Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Hilla Hyppönen, Anitta Nevalainen

Enterococcus faecium -bakteerin vankomysiiniresistenssin sekä ampisilliini- ja piperasilliinitatsobaktaamiherkkyyden korrelaation tutkiminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyytikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

17.4.2020

Tekijät Otsikko Sivumäärä Aika	Hilla Hyppönen, Anitta Nevalainen *Enterococcus faecium* -bakteerin vankomysiiniresistenssin sekä ampisilliini- ja piperasilliinitatsobaktaamiherkkyyden korrelaation tutkiminen 30 sivua + 1 liite 17.4.2020
Tutkinto	Bioanalyytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Merja Ojala Erikoistuva sairaalamikrobiologi Reetta Sihvonen

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, oliko HUSLABin (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorio) vuosina 2017–2019 tutkituissa veriviljelyissä ollut matala-asteisesti resistenttejä *Enterococcus faecium* -kantoja. Lisäksi tutkittiin ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmäärityksen korrelaatiota. Opinnäytetyön tavoitteena oli siis selvittää, onko veriviljelyiden herkkyysmääritys riittävän hyvällä tasolla matala-asteisen resistenssin toteamiseksi.

Kannat, joita oli 178 kappaletta, etsittiin pakkasesta ja niistä tehtiin puhdasviljelmät. Kantojen lajitunnistus varmistettiin MALDI-TOF -menetelmän avulla. Kaikista kannoista, joista saatiin tulokseksi 99,9 % *E. faecium* tehtiin PCR-määritys Mobidiagin CarbaR+VRE -menetelmällä (n=174). Ampisilliinin, piperasilliinitatsobaktaamin ja vankomysiinin mikrobilääkeherkkyysmääritykset tehtiin 33:lle ampisilliinille herkälle kannalle kiekkodiffuusiomenetelmällä. Herkkyysmääritystulosten vertailu suoritettiin SPSS-tilasto-ohjelmalla.

Tutkimuksessa selvisi, että vuosina 2017–2019 HUSLABissa tutkituissa veriviljelyissä on ollut yksi vankomysiinille matala-asteisesti resistentti *E. faecium* -kanta. Kanta osoittautui VRE-PCR-tutkimuksessa positiiviseksi *vanB*-geenin suhteen. Kiekkodiffuusiomenetelmällä vahvistettiin, että ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin kiekkoherkkyysmäärityksen tulokset korreloivat voimakkaasti keskenään *in vitro*.

Tulosten perusteella veriviljelyiden herkkyysmääritykseen ei liity laajempaa piilossa olevaa ongelmaa, sillä matala-asteisesti vankomysiinille resistenttejä oli vain 0,6 % VRE-PCR-menetelmällä tutkituista kannoista. Matala-asteisesti resistentin VRE:n mahdollisuus näytteissä on kuitenkin tärkeä pitää mielessä ja tarvittaessa veriviljelyiden *E. faecium* -löydöksille olisi hyvä tehdä VRE-PCR, jos esimerkiksi kliininen vaste vankomysiinille bakteremian hoidossa on huono. Kiekkoherkkyysmäärityksessä saatu tulos vahvistaa EUCAST-standardin määrittelemää vastaustapaa, eli *E. faecium* -bakteerin piperasilliinitatsobaktaamiherkkyys voidaan vastata ampisilliinille saadun tuloksen mukaisesti.

Avainsanat	vankomysiiniresistentti *Enterococcus faecium*, VRE-PCR, mikrobilääkeresistenssi, matala-asteinen vankomysiiniresistenssi

Authors Title	Hilla Hyppönen, Anitta Nevalainen A Study of Vancomycin Resistance in *Enterococcus Faecium* and The Correlation between its Susceptibility to Ampicillin and Piperacillin-tazobactam
Number of Pages Date	30 pages + 1 appendix 17 April 2020
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Merja Ojala, Senior Lecturer Reetta Sihvonen, Specialist in Clinical Microbiology (in training)

The aim of the thesis was to investigate whether there had been *Enterococcus faecium* strains with low level resistance to vancomycin that had gone unnoticed in the standard susceptibility screening process in HUSLAB (Laboratory of Helsinki University Hospital). Additionally, our goal was to study the correlation between susceptibility testing of ampicillin and piperacillin-tazobactam. The purpose of this study was to examine the 178 *E. faecium* strains isolated from blood cultures during the years 2017–2019.

At first, we removed the strains from a freezer and made pure cultures. We identified the *E. faecium* strains with MALDI-TOF mass spectrometry. Mobidiag CarbaR+VRE PCR testing was performed to every strain with the result of *E. faecium*, 99,9 % certainty from MALDI-TOF (n=174). We studied the antibiotic susceptibility of 33 strains that were previously tested sensitive to ampicillin by conducting susceptibility tests to ampicillin, piperacillin-tazobactam and vancomycin with disk diffusion method. The results were then analyzed with SPSS.

The result showed that in between years 2017–2019 there was one strain of low-level vancomycin-resistant *E. faecium*, which carried *vanB*-gene. With the statistical study performed by SPSS, we confirmed that there was a strong correlation between the results for ampicillin and piperacillin-tazobactam in antibiotic susceptibility test in *E. faecium*.

In conclusion low-level vancomycin resistance in *E. faecium* remains rare, as only 0,6 % of the VRE-PCR tested strains were *vanB*-positive. It is although necessary to keep in mind, that low-level vancomycin resistance is possible and that for VRE-PCR should be used when respond to vancomycin therapy is impaired. In addition, the strong correlation between ampicillin and piperacillin-tazobactam susceptibility testing suggests that piperacillin-tazobactam susceptibility of *E. faecium* can be derived from the result of ampicillin susceptibility, which confirms the defined diagnosis procedure of EUCAST-standard.

Keywords	vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VRE-PCR, antimicrobial resistance, low-level vancomycin resistance

Sisällys

1 Johdanto 1

2 Mikrobilääkkeet ja mikrobilääkeresistenssi 2

3 Vankomysiiniresistentit enterokokit (VRE) 3

3.1 Enterokokkien ominaisuuksia 3
3.2 Enterokokkien vankomysiiniresistenssi 5

4 Enterokokkien lajinmääritys, VRE:n tunnistusmenetelmät ja tilastolliset menetelmät 6

4.1 MALDI-TOF 6
4.2 VRE-malja 7
4.3 PCR 7
4.3.1 Reaaliaikainen PCR 8
4.3.2 VRE-PCR 8
4.4 Herkkyysmääritys 9
4.5 Tilastolliset menetelmät 10

5 Opinnäytetyön tavoite, tarkoitus ja tutkimuskysymykset 10

6 Opinnäytetyön toteutus 11

6.1 Opinnäytetyön ajoitus 12
6.2 Bakteerikantojen elvytys ja lajintunnistus 12
6.3 VRE-PCR:n toteutus 13
6.4 Herkkyysmäärityksen toteutus 14
6.5 Lisätutkimukset *vanB*-positiiviselle *E. faecium* -kannalle 15
6.6 Tutkimusaineisto 16

7 Tulokset 16

7.1 VRE-PCR:n tulokset 17
7.2 Herkkyysmäärityksen tulokset 19
7.3 Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmäärityksen korrelaatiotestin tulokset 20
7.4 Lisätutkimuksien tulokset *vanB*-positiiviselle *E. faecium* -kannalle 21

8 Pohdinta 23

8.1 Tulosten tarkastelu 23
8.2 Luotettavuus ja eettisyys 24

8.3 Ammatillinen kasvu ja riskienhallinta 25
8.4 Johtopäätökset 26
8.5 Jatkotutkimushaasteet 27

Lähteet 28

Liitteet

Liite 1. Kiekkoherkkyysmäärityksessä mitatut estovyöhykkeiden halkaisijat (mm)

1 Johdanto

Mikrobilääkkeiden keksiminen on vähentänyt merkittävästi infektiokuolleisuutta ja edistänyt modernin lääketieteen kehitystä. Kuitenkin mikrobilääkeresistentit bakteerit yleistyvät kovaa vauhtia maailmanlaajuisesti. Esimerkkeinä tästä ovat sairaalabakteerina tunnettu metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), antibiootteja hajottavia entsyymejä tuottavat ESBL-bakteerit, vankomysiinille resistentit enterokokit (VRE) ja karbapenemaaseja tuottavat enterobakteerit (CPE). Mikrobilääkkeiden suurentunut kulutus ja etenkin niiden väärinkäyttö lisää resistenttejä bakteerikantoja. Lisäksi resistenttien kantojen lisääntymiseen vaikuttaa merkittävästi globaali elintarvikkeiden kuljetus ja matkailu. Tilanteen pahentuminen lisää terveydenhuollon kustannuksia ja vaikeuttaa hoitoja. Tilanteen pahentuessa voivat myös tavanomaiset infektiot, kuten virtsatieinfektiot, muuttua kohtalokkaiksi. (Sihvonen – Holma – Pätäri-Sampo 2018: 1467–1475.)

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen mukaan Suomessa on esiintynyt viime vuosina aiempaa enemmän vankomysiiniresistenttejä enterokokkikantoja (VRE), joista yleisempi on *Enterococcus faecium* ja harvinaisempi *Enterococcus faecalis*. Vuonna 2018 tapauksia oli 205 kappaletta, sekä vuonna 2019 tapauksia oli 279 kappaletta. Määrä on huomattavasti suurempi kuin aiempina vuosina, sillä vuonna 2017 VRE-tapauksia oli 66 ja vuonna 2016 tapauksia oli 71 kappaletta. Vuoden 2018 tapauksista suurin osa on ollut Pohjois-Pohjanmaan, Varsinais-Suomen ja Pohjois-Savon sairaanhoitopiireissä, yhteensä 166 kappaletta, kun taas Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirissä (HUS) VRE-tapauksia oli vain 9. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2019; Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020.) Tämä ero VRE-tapausten määrissä herätti kysymyksen: onko HUSin alueen veriviljelyissä jäänyt huomaamatta hankalasti tunnistettavia matala-asteisesti vankomysiinille resistenttejä VRE-kantoja? Vuosina 2017–2019 veriviljelyistä HUSLABissa on löytynyt 178 kappaletta *E. faecium* -kantoja, jotka on taltioitu. Opinnäytetyössämme tutkimme taltioitujen *E. faecium* -kantojen vankomysiiniresistenssiä perinteistä kiekkodiffuusioherkkyysmääritystä herkemmin vankomysiiniresistenssin havaitsevalla VRE-PCR -menetelmällä.

