- vai virtsakanta.

10 Luotettavuus

Tutkimuksen toteutusvaihe suoritettiin HUSLABin bakteriologian osastolla, joka on akkreditoitu testauslaboratorio ja noudattaa toiminnassaan standardien SFS-EN ISO 15189 ja SFS-EN ISO/IEC 17025 mukaista toimintajärjestelmää (HUSLAB n.d.). Akkreditointi eli laboratorion pätevyyden toteaminen suoritetaan FINASin (Finnish Accreditation Service) toimesta. Akkreditointi perustuu kansainvälisiin kriteereihin ja sen vaatimuksena on, että laboratorio täyttää standardissa kuvatut vaatimukset. (FINAS 2016.) Tutkimuksessa tehtiin antibioottil herkkyysmäärittämiin käytettiin laboratorion omia elatusmaljoja, antibiootteja sekä työvälineitä, joiden käyttökelpoisuudesta huolehdittiin laboratorion käytäntöjen mukaisesti.

Luotettavien tulosten saamiseksi antibioottil herkkyysmäärittämiin tehtiin noudattaen EUCASTin standardia. Herkkyysmäärittämiin tekona rinnakkaisina näytteinä ja perämaljojen käyttö, sekä herkkyystulosten tulkitseminen lopulta kahden eri lukijan toimesta lisäsivät osaltaan tutkimuksen luotettavuutta. EUCAST on määrittellyt MIC-herkkyystulkintarajat käyttämällä liemilaimennosmenetelmää, joten gradienttidiffuusiomenetelmä ei ole EUCASTin suosittama herkkyysmäärittämiin menetelmä. Bakteriologian osastolla liemilaimennosmenetelmä ei ole käytössä grampositiivisten kokkibakteerien testauksessa, eikä sitä haluttu ottaa käyttöön ensimmäistä kertaa *A. urinae* kaltaisen haastavan bakteerin tutkimiseen. Tämän vuoksi toiseksi herkkyysmäärittämiin menetelmäksi kiekkodiffuusiomenetelmän rinnalle valittiin gradienttidiffuusiomenetelmä. Tuloksia tarkastellessa kiekkoherkkyystuloksia pidettiin kuitenkin luotettavampina ja gradienttidiffuusiomenetelmän tuloksia ennemminkin suuntaa-antavina.

Jotta tutkittavat kannat saatiin käsiteltyä ja tulkittua sujuvasti sekä standardin mukaisissa aikarajoissa, sekä virtsa- että verikantojen viljely ja tulosten tulkinta jaettiin kahteen osaan. Näin työt saatiin jaettua tasaisesti koko kolmen viikon käytännön toteutuksen jaksolle. Saadut tulokset sekä mahdolliset erityishuomiot kirjattiin aina välittömästi ylös myöhemmin tapahtuvan tulosten analysoinnin helpottamiseksi.

Lähteet

- Andrews, Jenny 2014. Susceptibility testing and antibiotic assay. Teoksessa Ford, Michael: Medical microbiology. Oxford: Oxford University Press. 52–77.
- Attorri, Silvia – Clarridge, Jill – Kwoh, Christopher – Zhang, Quing 2000. *Aerococcus urinae* in Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 38. 1703–1705.
- Carkaci, Derya – Nielsen, Xiaohui C. - Fuursted, Kurt – Skov, Robert – Skovgaard, Ole – Trallero, Emilio P. - Lienhard, Reto - Åhman, Jenny – Matuschek, Erika – Kahlmeter, Gunnar – Christensen, Jens J. 2017. *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola*: Susceptibility Testing of 120 Isolates to Six Antimicrobial Agents Using Disk Diffusion (EUCAST), Etest and Broth Microdilution Techniques. *The Open Microbiology Journal* 11. 160–166.
- Christensen, Jens Jørgen – Ruoff, Kathryn L 2015. *Manual of Clinical Microbiology. Aerococcus, Abiotrophia, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci.* ASM Press USA. 422–436.
- Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1.2018. EUCAST. PDF-taulukko. <<http://www.eucast.org>>. Luettu 14.4.2018.
- Duncan, Mark W. – Nedelkov, Dobrin – Walsh, Ryan – Hattan, Stephen J. 2015. Applications of MALDI Mass Spectrometry in Clinical Chemistry. Verkkodokumentti. <<http://clinchem.aaccjnl.org/content/62/1/134>>. Luettu 14.4.2018.
- EUCAST 2018. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST. Etusivu. <<http://www.eucast.org>> Verkkodokumentti. Luettu 14.4.2018.
- FINAS 2016. Akkreditointi. Verkkodokumentti. <<https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>>. Luettu 14.4.2018.
- Guo, Ling – Ye, Liyan – Zhao, Qiang – Ma, Yanning – Yang, Jiyong – Luo, Yanping 2014. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *Journal of Thoracic Disease* 6 (5). 534–538. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://jtd.amegroups.com/article/view/2351/html>>.
- Humphries, Romney M – Hindler, Janet A 2014. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Aerococcus urinae*. *Journal of Clinical Microbiology* 52. 2177–2180.
- HUSLAB n.d. Laboratorion laatu. Verkkodokumentti. <<http://www.hus.fi/hus-tietoa/sairaanhoitoalueet/hyks/huslab/laboratorion%20laatu/Sivut/default.aspx>>. Luettu 14.4.2018.
- Huupponen, Risto 2014a. Kefalosporiinit. Bakteerien seinämän rakenteeseen vaikuttavat lääkkeet. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Pelkonen, Olavi – Ruskoaho, Heikki – Hakola, Jukka – Huupponen, Risto – Macdonald, Ewen – Moilanen, Eeva – Pasanen, Markku – Scheinin, Mika – Vähäkangas, Kirsi: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.oppiportti.fi/op/lft00875/do>>.
- Huupponen, Risto 2014b. Penisilliinien rakenne, vaikutusmekanismi, farmakokinetiikka ja haittavaikutukset. Bakteerien seinämän rakenteeseen vaikuttavat lääkkeet. Bakteeri-