Opinnäytetyöprojekti kuului osatyönä suurempaan HUSLABin tutkimusprojektiin Bakteremiset enterokokki-infektiot HUSissa (HUSVRE), jonka vastuullisena tutkijana toimi

osastonylilääkäri Anu Pätäri-Sampo. Opinnäytetyön osuus projektista oli viljellä tutkittavat *E. faecium* -kannat pakkasesta ja tehdä kannoille VRE-PCR sekä valikoidusta otoksesta mikrobilääkeherkkyydet kiekkodiffuusiomenetelmällä.

2 Mikrobilääkkeet ja mikrobilääkeresistenssi

Mikrobilääkkeillä on erilaisia toimintaperiaatteita, joilla ne joko estävät bakteerisoluja lisääntymästä tai tuhoavat bakteerisoluja. Mikrobilääkkeet vaikuttavat bakteerisolun eri toimintoihin kuten nukleiinihapposynteesiin, soluseinäsynteesiin, proteiinisynteesiin, foolihapposynteesiin tai solukalvoon. (Arias – Munita 2016: 5–24.)

Penisilliinin käyttö lääkkeenä keksittiin 1920-luvulla ja se oli suuri edistysaskel bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa. Nykyään beetalaktaamit, joihin penisilliinikin kuuluu, ovat laaja ja eniten käytetty mikrobilääkeryhmä. Yleisesti käytössä olevia beetalaktaamiryhmän mikrobilääkkeitä ovat penisilliinit kuten opinnäytetyössä tutkittava ampisilliini, sekä kefalosporiinit ja karbapeneemit. Beetalaktaamien vaikutus perustuu bakteerin soluseinäsynteesin estämiseen. (Bush – Bradford 2016. 1–3.)

Glykopeptidit, joista lähinnä käytössä ovat vankomysiini ja teikoplaniini, ovat tehokkaita laajakirjoisia antibiootteja. Laajakirjoisilla antibiooteilla on paljon haittavaikutuksia. Ne tuhoavat normaalimikrobistoa ja vankomysiini voi aiheuttaa jopa vakavia sivuvaikutuksia, joten niitä käytetään usein vasta kun muut mikrobilääkkeet eivät tehoa. Glykopeptidien vaikutus perustuu grampositiivisen bakteerisolun seinän peptidoglykaanin muodostumisen estämiseen. Vankomysiini sitoutuu peptidoglykaanin esiasteeseen ja estää sen siirtymisen bakteerin soluseinään peptidoglykaaniksi. (Blaskovich – Hansford – Butler – Jia – Mark – Cooper 2018: 715–735.)

Mikrobilääkeresistenssi tarkoittaa bakteerin kykyä vastustaa mikrobilääkkeitä, eli mikrobilääkkeet tehoavat heikosti tai eivät ollenkaan resistentteihin bakteereihin. Joillain bakteereilla on luontainen resistenssi tiettyjä antibiootteja kohtaan tai resistenssi voi olla hankinnaista. Osa bakteerikantojen resistenssistä on syntynyt mikrobilääkkeiden liiallisen käytön ja väärinkäytön vuoksi. Bakteerit muuntelevat perimäänsä nopeasti ja tehokkaasti mutaatioiden avulla ja vaihtamalla keskenään perintöainesta konjugaatiossa, mikä mahdollistaa resistenssin muodostumisen aina uusia antibiootteja vastaan. (World Health Organization 2018; European Centre of Disease Prevention and Control 2019.)

Bakteereilla on useita erilaisia resistenssimekanismeja. Bakteerit voivat tuottaa entsyymejä, jotka häiritsevät antibiootin toimintaa tai inaktivoivat sen. Bakteerin entsyymit voivat esimerkiksi tuhota antibiootin molekyylirakenteen tehden siitä toimintakyvyttömän. Bakteerit voivat estää mikrobilääkkeen pääsyn kohteeseensa bakteerin sisälle vähentämällä solukalvonsa läpäisevyyttä. Bakteerit voivat estää antibiootin toimintaa muuttamalla niiden tarttumiskohtia esimerkiksi entsyymien avulla niin, ettei antibiootti tunnista sitä eikä näin ollen pääse sitoutumaan ja vaikuttamaan, tai antibiootin ja sitoutumiskohdan välinen affiniteetti jää heikoksi, jolloin antibiootin toimintakin on vajavaista. (Arias – Munita 2016: 5–24.)

3 Vankomysiiniresistentit enterokokit (VRE)

Enterokokit ovat ihmisten suoliston normaalimikrobistossa esiintyviä grampositiivisia kokkibakteereja. Enterokokit kuuluivat vielä 1980-luvun alussa streptokokkien D-ryhmään, mutta erotettiin myöhemmin omaksi *Enterococcus* -suvuksi. Enterokokkilajeja tunnetaan monia, mutta vain pieni osa niistä kykenee aiheuttamaan infektioita ihmisille. Yleisimmät infektioita aiheuttavat lajit ovat *Enterococcus faecium* ja *Enterococcus faecalis*. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010.)

3.1 Enterokokkien ominaisuuksia

Enterokokit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, eli ne kykenevät kasvamaan sekä hapellisissa että hapettomissa oloissa. Enterokokit sietävät hyvin lämpötilavaihteluita, korkeaa pH:ta ja suoloja. Lisäksi enterokokit muodostavat biofilmejä ja kykenevät selviytymään elottomilla pinnoilla jopa päiviä. (Rantakokko – Jalava – Anttila 2010.) Enterokokit ovat muodoltaan pyöreitä tai ovaaleja, sekä esiintyvät pareina tai ketjuissa (Lebereton – Willems – Gilmore 2014). Bakteerien grampositiivisuus määritetään soluseinän rakenteen ja sen värjäytyvyyden perusteella. Grampositiivisilla enterokokeilla on soluseinässä paksu peptidoglykaanirunko, sekä lisäksi teikohappoja, proteiineja ja polysakkarideja. (Hancock – Murray – Sillanpää 2014.) Paksun peptidoglykaanikerroksen ansiosta grampositiivinen bakteeri värjäytyy gramvärjäyksessä tummemmaksi, kuin gramnegatiivinen, jolla puolestaan peptidoglykaanikerros on ohuempi (Cappuccino – Welsh 2018: 83–85).

Veriagarilla enterokokkipesäkkeet ovat yleensä kiiltäviä, väriltään vaalean harmaita, kooltaan pieniä ja muodoltaan pyöreitä (Kuvio 1). Veriagarilla enterokokkipesäkkeet ovat yleensä myös non-hemolyyttisiä, eli ne eivät hajota verisoluja kasvualustassaan, tosin

myös alfa- sekä beetahemolyyttisiä enterokokkikantoja tavataan (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010). Alfahemolyysissä on kyse punasolujen osittaisesta hajoamisesta, mikä aiheuttaa maljalle vihertävän sävyn pesäkkeiden ympärille. Beetahemolyysi johtuu bakteerin aiheuttamasta punasolujen täydellisestä hajoamisesta, jonka seurauksena malja kirkastuu pesäkkeiden ympäriltä. (Cappuccino – Welsh 2018: 117.)

Kuvio 1. Non-hemolyyttisiä *E. faecium*-pesäkkeitä veriagarilla (Kuva Anitta Nevalainen 2020).

Enterokokit ovat taudinaiheuttajina opportunistisia, eli ne aiheuttavat infektioita yleensä vain immuunipuolustuksen ollessa eri syistä heikentynyt. Enterokokit aiheuttavat tyypillisesti virtsatieinfektioita, lisäksi niitä tavataan usein myös lantion ja vatsaontelon infektioissa. Sairaalaympäristössä katetrit ja kanyylit ovat yleinen tartuntaväylä. Etenkin vankomysiiniresistentit enterokokit aiheuttavat sairaalainfektioita, kuten haavainfektioita, bakteremiaa eli bakteerien esiintymistä veressä ja endokardiittia eli sydänläppien tulehdusta. (Arias – Murray 2012: 1–2.) Usein on ajateltu, että enterokokki-infektiot saavat alkunsa potilaan omasta mikrobistosta. On kuitenkin osoitettu, että patogeeniset enterokokit leviävät usein myös sairaalaoloissa potilaasta toiseen. (Hiquita – Huycke 2014.)

3.2 Enterokokkien vankomysiiniresistenssi

Resistenttejä enterokokkeja on havaittu jo 1980-luvulla ja niitä tavataan yhä enenevässä määrin. Enterokokit ovat luonnostaan resistenttejä monille antibiooteille, kuten penisilliinille. Enterokokkien vankomysiiniresistenssin on ennustettu lisääntyvän tulevaisuudessa ja sen myötä enterokokkien merkitys infektioiden aiheuttajana on kasvanut. (Arias – Murray 2012: 3–4; Rantakokko-Jalava – Anttila 2010.) Erityinen huolenaihe on, että potilaan kantamasta VRE-kannasta resistenssigeenit pystyvät siirtymään myös muihin mahdollisesti patogeeneina merkityksellisempiin bakteereihin, esimerkiksi *Staphylococcus aureukseen* (Weaver 2019: 6).

Erityisen haasteen aiheuttaa matala-asteinen vankomysiiniresistenssi, jota on perinteisellä kiekkodiffuusiomenetelmällä hankala tunnistaa. Matala-asteinen resistenssi tarkoittaa, että herkkyysmäärityksessä muodostuvan estorenkaan halkaisija voi olla yhtä suuri kuin herkällä kannalla eroten ainoastaan siten, että eston reuna ei ole tyypillisen terävä. (Nissinen, 2009.)

Vakavien enterokokkien aiheuttamien infektioiden hoidossa käytetään yleisesti laajakirjoisia mikrobilääkkeitä, etenkin glykopeptideihin kuuluvaa vankomysiiniä. Vankomysiinin vaikutus perustuu sen bakteerisolun soluseinän muodostumista inhiboivaan vaikutukseen. Vankomysiini sitoutuu D-Ala-D-Ala dipeptidiin peptidoglykaanin esiasteessa, jonka siirtyminen soluseinään tällöin estyy. Resistenteissä enterokokeissa D-Ala-D-Ala:n tilalle on vaihtunut D-Ala-D-Lac tai D-Ala-D-Ser, jolloin peptidoglykaanin esiasteen ja vankomysiinin välinen affiniteetti jää heikoksi eikä vankomysiini tehoa. (Arias – Murray 2012: 9; Weaver 2019: 7.)

Vankomysiiniresistenteillä enterokokeilla on tunnistettu yhdeksän resistenssityyppiä, joista merkittävimmät ovat vanA- ja vanB-resistenssityypit. Resistenssin aikaansaavat yleisimmin geenit *vanA* ja *vanB*. Resistenssigeenit kykenevät siirtymään konjugaatiossa plasmidien mukana bakteerista toiseen. (Weaver 2019: 6; Sihvonen – Holma – Pätäri-Sampo 2018: 1472.)

VanA-tyyppinen resistenssi on yleensä fenotyypiltään vahva resistenssi vankomysiinille ja teikoplaniinille vanB-tyypin ollessa puolestaan vaihtelevasti resistentti vankomysiinille ja herkkä teikoplaniinille. Matala-asteista resistenssiä aiheuttavat etenkin vanC-, vanE-, vanG-, vanL- ja vanN-resistenssityypit. Enterokokkien luontainen resistenssi on yleensä

vanC-tyyppiä, jota koodittaa kromosomaalinen DNA, jota esiintyy esimerkiksi lajeilla *E. gallinarum* ja *E. casseliflavus*. *VanA*- ja *vanB*-geenit ovat usein plasmideissa kytköksissä transposoneihin, joita bakteerit voivat siirtää konjugaatiossa plasmideissa toisilleen ja näin levittää resistenssigeenejä. Vankomysiiniresistenssigeenien on havaittu siirtyvän transposonin *Tn1546* avulla. (Weaver 2019. 6–7.)

4 Enterokokkien lajinmääritys, VRE:n tunnistusmenetelmät ja tilastolliset menetelmät

Enterokokkien lajintunnistukseen käytetään nykyään pääasiassa MALDI-TOF -menetelmää. Mikrobilääkeresistenssiä tutkitaan tavallisesti muun muassa kiekkodiffuusiomenetelmällä, jolla saadaan tieto bakteerin herkkyydestä kyseiselle mikrobilääkkeelle. Vankomysiiniresistenssin osoittamiseen voidaan käyttää kiekkoherkkyysmäärityksen lisäksi VRE-PCR -tutkimusta. VRE:n seulonnassa voidaan käyttää myös VRE-maljaa.

4.1 MALDI-TOF

Bakteerien lajitunnistuksessa käytetään MALDI-TOF MS -menetelmää, eli ’’Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry’’, joka on massaspektrometriaan perustuva herkkä ja nopea tapa tarkkaan lajitunnistukseen mikrobiologiassa. Sen avulla voidaan tunnistaa esimerkiksi bakteereja, hiivoja, sieniä ja homeita määrittämällä niiden proteiinien ja peptidien massa-varaussuhde ja vertaamalla sitä tunnettujen mikrobien tietokantaan. (Singhal – Kumar – Kanaujia – Virdi 2015.)

Käytännössä tämä tapahtuu niin, että kasvatetusta mikrobin erillispesäkkeestä siirretään pieni määrä kohdelevylle. Uuttamisen helpottamiseksi hiivoihin ja joskus myös joihinkin bakteereihin lisätään muurahaishappoa. Pesäkkeeseen lisätään tämän jälkeen matriksia, joka kuivuessaan kiteytyy. Tämän jälkeen näyte ionisoidaan lasersäteellä. Erottuneet ionit pystytään erottamaan toisistaan niiden massa-varaussuhteen perusteella, joka saadaan selville mittaamalla aika, jossa hiukkaset kulkevat lentoputken läpi detektoriin. Tulosta verrataan tunnettujen mikrobien tietokantaan. (Singhal – Kumar – Kanaujia – Virdi 2015.)

4.2 VRE-malja

Vankomysiinille resistenttien enterokokkien seulonnassa käytetään erityisesti VRE:n viljelyyn kehitettyjä maljoja, joihin on lisätty antibiootteja. CHROMagar™ VRE -malja on kromogeeninen kasvatusalusta, joka inhiboi muiden bakteerien kuin vankomysiiniresistenttien enterokokkien kasvun. *E. faecium* ja *E. faecalis* kasvavat vaaleanpunaisen ja violetin sävyisinä pesäkkeinä, muut enterokokit sinisinä pesäkkeinä. (CHROMagarTM VRE 2019.) Näytettä ei voida kuitenkaan vastata positiiviseksi VRE:n suhteen vain VRE-maljan avulla, vaan positiivinen tulos tulee aina varmistaa herkkyysmäärityksellä ja/tai PCR-menetelmällä.

4.3 PCR

PCR eli polymeraasiketjureaktio, on tärkeä molekyylibiologian menetelmä, jonka avulla voidaan tutkia ja monistaa suuria määriä haluttua geeniä tai DNA:ta. Menetelmää käytetään laajasti esimerkiksi perinnöllisten sairauksien tutkimiseen ja infektiosairauksien diagnostiikassa. DNA:ta voidaan eristää esimerkiksi mikrobeista, kudoksesta, verestä ja syljestä. PCR on menetelmänä hyvin herkkä, eikä vaadi suurta määrää lähtömateriaalia. (Garibyan – Avashia 2013.)

PCR-menetelmään tarvitaan templaatti-DNA:n lisäksi ainakin nukleotidit, alukkeet ja DNA-polymeraasi. Olosuhteita parannetaan käyttämällä puskuriliuosta ja ioneja. Alukkeiden avulla määritetään kohta DNA:ssa, kuten emäsjärjestykseltään tunnettu geeni, jota halutaan monistaa. Nukleotideja käytetään monistuvan PCR-tuotteen rakentamiseen. Polymeraasientsyymi muodostaa uuden juosteen liittämällä nukleotidit toisiinsa. (Garibyan – Avashia 2013.)

PCR-ohjelma alkaa aina denaturaatiolla, eli reaktioliuoksen kuumentamisella niin korkeaan lämpötilaan, että DNA juosteet irtoavat toisistaan. Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa lasketaan sen verran, että alukkeet pääsevät kiinnittymään komplementaarisiin DNA-segmentteihin. Kolmannessa vaiheessa lämpötilaa nostetaan taas korkeammaksi, että DNA-polymeraasi pääsee rakentamaan uutta juostetta nukleotidien avulla. PCR-syklejä toistetaan ja jokaisen syklin jälkeen DNA:n määrä tuplaantuu. PCR-tuotteet saadaan visualisoitua esimerkiksi leimaamalla alukkeet fluoresoivalla väriaineella. (Garibyan – Avashia 2013.)

4.3.1 Reaaliaikainen PCR

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR) on uudempi menetelmä, jossa monistumista mitataan reaaliajassa ajon aikana. Menetelmän avulla voidaan selvittää, kuinka suuri määrä tutkittavaa jaksoa näytteestä löytyy, sekä saadaan tietoa monistumisen eri vaiheista. Yleisimmin käytetyt kaksi menetelmää ovat fluoresoivat värit, jotka kiinnittyvät epäspesifisesti kaksijuosteiseen DNA:han, sekä sekvenssispesifiset DNA-koettimet, jotka sisältävät fluoresenssilla leimatut reportterit. Reaaliaikaisella monistumisen taltioinnilla vältetään ongelmia, joita liittyy perinteiseen kvalitatiiviseen PCR-menetelmään, jossa monistuminen mitataan vasta viimeisen PCR-syklin loputtua. (Garibyan – Avashia 2013.)

4.3.2 VRE-PCR

VRE-PCR -menetelmää käytetään vankomysiiniresistenttien enterokokkien osoitukseen. Määrityksellä etsitään *vanA*- ja *vanB*-geenejä. Kyseessä on reaaliaikainen PCR-menetelmä, jonka tulokset tulkitaan kvalitatiivisesti, eli laadullisesti, joka käytännössä tarkoittaa sitä, että tulos vastataan positiiviseksi tai negatiiviseksi. Näytteeksi kelpaa esimerkiksi puhdasviljelty kanta. Menetelmässä käytetään spesifisiä alukkeita, jotka kiinnittyvät haluttuun geenialueeseen. Monistuminen tapahtuu vain alueille joihin alukkeet ovat kiinnittyneet, ja vain monistuneet alueet mitataan. Koska kyseessä on reaaliaikainen menetelmä, monistuminen mitataan jokaisen PCR-syklin jälkeen ja mittauksista muodostetaan kuvaaja, sekä jokaiselle näytteelle määritetään Ct-arvo. (Antikainen 2017.) Ct-arvo (threshold cycle) kuvaa PCR-syklien määrää kohdassa, jossa kuvaaja ylittää määritetyn kynnystason ja jossa eksponentiaalinen monistuminen alkaa. Mitä pienemmällä Ct-arvolla kanta monistuu, sitä enemmän tutkittavaa materiaalia näytteestä löytyy. (Thermo Fisher scientific 2016.)

Amplidiag CarbaR+VRE Kit -määritystä voidaan käyttää tunnistamaan vankomysiiniresistenssin tuottavat geenit *vanA* tai *vanB*. Menetelmä on perinteiseen viljelyyn nähden huomattavasti nopeampi, sillä tulokset saadaan jo muutamassa tunnissa. (AMPLIDIAG, CarbaR+VRE.) Sisäisen laadunohjauksen toteutumiseksi jokaisessa PCR-ajossa on negatiivisena kontrollina steriili vesi ja positiivinen kontrolli, joka on *vanA*- ja *vanB*-positiivinen, sekä inhibition kontrolli (Antikainen 2017).

4.4 Herkkyysmääritys

Mikrobilääkeherkkyyttä tutkitaan muun muassa kiekkodiffuusiomenetelmällä ja MIC-määrityksellä. Kiekkodiffuusiomenetelmällä selvitetään, onko kanta herkkä vai resistentti tietyllä kiekon antibioottipitoisuudella, kun taas MIC eli ''minimal inhibitory concentration'' määrityksellä saadaan selville pienin bakteerin kasvua inhiboiva pitoisuus. Kiekkodiffuusioherkkyysmääritys perustuu siihen, että agarmaljalle asetetusta antibioottikiekosta imeytyy lääkeainetta agariin ja se estää bakteerin kasvun maljalla sillä alueella, jossa lääkeainepitoisuus ylittää inhibitorisen pitoisuuden rajan. Maljalla bakteeriviljelmää kasvatettaessa antibioottikiekon ympärille jää estorenkaaksi tai estovyöhykkeeksi kutsuttu rengasmainen alue, jossa bakteereja ei kasva. Estorenkaan halkaisija mitataan ja mittaustulosta verrataan kansainväliseen EUCAST-standardiin. MIC-määrityksessä gradienttidiffuusiomenetelmällä maljalle asetetaan testiliuska, jossa antibioottia on nousevana pitoisuutena eli gradienttina, ja johon on painettu asteikko, jonka avulla luetaan pienin bakteerin kasvua estävä pitoisuus. Gradienttitestit ovat helppokäyttöisiä ja yleisimpiä MIC-määritysmenetelmiä kliinisissä laboratorioissa. MIC-määritys voidaan tehdä myös liemilaimennosmenetelmällä, jota käytetään MIC-määrityksen referenssimenetelmänä. (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2019.)

Herkkyysmäärityksen tulkinnassa on käytössä vuonna 2019 uudistettu kansainvälinen SIR-asteikko, jossa S tarkoittaa Susceptible, standard dosing regimen eli herkkä standardiannostuksella, I tarkoittaa Susceptible, increased exposure eli herkkä isolla annostuksella ja R tarkoittaa Resistant, resistentti eli tällaiseen kantaan kyseinen lääke ei tehoa edes isolla annostuksella. (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2019).