lääkkeet. Teoksessa Pelkonen, Olavi – Ruskoaho, Heikki – Hakkola, Jukka – Huupponen, Risto – Macdonald, Ewen – Moilanen, Eeva – Pasanen, Markku – Scheinin, Mika – Vähäkangas, Kirsi: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.oppiportti.fi/op/lft00379/do>>.

Huupponen, Risto 2014c. Penisilliinien jaottelu. Bakteerien seinämän rakenteeseen vaikuttavat lääkkeet. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Pelkonen, Olavi – Ruskoaho, Heikki – Hakkola, Jukka – Huupponen, Risto – Macdonald, Ewen – Moilanen, Eeva – Pasanen, Markku – Scheinin, Mika – Vähäkangas, Kirsi: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.oppiportti.fi/op/lft00380/do>>.

Huupponen, Risto 2014d. Mikrobilääkkeet ja niiden jaottelu. Mikrobilääkkeiden jaottelu, käyttöperiaatteet ja haitat. Teoksessa Pelkonen, Olavi – Ruskoaho, Heikki – Hakkola, Jukka – Huupponen, Risto – Macdonald, Ewen – Moilanen, Eeva – Pasanen, Markku – Scheinin, Mika – Vähäkangas, Kirsi: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.oppiportti.fi/op/lft00372/do>>.

IBM® SPSS® Statistics. Version 25. IBM, International Business Machines Corporation. Verkkodokumentti. <<https://www.ibm.com/products/spss-statistics>>. Luettu 14.4.2018.

Järvinen, Asko – Huovinen, Pentti – Vaara, Martti 2011a. Beetalaktaamit. Bakteerilääkkeet. Mikrobilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.oppiportti.fi/op/isa00802/do#s3>>.

Järvinen, Asko – Huovinen, Pentti – Vaara, Martti 2011b. Bakteerilääkehoidon perusteet. Bakteerilääkkeet. Mikrobilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.oppiportti.fi/op/isa00801/do>>.

Lumio, Jukka 2017. Antibiootit. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01177>. Luettu 14.4.2018.

Matuschek, E. – Brown, D. F. J – Kahlmeter, G. 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4). 255–266. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60298-6/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60298-6/pdf)>.

Rasmussen, Magnus 2016. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* 22 (1). 22–27. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)00896-4/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)00896-4/pdf)>.

Sepsis. 2014. Käypä hoito – suositus. Käypä hoito. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Anestesiologiyhdistys ry:n asettama työryhmä. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/hoi/hoi50032.pdf>>. Luettu 14.4.2018.

Shelton-Dodge, Kelsey – Vetter, Emily A. – Kohner, Peggy C. – Nyre, Lisa M. – Patel, Robin 2011. Clinical significance and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguincola* and *Aerococcus urinae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (4). 448–451.

Stenholm, Teppo 2012. Two-Photon Excited Fluorescence Detection Technology in Screening for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Verkkodokumentti. <<http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-5275-5>>. Luettu 14.4.2018.

Suomen Bioanalytikko ry 2017. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Suomen Bioanalytikko ry. Helsinki. Hyväksytty 26.8.2017. Verkkodokumentti. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf>. Luettu 14.4.2018.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2017. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkauserpäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje. 14.11.2012. Verkkodokumentti. <http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf> Luettu 14.4.2018.

Virtsatieinfektiot. 2015. Käypä hoito –suositus. Käypähoito. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Nefrologiyhdistys ry:n, Kliiniset mikrobiologit ry:n, Suomen Infektiolääkärit ry:n, Suomen Kliinisen Kemian Erikoislääkäriyhdistys ry:n, Suomen Lastenlääkäriyhdistys ry:n, Suomen Urologiyhdistyksen ja Suomen yleislääketieteen yhdistys ry:n asettama työryhmä. Päivitetty kohdennetusti 4.12.2015. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/hoi/hoi10050.pdf>>. Luettu 14.4.2018.