EUCAST-standardin mukaan kiekkoherkkyysmäärityksessä enterokokeilla vankomysiinin estorenkaan reunan tulee olla selkeä ja terävä eikä estovyöhykkeellä kasva yksittäispesäkkeitä. Estovyöhykkeen reunan ollessa epäselvä, tai kun estovyöhykkeen alueella kasvaa pesäkkeitä, tulisi vahvistustestaus suorittaa PCR-menetelmällä, tai vastata kanta resistentiksi, vaikka estovyöhykkeen halkaisija olisi > 12 mm. Kuviossa 2 on esimerkki vankomysiinille herkän *E. faeciumin* selkeästä ja terävästä estovyöhykkeen reunasta. Matala-asteisen vankomysiiniresistenssin tunnistaminen voi olla haastavaa, sillä estorenkaan reunat voivat olla vaikeasti tulkittavia. (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2017; Matuschek – Brown – Kahlmeter 2014: 255–266.)

Kuvio 2. Estovyöhykkeen reuna on terävä, kun *E. faecium* on herkkä vankomysiinille =VA (Kuva Hilla Hyppönen 2020).

4.5 Tilastolliset menetelmät

Pearsonin korrelaatiokerroin on tilastollinen menetelmä, jolla tutkitaan korrelaatiota. Korrelaatiolla tarkoitetaan kahden muuttujan välisen yhteyden voimakkuutta. Mitä kauempana korrelaatiokerroin on lukua 0, välillä -1–+1, sitä voimakkaampi on sen riippuvuus. Lähempänä arvoa -1 riippuvuus on negatiivista ja lähempänä arvoa +1 riippuvuus on positiivista. Negatiivinen riippuvuus nähdään hajontakuviossa alaspäin laskevana kuvaajana ja positiivinen nousevana kuvaajana. P-arvon ollessa < 0,05 pidetään korrelaatiota merkittävänä. (Taanila 2019.)

Mann-Whitney U -testi on jakaumasta riippumaton eli epäparametrinen testi, jolla verrataan ryhmien jakaumien eroa. Testin tulosta, P-arvoa peilataan merkitsevyystasoon, joka usein SPSS-ohjelmassa on < 0,05. Testattavana on nollahypoteesi, jonka mukaan jakauma on sama molemmissa ryhmissä. Nollahypoteesi hylätään, jos P-arvo on alle 0,05. Vaihtoehtoinen hypoteesi saa siis sitä enemmän tukea, mitä pienempi P-arvo on. (Taanila 2013.)

5 Opinnäytetyön tavoite, tarkoitus ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, oliko vuosina 2017–2019 HUSLABin bakteriologian osastolla tutkituissa veriviljelyissä jäänyt löytymättä matala-asteisesti resistenttejä *Enterococcus faecium* -kantoja. Tarkoitus oli tehdä veriviljelyistä eristetyille *E. faecium* -kannoille VRE-PCR -tutkimus ja ampisilliinille herkiksi tiedetyille kannoille vankomy-

siini-, ampisilliini- ja piperasilliinitatsobaktaamiherkkyysmääritys. Työn tavoitteena oli tarkistaa, onko veriviljelyissä enterokokkien herkkyysmääritys riittävän hyvällä tasolla matala-asteisen resistenssin toteamiseksi.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing -organisaation määrittämän herkkyysmääritysstandardin (EUCAST-standardi) mukaan piperasilliinitatsobaktaamin herkkyystulkinta voidaan tehdä *E. faecium* -bakteerille ampisilliinin kiekkoherkkyysmääritystuloksen mukaan. (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2020.) Tästä haluttiin kuitenkin HUSLABissa lisää käytännön tutkimustietoa ja siksi opinnäytetyössä selvitettiin myös korreloivatko ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin kiekkoherkkyysmääritystulokset keskenään *in vitro*.

Tutkimuskysymykset olivat:

1. Onko HUSLABin bakteriologian laboratoriossa vuosina 2017–2019 tutkituissa veriviljelyissä ollut matala-asteisesti vankomysiiniresistenttejä *Enterococcus faecium* -kantoja?

2. Korreloivatko *E. faecium* -kantojen ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin kiekkoherkkyysmääritystulokset keskenään *in vitro*?

6 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyössä tutkittiin *E. faecium* -kantojen vankomysiiniresistenssiä PCR:n ja kiekkodiffuusiomenetelmän avulla. Työssä käytettiin vankomysiiniresistenssin havaitsemiseen suunniteltua reaaliaikaista PCR-menetelmää, joka suoritettiin kaupallisella Mobidiagin Amplidiag CarbaR+VRE PCR -menetelmällä. Tutkimuksen *E. faecium* -kannoille ei ollut aiemmin tehty VRE-PCR -määritystä.

HUSLABin bakteriologian laboratorio on taltioinut kaikki veriviljelyistä eristetyt *E. faecium* -kannat. Tutkittavaksi otettiin kannat viimeisen kolmen vuoden ajalta eli vuosilta 2017, 2018 ja 2019, yhteensä 178 kappaletta. Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmäärityksen korrelaatiota tutkittiin tekemällä aineiston 33:lle ampisilliinille herkälle kannalle kiekkodiffuusiomenetelmällä herkkyysmääritys. Herkkyysmääritykset tehtiin kiekkodiffuusiomenetelmällä vankomysiinille, sekä ampisilliinille ja piperasilliinitatsobaktaamille. Lisäksi varmistettiin kaikkien kantojen lajintunnistus massaspektrometrisesti

MALDI-TOF -menetelmää käyttävällä Biomérieux:n VITEK MS MALDI-TOF -järjestelmällä.

6.1 Opinnäytetyön ajoitus

Opinnäytetyön suunnitteluvaihe oli syksyllä 2019. Suunnitelma esiteltiin seminaarissa 2.10.2019. Bakteremiset enterokokki-infektiot HUSissa tutkimusprojektin tutkimuslupa ja samalla tutkimuslupa opinnäytetyöhön hyväksyttiin 16.12.2019 ja opinnäytetyösopimus hyväksyttiin 19.12.2019.

Opinnäytetyön käytännön toteutus suoritettiin tammikuussa 2020 viikoilla 3–5. Raporttia kirjoitettiin toteutusvaiheen rinnalla ja sen jälkeen aikavälillä tammikuusta huhtikuuhun. Viikolla 3 etsittiin pakkasesta ja elvytettiin tutkimukseen bakteerikannat, aloitettiin lajintunnistusten varmistus MALDI-TOF -menetelmällä. Viikolla 4 vietiin lajintunnistus päätökseen, sekä tehtiin PCR-ajot ja kiekkoherkkyysmääritykset. Viikolla 5 viimeisteltiin herkkyysmääritykset, tehtiin lisätutkimukset ja analysoitiin tutkimuksen tuloksia tilastollisin menetelmin.

Valmis työ raportoitiin ja esiteltiin Metropolia ammattikorkeakoulun seminaarissa 7.4.2020. Opinnäytetyö esitellään myös HUSLABissa myöhemmin vuonna 2020.

6.2 Bakteerikantojen elvytys ja lajintunnistus

Taltioituja bakteerikantoja säilytetään -70 °C lämpötilassa maitoglyseriiniputkissa. Pakastettua bakteerimassaa raaputettiin viljelysauvalla verimaljalle pieni määrä, josta tehtiin hajotusviljely. Maljoja kasvatettiin 18 tuntia, eli käytännössä yön yli +35 °C lämpötilassa hiilidioksidiatmosfäärissä (5 % CO_2). Jotta voitiin varmistua pakastetun bakteerikannan elpymisestä, tehtiin vielä paseeraus eli kannasta tehtiin puhdasviljely verimaljalle ja kasvatettiin toinen vuorokausi.

Bakteerikantojen lajintunnistus varmistettiin massaspektrometrisesti MALDI-TOF -menetelmällä. Tunnistusta varten bakteerikasvua siirrostettiin maljalta pieni määrä viljelysilmukalla maldilevylle. Näytteeseen lisättiin 1 µl matriksia ja annettiin kuivua. Jos jostain kannasta oli hankalaa saada tulosta, siihen lisättiin 0,5 µl muurahaishappoa uuttamisen helpottamiseksi ja vasta muurahaishapon jälkeen lisättiin matriksi. Kontrollina MALDI-TOF -määrityksessä oli ATCC 8739 *Escherichia coli* -kontrollikanta.

6.3 VRE-PCR:n toteutus

DNA:n eristystä varten puhdasviljellystä kannasta siirrostettiin viljelysauvalla yksi pesäke 100 µl TE-puskuriin (1 mM Tris-EDTA, pH 8.0). Seosta kuumennettiin 100 °C lämpöhauteessa 15 minuuttia jotta bakteerisolun rakenne hajoaa ja perintöaines vapautuu. Kuumentamisen jälkeen seos sentrifugoitiin 13 000 rpm, jotta saatiin hajotettu solumateriaali putken pohjalle ja supernatantti otettiin talteen puhtaisiin eppendorf-putkiin. Seos pakastettiin -20 °C:ssa odottamaan PCR-ajoa. Näytteiden kontaminoitumisen välttämiseksi PCR-ajon valmistelut suoritettiin puhdastilassa (PCR-laboratorion epästeriili tila), johon mentäessä kädet desinfioitiin, vaatteet suojattiin hihallisella essulla ja käsiin laitettiin kahdet käsineet. Pipetoinnit suoritettiin laminaarikaapissa, jonka etulasi laskettiin kasvojen suojaksi mahdollisimman alas. Kaikki pipetoinnit suoritettiin käyttäen filtterillisiä pipetinkärkiä.

PCR-näytteiden ja reagenssien pipetointi tehtiin pipetointikaavion avulla. Kaavion avulla laskettiin tilavuudet ja taltioitiin näytteiden pipetointijärjestys. Näytteet ja reagenssit säilytettiin pakastettuina, joten ennen käyttöä ne sulatettiin, lisäksi ne vorteksoitiin eli sekoitettiin ja spinnattiin, eli sentrifugoitiin nopeasti liuokset putkien pohjalle. Käyttöseokseen pipetoitiin steriili vesi, master mix, joka sisältää PCR:n tarvittavat reagenssit ja assay mix, jossa on VRE-PCR:n reagenssit eli alukkeet ja koettimet. Pipetointi tehtiin PCR-strippeihin, eli kahdeksan toisissaan kiinni olevan reaktioputken riveihin. Käyttöseosta pipetoitiin jokaiseen stripin kaivoon 19 µl ja seuraavaksi kaivoihin pipetoitiin 1 µl näytettä. Kontrollit pipetoitiin kuten näytteet sarjan ensimmäisen stripin ensimmäisiin kahteen kaivoon, ensimmäiseen VRE-PCR -kitin positiivinen kontrolli ja toiseen negatiivinen kontrolli eli steriili vesi. Pipetoinnin jälkeen strippien päälle asetettiin korkit, jotka suljettiin huolellisesti, tällä vältettiin se, etteivät korkit aukea ajon aikana. Ennen PCR-ajoa stripit spinnattiin, jotta kaikki materiaali saatiin strippien pohjalle. Lisäksi varmistettiin, ettei strippeihin jäänyt isoja kuplia haittaamaan ajoa.

PCR-tutkimus tehtiin neljässä ajossa, ensimmäisenä pipetoitiin ja ajettiin 20 näytteen pilottisarja, jonka perusteella suunniteltiin lopun näytemassan käsittely. PCR-laitteen yhteen ajoon mahtui 12 kappaletta 8 näytteen strippejä eli yhteensä 96 näytepaikkaa sisältäen kontrollit, joten näytemassa jaettiin mahdollisimman tasaisesti neljään ajoon siten, että ensimmäisen 20 näytteen pilottiajon jälkeen toiseen ajoon tuli 60 näytettä, kolmanteen ajoon tuli 60 näytettä ja viimeiseen neljänteen ajoon jäi loput 37 näytettä.

PCR-osoitus tehtiin kaupallisella Mobidiagin Amplidiag® CarbaR+VRE -kitillä, joka sisälsi reagenssit ja kontrollit. DNA:n monistus suoritettiin Applied Biosystemsin Quantstudio5 -monistuslaitteella. Ajossa käytettiin seuraavanlaista VRE PCR -ohjelmaa: Ensimmäisessä ajon vaiheessa näytteitä kuumennettiin 2 minuutin ajan 50 °C. Toisessa vaiheessa lämpötilaa nostettiin 10 minuutiksi 95 °C, niin että DNA-juosteet irtoavat toisistaan. Kolmannessa vaiheessa lämpötilaa pidettiin vielä 15 sekuntia korkealla, 95 °C. Neljännessä vaiheessa lämpötilaa laskettiin hieman, eli 60 sekunniksi 60 °C, jotta alukkeet pääsevät kiinnittymään komplementaarisesti. Kun lämpötilaa taas nostetaan, pääsee DNA-polymeraasi rakentamaan uudet juosteet. Vaiheita 3–4 toistettiin 35 sykliä. Laite mittaa monistumisen jokaisen syklin jälkeen, ja muodostaa mittausten pohjalta kuvaajan.

VRE-PCR:n tulos on positiivinen, jos kanta monistuu < 32 Ct-arvoilla. (Antikainen 2017.) Ct-arvo (threshold cycle) kuvaa PCR-syklien määrää kohdassa, jossa kuvaaja ylittää määritetyn kynnystason ja jossa eksponentiaalinen monistuminen alkaa. Mitä pienempi Ct-arvo, sitä nopeammin käyrä on saavuttanut treshold-tason ja sitä enemmän tutkittavaa materiaalia näytteestä löytyy. Threshold-tason alapuolella baseline-alueella näkyvä käyrä tulkitaan taustaksi. (Thermo Fisher Scientific 2016.)

6.4 Herkkyysmäärityksen toteutus

Herkkyysmääritystä varten puhdasviljelmästä valmistettiin 0,5 McFarlandin standardin mukainen bakteerisuspensio siirrostamalla viljelysilmukalla pesäkkeitä maljalta 0,9 % NaCl:a sisältävään putkeen. Suspensio vorteksoitiin ja vahvuus mitattiin densitometrillä. Suspension vahvuuden tavoitearvo oli 0,5 McFarlandia ja sallittu vaihteluväli oli 0,44–0,56.

Bakteerisuspensio levitettiin eli inokuloitiin laminaarikaapissa Müller-Hinton -herkkyysmaljalle pumpulitikulla dreijaamalla, eli pyörittäjän avulla niin että suspensio levittyi tasaisesti koko maljan alueelle. Tämän jälkeen maljalle asetettiin Oxoidin antibioottikiekot, vankomysiini 5 µg, ampisilliini 2 µg ja piperasilliinitatsobaktaami 36 µg. Maljoja kasvatettiin aerobisesti 35 °C lämpöhuoneessa. Bakteerisuspensiosta tehtiin myös perämalja verimaljan puolikkaalle.

Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyydet luettiin EUCAST-standardin mukaisesti 18±2 tunnin kasvatuksen jälkeen ja vankomysiinin herkkyys luettiin 24 tunnin

kasvatuksen jälkeen. Herkkyysmäärityksen tulos tulkittiin mittaamalla estorenkaan halkaisija ja vertaamalla sitä EUCAST-standardin mukaiseen viitearvoon. Vankomysiinin estoa tulkittaessa arvioitiin myös estorenkaan reunan tasaisuutta. (Matuschek – Brown – Kahlmeter 2014.) Estorenkaat mitattiin tummaa alustaa vasten noin 30 cm etäisyydeltä.

Herkkyysmäärityksessä käytettiin kontrolleina tunnettuja kontrollikantoja, *Enterococcus faecium vanA* (IHU 77696, T-22547) ja *Enterococcus faecalis vanB* (ATCC-51299 T-90310).

Herkkyysmääritys tehtiin duplikaattina siten, että jokaisesta kannasta tehtiin kaksi herkkyysmääritysmaljaa. Herkkyysmääritykset luettiin siten, että molemmat lukivat kaikki maljat. Yhdestä näytteestä saatiin siis kaksi maljaa ja molemmista maljoista kaksi mittausta, eli neljä mittausta jokaisesta näytteestä. Mitatut tulokset analysoitiin SPSS-tilasto-ohjelmassa Pearsonin korrelaatiotestillä. Mittaustulosten välisen eron merkitsevyyttä verrattiin epäparametrisella Mann-Whitney U -testillä.

6.5 Lisätutkimukset *vanB*-positiiviselle *E. faecium* -kannalle

Kanta 172 tutkittiin uudelleen positiivisen VRE-PCR -tuloksen varmistamiseksi ja koska haluttiin selvittää sen *in vitro* herkkyys. Tarkastettiin kyseisen kannan 172 aiempi herkkyysmääritystulos, johon oli kirjattu, että kanta oli herkkä ja estovyöhyke oli ollut tarkkarajainen. Kyseinen kanta haettiin arkistointinumerolla uudelleen pakkasesta. Tällä varmistettiin, että näyte oli varmasti otettu oikeasta putkesta, eikä vahingossa esimerkiksi otettu viereistä näytettä. Lisäksi viljeltiin vielä uusi malja varmasti oikeasta arkistointiputkesta ja tehtiin lisätutkimuksia oikean testituloksen varmistamiseksi. Lisätutkimukset tehtiin siis sekä alkuperäiseltä maljalta, jolta aiempi PCR-määritys oli tehty, sekä uudelleen pakkasesta elvytetystä kannasta.

Kanta 172 viljeltiin VRE-maljoille, joita kasvatettiin aerobisesti +35 °C lämpötilassa 2 vuorokautta. Tavallisesti VRE-maljoja kasvatetaan 3 vuorokautta, mutta värireaktio saattaa ilmestyä maljalle jo tätä nopeammin, eikä silloin jatkokasvatus ole tarpeen. Kannalle tehtiin lisäksi MIC-herkkyysmääritys E-testillä vankomysiinille ja teikoplaniinille. EUCAST:n mukaan vankomysiinin MIC tulee olla yli 4 mg/l ja teikoplaniinin yli 2 mg/l että kanta on resistentti (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

2020). Kannalle tehtiin myös herkkyysmääritys vankomysiinille, ampisilliinille ja piperasilliinitatsobaktaamille kiekkodiffuusiomenetelmällä. EUCAST:n mukaan vankomysiinille herkän kannan vyöhykkeen halkaisija on > 12 mm, sekä estovyöhykkeen on oltava tarkkarajainen. Kannasta tehtiin myös uusi VRE-PCR -määritys sekä vanhalta että uudelta maljalta. PCR suoritettiin täysin samalla tavalla kuten aikaisempi, käyttäen myös Amplidiagin VRE-PCR -kittiä, sekä Applied Biosystemsin Quantstudio5 -monistuslaitetta.

6.6 Tutkimusaineisto

Lista vuosina 2017–2019 veriviljelyistä eristetyistä *Enterococcus faecium* -kannoista haettiin WHONET-järjestelmästä. Kokonaisuudessaan kantalistassa oli kaikkiaan 178 kantaa, joista työn edetessä osa poistettiin. Lopullinen aineisto käsitti 174 *E. faecium* -kantaa.

Kanta 42 poistettiin aineistosta, koska MALDI-TOF -lajitunnistuksella saatiin selville, että kyseessä oli *E. raffinosus* 99,9 % varmuudella. Kanta 112 poistettiin, koska se kasvoi maljalla selvästi stafylokokkimaisena, katalaasipositiivisena isona valkoisena pesäkkeenä. Kantaa 37 ei ollut taltioituna ja kannalle 108 ei löytynyt pakastimesta maitoglyseriiniputkea, vaan arkistointilaatikossa oli tyhjä paikka.

Maljoilla, 59, 94 ja 161, havaittiin useampaa kasvua, isompi ja pienempi pesäke, joista kuitenkin saatiin MALDI-TOF -menetelmällä tunnistus *E. faecium* 99,9 % varmuudella. Kannoista 59 ja 94 tehtiin kaksi VRE-PCR -osoitusta ja myös kaksi herkkyyttä. Kannasta 161 tehtiin kaksi VRE-PCR -osoitusta, sillä ei voitu olla varmoja olivatko maljalla erinäköiset pesäkkeet samaa vai kahta eri kantaa.

Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmäärityksen korrelaation tutkimukseen valikoitiin aiemman kiekkoherkkyysmäärityksen perusteella ampisilliinille herkäksi tiedetyt kannat, joita 174 kannasta oli 33 kappaletta.

7 Tulokset

Kappaleessa käsitellään VRE-PCR -tulokset 177 tutkitulle näytteelle, sekä ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmääritysten korrelaatiotestin tuloksia. Kappa-

leessa esitetään myös tulokset *vanB*-positiiviselle *E. faecium* -kannalle tehdyistä lisätutkimuksista. Ampisilliinin, piperasilliinitatsobaktaamin ja vankomysiinin kiekkodiffuusioherkkyysmäärityksessä mitatut estorenkaiden halkaisijat on esitetty liitteessä 1.

7.1 VRE-PCR:n tulokset

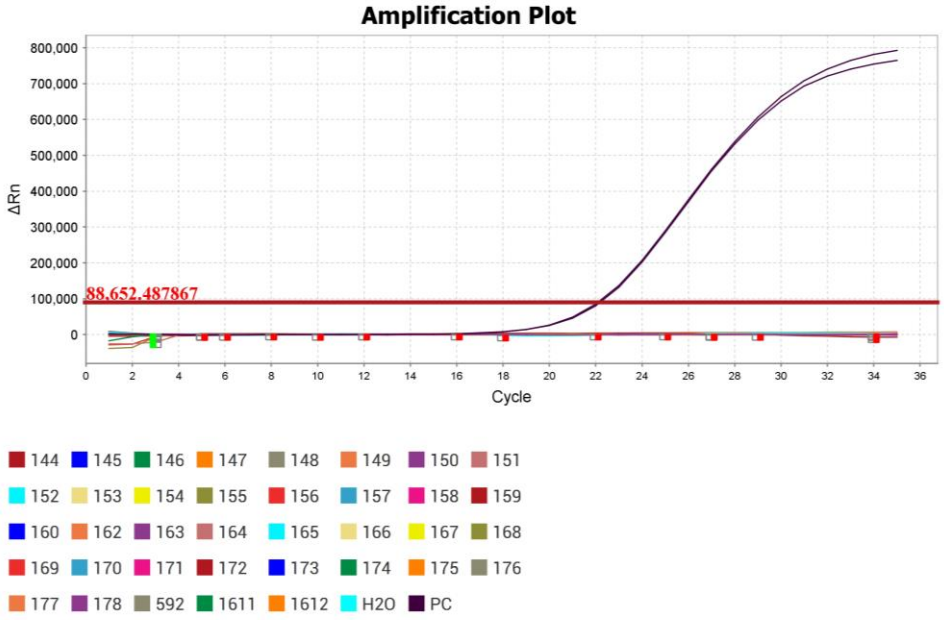
VRE-PCR -ajojen 177 näytteestä 176 oli negatiivisia ja 1 näyte oli *vanB*-positiivinen. PCR-näytteitä oli 177, koska kannoista 59, 99, sekä 161 tutkittiin kaksi erinäköistä pesäkettä. *VanB*-positiivinen kanta monistui ct-arvolla 25,8. Kontrollitulokset olivat asianmukaiset eli positiivinen kontrolli ja inhibitio monistuivat ja vesikontrolli ei monistunut. VRE-PCR:n tulokset ovat kuvattuna taulukossa yksi. Sinisellä taustalla on esitetty vesikontrolli ja oranssilla taustalla on esitetty kitin positiivinen kontrolli (PC).

Taulukko 1. VRE-PCR -tulokset, joissa tulokset on ilmaistu neg=negatiivinen ja pos=positiivinen. Taulukkoon on kuvattu näytteet (n=177), sekä vesikontrolli ja positiivinen kontrolli.

n=177	*VanA*	*VanB*	Inhibitio
176	neg	neg	pos
1	neg	pos	pos
H_2O	neg	neg	pos
PC	pos	pos	pos

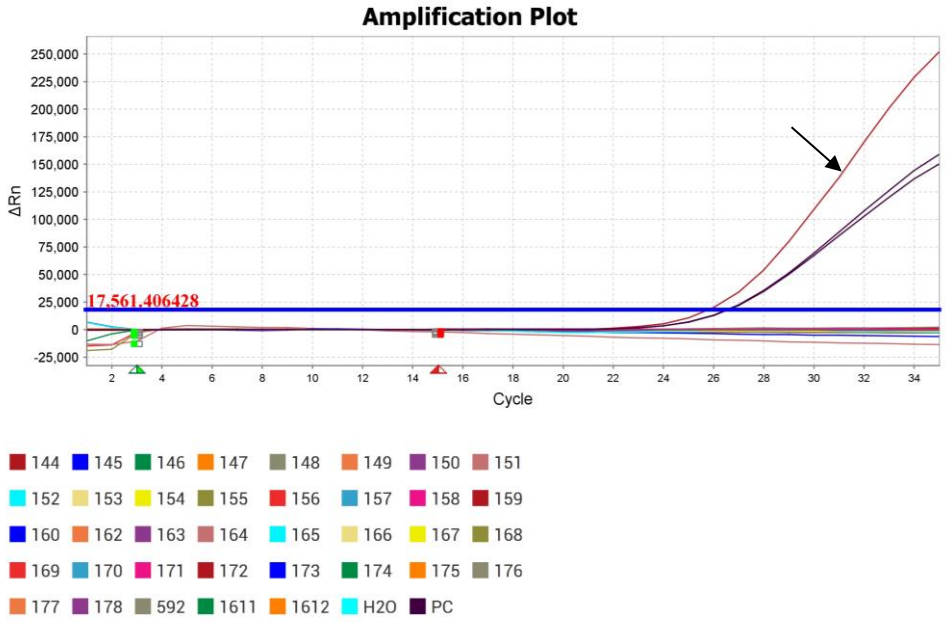
PCR-ajon jälkeen tarkastettiin ajon kuvaajista DNA-monistuksen onnistuminen, eli onko näytteissä tapahtunut monistumista ja toimivatko kontrollit oikein. Kuviot 3–5 ovat neljännen PCR-ajon kuvaajia. Kuvaajissa esitetään x-akselilla PCR-kierrosten määrä ja y-akselilla monistuneen tuotteen määrä. Treshold-taso eli kynnystaso on kuvissa esitetty värillisellä x-akselin suuntaisella viivalla. Kannat 144–178 on esitetty PCR-kuvaajissa kuvioissa 3–5 kukin omalla värillään ja kuvaajan alla olevat numeroidut värit ovat näytteiden ja kontrollien tunnisteita.

Kuviossa 3 vain positiivinen kontrolli monistuu, jolloin sen kuvaajat nousevat kuvassa punaisella viivalla merkityn treshold-tason yläpuolelle. Näytteet ja vesikontrolli eivät monistu, joten niiden kuvaajat jäävät treshold-tason alapuolelle.



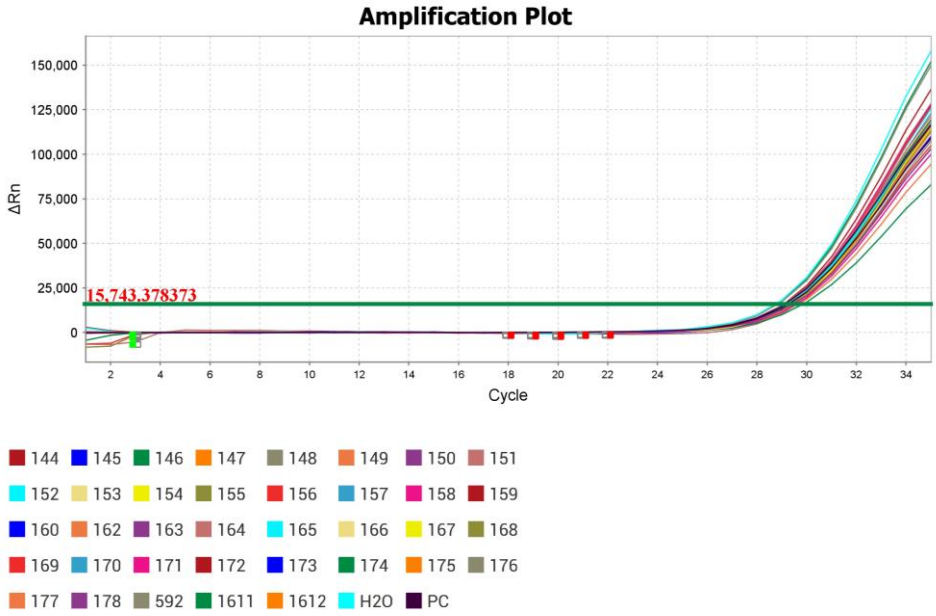
Kuvio 3. VRE-PCR -kuvaaja *vanA.*

Kuviossa 4 positiivisen kontrollin kuvaajat sekä yhden näytteen kuvaaja nousevat sinisellä viivalla esitetyn treshold-tason yläpuolelle. Ajossa on siis yksi *vanB*:n suhteen positiivinen näyte, kanta 172, jonka käyrä nousee kuvaajassa myös treshold-tason yläpuolelle ja on kuviossa 4 osoitettu nuolella.



Kuvio 4. VRE-PCR -kuvaaja *vanB.*

Kuviossa 5 kaikkien näytteiden jo kontrollien käyrät kohoavat vihreällä viivalla esitetyn treshold-tason yläpuolelle kuten pitääkin. Inhibitiolla kontrolloidaan, että kaikissa näytteissä tapahtuu monistumista, eli näytteessä ole mitään monistumista estävää tekijää. Käytännössä tämä tarkoittaa, että PCR-kitissä on mukana tunnettu DNA-sekvenssi ja siihen sopivat alukkeet, joiden on tarkoitus monistua ajossa, mikäli ajo onnistuu odotetulla tavalla.



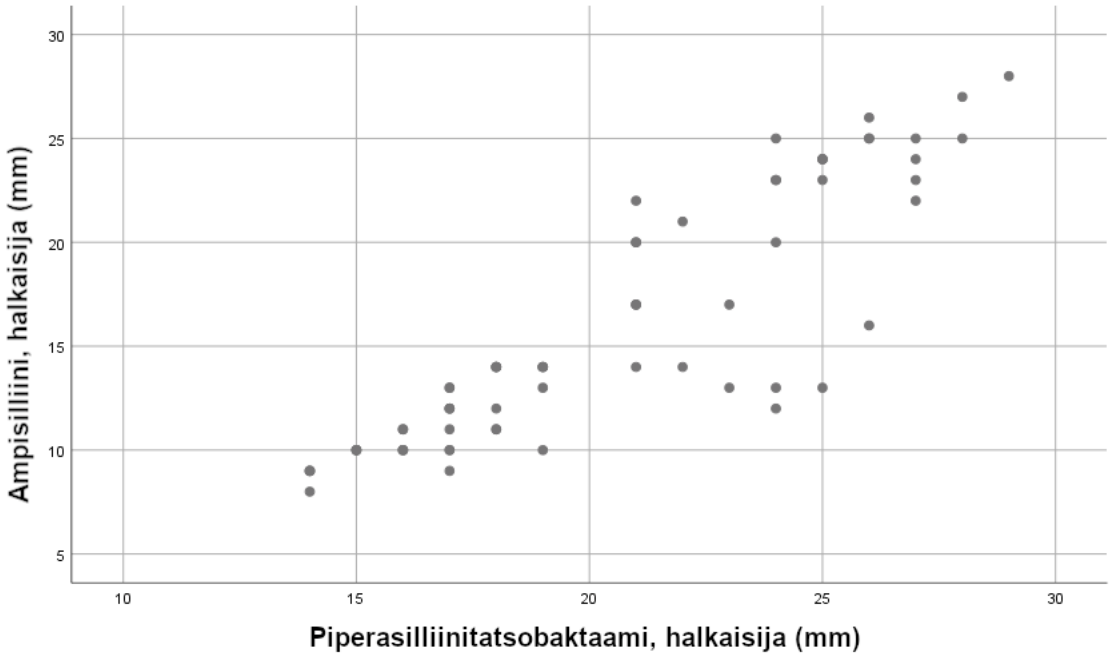
Kuvio 5. VRE-PCR -kuvaaja inhibitio.

7.2 Herkkyysmäärityksen tulokset

EUCAST-standardin mukaan enterokokkien vankomysiiniherkkyyden rajat ovat S > 12 mm ja R < 12 mm. Ampisilliiniherkkyyden rajat ovat S ≥ 10 mm ja R < 8 mm. Piperasilliinitatsobaktaamille ei ole määritetty herkkyysrajoja erikseen, vaan tulkinnassa käytetään ampisilliinin rajoja. (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2020.) Tutkittujen kantojen ampisilliinin estorenkaiden halkaisijat vaihtelivat välillä 8–28 mm. Piperasilliinitatsobaktaamin estorenkaiden halkaisijat vaihtelivat välillä 14–30 mm. Kaikki kannat olivat herkkiä. Kokonaisuudessaan herkkyysmäärityksessä mitatut estovyöhykkeiden halkaisijat on esitetty liitteessä 1.

7.3 Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmäärityksen korrelaatiotestin tulokset

Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmääritystuloksia tarkasteltiin ja laskettiin SPSS-tilasto-ohjelmalla korreloivatko ne keskenään. Estorenkaiden halkaisijat mittaamalla saatiin herkkyysmääritystulokset, joille laskettiin Pearsonin korrelaatiokerroin 0,882 ja P-arvo < 0,001. Kuviossa 6 on hajontakuviossa ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin estorenkaiden mittaustulokset pistejoukkona esitettynä. Hajontakuviossa x-akselilla esitetään piperasilliinitatsobaktaamin mittaustulokset ja y-akselilla ampisilliinin mittaustulokset. Korrelaatio on korrelaatiokertoimen 0,882 ja kuvaajan perusteella lineaarinen ja voimakas. Mitä kauempana korrelaatiokerroin on lukua 0, välillä -1–+1, sitä voimakkaampi on sen riippuvuus. P-arvon ollessa < 0,05 pidetään korrelaatiota tilastollisesti merkittävänä.



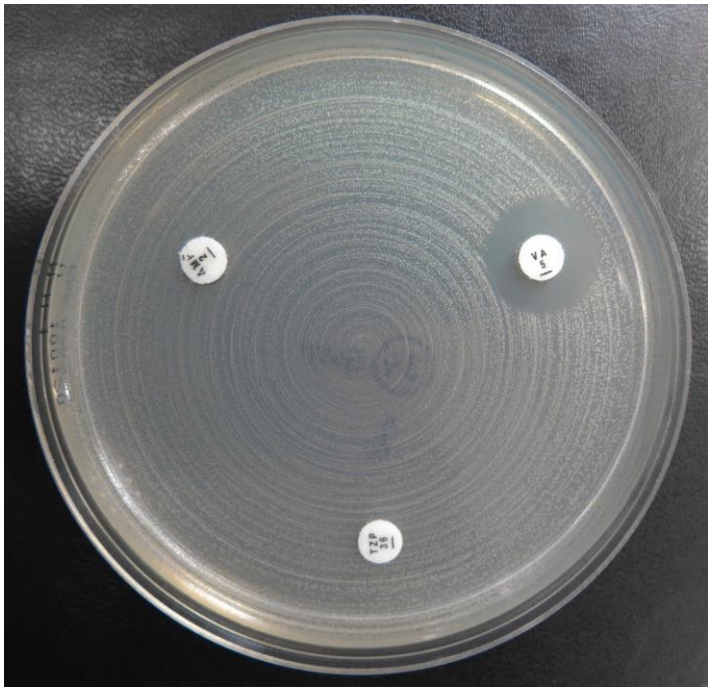
Kuvio 6. Hajontakuviossa ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin estorenkaiden mittaustulokset millimetreinä pistejoukkona esitettynä.

Analysoimme myös omaa mittaustarkkuuttamme vertaamalla toistemme mittaustuloksia keskenään epäparametrisellä Mann-Whitney U -testillä. Mann-Whitney U -testillä tuloksia verratessa P-arvoksi saatiin ampisilliinin mittauksille 0,395 ja piperasilliinitatsobaktaamin mittauksille 0,328. Jos P-arvo olisi < 0,05, olisi mittauksilla tilastollisesti merkitsevä ero.

7.4 Lisätutkimuksien tulokset *vanB*-positiiviselle *E. faecium* -kannalle

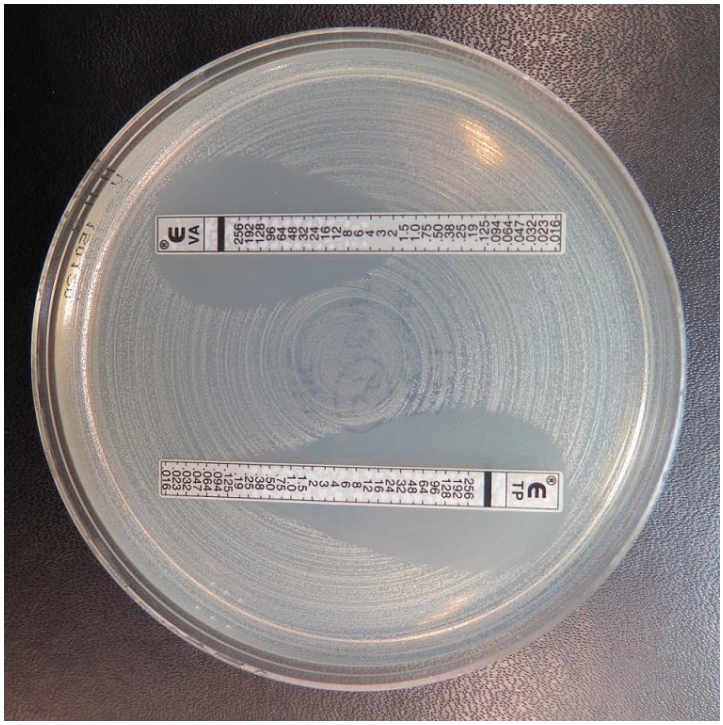
Lisätutkimukset tehtiin *vanB*-positiiviselle kannalle alkuperäiseltä ja uudelta maljalta eikä tuloksissa ei ollut merkitsevää eroa, joten pääteltiin, että kannat olivat samasta näytteestä ja tulokset luotettavia. VRE-PCR -määrityksessä molempien maljojen näytteessä tapahtui monistuminen *vanB*:llä, uudemmalta maljalta tulokseksi saatiin ct-arvolla 26,7 ja alkuperäiseltä maljalta ct-arvolla 25,7. Myös kontrollit toimivat ajossa asianmukaisesti. Uusinnan tulos vastaa ensimmäistä PCR-tulosta, jossa ct-arvo oli 25,8.

Kun herkkyysmääritys tehtiin kiekkodiffuusiomenetelmällä vankomysiinille, estovyöhykkeen halkaisijaksi mitattiin 15 mm, kun EUCAST:n mukaan herkän kannan estovyöhykkeen halkaisija on > 12 mm, sekä sen tulee olla tarkkarajainen. Estovyöhykkeen reuna ei huomattavasti poikennut herkän kannan estosta, eli kiekkoherkkyysmäärityksen perusteella kanta oli siis vankomysiinille herkkä *in vitro*. Kuviossa 7. näkyvät lisäksi ampisilliini- ja piperasilliinitatsobaktaamikiekot. Ampisilliinille ja piperasilliinitatsobaktaamille kanta oli resistentti ja kasvoi antibioottikiekkoon kiinni eli estovyöhyke oli 6 mm, kuten aiempien tulosten pohjalta osattiin olettaa.



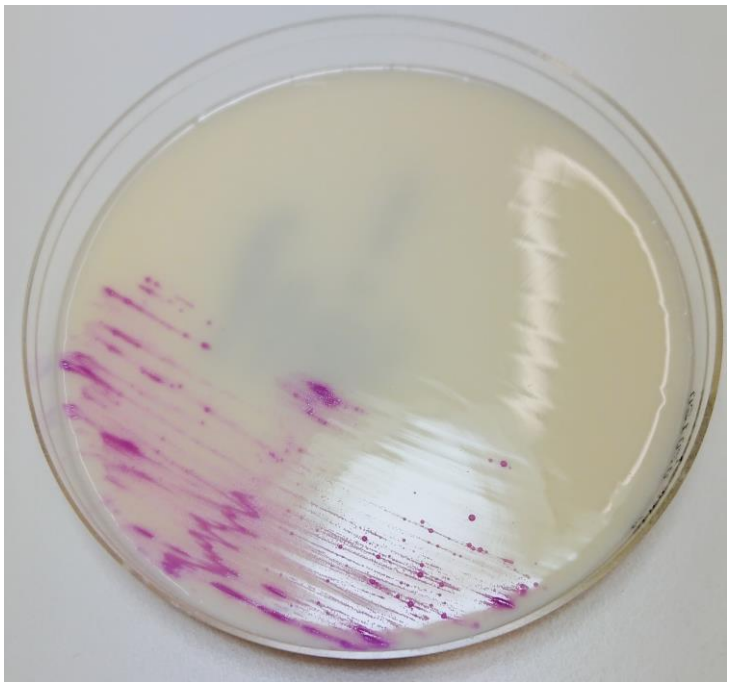
Kuvio 7. *VanB*-positiivisen *E. faecium* -kannan kiekkoherkkyysmääritysmalja. Maljalla antibioottikiekot VA=vankomysiini, TZP= tatsobaktaami, sekä AMP=ampisilliini. (Kuva Hilla Hyppönen 2020.)

MIC-määrityksen tulokset olivat vankomysiinille 2 mg/l ja teikoplaniinille 0,38 mg/l, eli nämä olivat pienimmät pitoisuudet antibioottia, joilla bakteerin kasvu estyi. Kuviossa 8 on *vanB*-positiivisen kannan MIC-määritysmalja, maljalla näkyvät testiliuskat vankomysiini ja teikoplaniini. MIC-määrityksen tulos oli siis S, eli herkkä vankomysiinin, sekä teikoplaniinin suhteen, eli tulos oli siis samansuuntainen kiekkodiffuusiomenetelmästä saadun tuloksen kanssa.



Kuvio 8. *VanB*-positiivisen kannan MIC-määritys. Maljalla E-testiliuskat VA=vankomysiini, sekä TP=teikoplaniini (Kuva Hilla Hyppönen 2020).

Kuviossa 9 on *vanB*-positiivinen kanta VRE-maljalla. Kanta kasvoi selektiivisellä VRE-maljalla kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen violetteina pesäkkeinä, mikä myös tuki positiivista VRE-PCR -tulosta.



Kuvio 9. *VanB*-positiivinen kanta 172 VRE-maljalla kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen (Kuva Hilla Hyppönen 2020).

8 Pohdinta

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, oliko HUSLABin veriviljelynäytteissä vuosina 2017–2019 ollut vankomysiinille matala-asteisesti resistenttejä *E. faecium* -kantoja, joiden resistenssiä ei ollut rutiinityössä kiekkodiffuusiomenetelmällä havaittu. Lisäksi tavoitteena oli tutkia korreloivatko *E. faecium* -kantojen ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin herkkyysmäärityksen tulokset keskenään *in vitro*.

8.1 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksessa selvisi, että vuosina 2017–2019 HUSLABissa tutkituissa veriviljelyissä on ollut yksi vankomysiinille matala-asteisesti resistentti *E. faecium* -kanta. Tutkituista 174 kannasta yksi osoittautui VRE-PCR -tutkimuksessa vankomysiiniresistenssin aikaan saavan *vanB*-geenin suhteen positiiviseksi. Myös VRE-maljalla kanta kasvoi violettina pesäkkeenä, mikä sopii VRE-löydökseen. Kiekkoherkkyysmäärityksen, sekä MIC-määrityksen perusteella kanta oli herkkä vankomysiinille *in vitro*.

Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin *in vitro* kiekkoherkkyysmääritystulosten Pearsonin korrelaatiokertoimeksi laskettiin 0,882 P-arvon ollessa alle 0,001. Yleisesti alle

0,05 P-arvolla korrelaatiota pidetään merkittävänä, mikä todettiin soveltuvaksi tähän tutkimukseen. Korrelaatiokerroin voi vaihdella välillä -1–+1 ja mitä enemmän korrelaatiokerroin eroaa nollasta, sen voimakkaampi on riippuvuus. Tämän tutkimuksen perusteella ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin kiekkoherkkyysmäärityksen tulokset korreloivat voimakkaasti.

Verrattaessa toistemme mittaustuloksia mittaustarkkuuden selvittämiseksi epäparametrisellä Mann-Whitney U -testillä, P-arvoksi saatiin ampisilliinin mittauksille 0,395, ja piperasilliinitatsobaktaamin mittauksille 0,328. Koska P-arvot ovat suurempia kuin 0,05, voidaan testin perusteella todeta, että mittausten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa, vaan mittasimme estovyöhykkeitä systemaattisesti ja johdonmukaisesti.

8.2 Luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyö tehtiin Tutkimuseettisen neuvottelukunnan määrittelemän hyvän tieteellisen käytännön periaatteita noudattaen. Käytännössä tämä tarkoittaa, että työskentelimme systemaattisen huolellisesti ja kirjasimme ja raportoimme saamamme tulokset vaatimusten mukaisesti. Työskentelimme rehellisesti viitaten muiden tutkijoiden töihin asianmukaisella tavalla, kopioimatta tai väärentämättä asiasisältöä. Ennen tutkimuksen aloittamista sovittiin kaikkien tutkimukseen osallistuvien osapuolten oikeudet, vastuut sekä velvoitteet. Opinnäytetyötä tehdessä toteutettiin myös Suomen bioanalyytikkoliiton bioanalyytikon eettisiä ohjeita, jotka tukevat hyvän tieteellisen käytännön periaatteita. Bioanalyytikon eettisiin ohjeisiin kuuluu muun muassa ammattitaidon ylläpito ja kehitys, salassapitovelvollisuuden noudattaminen, laboratoriotutkimusten laadusta vastaaminen ja poikkeamista ilmoittaminen, vastuun kantaminen omasta työstä, hyvien yhteistyösuhteiden ylläpito, sekä yksilön, väestön, että elinympäristön terveyden edistämiseen pyrkivä työskentely. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012; Suomen Bioanalyytikkoliitto ry 2017.)

Tulosten luotettavuutta lisäävät tutkimuksessa käytetyt kontrollit, joista saatiin asianmukaiset tulokset, herkkyysmäärityksessä perämaljat, joilla kasvoi juuri kyseistä *E. faecium* -kantaa, sekä herkkyysmaljojen teko duplikaattina, standardoidut menetelmät ja kansainvälisen EUCAST-standardin hyödyntäminen. Lisäksi positiivinen VRE-PCR -tulos varmistettiin toistamalla DNA-eristys ja PCR-määritys.

Opinnäytetyössä käytettiin kaupallista Mobidiagin Amplidiag CarbaR+VRE -kittiä, jota ei tietääksemme ole arvioitu kliinisissä tutkimuksissa VRE:n osalta. Hakusanoilla VRE, Amplidiag ja Mobidiag ei löytynyt PubMed-tietokannasta yhtään osumaa. Testi on kuitenkin asianmukaisesti validoitu ennen käyttöönottoa HUSLABissa ja kontrollit toimivat kaikissa ajoissa kuten pitikin.

Tietosuojan toteutumisen varmistamiseksi potilasnäytteistä peräisin olevat bakteerikannat tutkittiin anonyymisti. Potilasnäytteistä peräisin olevia bakteerikantoja käsiteltiin niin, että ne voitiin tarvittaessa yhdistää potilaaseen, mutta työssämme emme nähneet tai käsitelleet potilastietoja. Kannat haettiin arkistointitunnuksella ja tutkimuksessa käytettiin juoksevaa numerointia 1–178 tunnisteena.

Opinnäytetyöstä tehtiin asianmukaiset sopimukset HUSLABin ja Metropolia Ammattikorkeakoulun opiskelijoiden välillä. HUSilta haettiin suurempaa projektikokonaisuutta, Bakteremiset enterokokki-infektiot HUSissa (HUSVRE), varten tutkimuslupa, joka kattoi myös opinnäytetyömme. Opinnäytetyö raportoitiin ja valmis työ julkaistiin Theseus-tietokannassa.

8.3 Ammatillinen kasvu ja riskienhallinta

Suurimmat haasteet tutkimuksessa aiheutuivat MALDI-TOF -määrityksen viivästymisestä käyttökatkojen vuoksi. Haasteista selvittiin väljäksi suunnitellun aikataulun ansiosta. Itsenäinen työskentely, ongelmanratkaisukyky ja projektinhallinta sekä mikrobiologian laboratoriotyön perusmenetelmät ja tilastolliset menetelmät olivat keskeisimpiä oppimisen ja ammatillisen kasvun aiheita opinnäytetyöprojektissa. Laadukkaan ja tarkan työskentelyn ja dokumentoinnin merkitys selkeytyi laboratoriotyössä, sekä virheiden mahdollisuuden ymmärtäminen ja niiden minimoimiseen pyrkivän työskentelyn tärkeys korostui. Moniammatillinen yhteistyö tuki opinnäytetyöprosessia. Kävimme useita keskusteluja ohjaajiemme kanssa ja saimme paljon neuvoja, tukea, sekä kannustusta opinnäytetyöprosessin eri vaiheissa.

Opinnäytetyö prosessina oli ainutlaatuinen ja tärkeä osa bioanalyytikoksi kasvamista. Hakiessamme teoriatietoa opinnäytetyömme pohjaksi ja bakteriologian laboratoriossa, sekä PCR-laboratoriossa työskennellessämme pääsimme kehittämään ja soveltamaan osaamistamme ja saimme arvokasta kokemusta mikrobiologian laboratoriotyöskentelyn

käytännöistä ja menetelmistä. Ennen opinnäytetyön toteutusta olimme suorittaneet mikrobiologian kurssin hyväksytysti keväällä 2019. Olimme lisäksi opinnäytetyöprosessin aikana molemmat HUSLABin bakteriologian laboratoriossa opintoihin kuuluvassa työharjoittelussa syventämässä koulussa opittuja tietoja ja taitoja.

8.4 Johtopäätökset

HUSLABissa vuosina 2017–2019 tutkituissa veriviljelyissä on ollut yksi matala-asteisesti vankomysiinille resistentti *Enterococcus faecium* -kanta, mikä on tutkituista kannoista 0,6 prosenttia. Tästä voimme päätellä, että vuoden 2018 Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen ilmoittama HUS-alueen VRE-löydösten määrä (9 kappaletta) on hyvin todennäköisesti todenmukainen. VRE-PCR:llä vankomysiinille resistentiksi osoitettu kanta näytti perinteisellä kiekkoherkkyysmäärityksellä herkältä, mikä sopii matala-asteiseen resistenssiin. Kannan vankomysiiniresistenssi olisi siis ollut hyvin vaikeaa tunnistaa rutiinityössä. VRE-PCR osoitti kannan resistenssin olevan *vanB*-geenin aikaansaama ja *vanB*-geenin tiedetään tyypillisesti aiheuttavan matala-asteista vankomysiiniresistenssiä. (Weaver 2019: 8.)

Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella kyseessä ei kuitenkaan ole laajempi ongelma, vaan todennäköisemmin kyseessä on satunnainen löydös. Ilmiön olemassaolo on kuitenkin tärkeää pitää mielessä ja tarvittaessa veriviljelyiden *E. faecium* -löydöksille olisi hyvä tehdä VRE-PCR. Lisätutkimuksia olisi syytä tehdä, mikäli vankomysiinin eston reuna ei näytä tarkkarajaiselta, tai estovyöhykkeen alueella kasvaa pesäkkeitä. HUSLABin veriviljelyiden työkäytäntöjä ei todennäköisesti ole tarvetta muuttaa *E. faecium* -bakteerin osalta. Toisaalta, jos potilaalla havaittaisiin toistuvia *E. faecium* -veriviljelylöydöksiä, jotka eivät näyttäisi hoituvan vankomysiinillä, olisi VRE-PCR suotavaa tehdä matala-asteisen resistenssin poissulkemiseksi. Ja mikäli VRE-kantojen määrä HUS-alueella lähtisi voimakkaaseen nousuun, pitäisi VRE-PCR:n systemaattisempaa tekemistä veriviljelyissä myös harkita uudelleen.

Ampisilliinin ja piperasilliinitatsobaktaamin kiekkoherkkyysmääritystulokset korreloivat tutkimustulosten perusteella voimakkaasti keskenään *in vitro*. Saatu tulos vahvistaa EUCAST-standardin määrittelemää vastaustapaa, eli *E. faecium* -bakteerin piperasilliinitatsobaktaamiherkkyys voidaan vastata ampisilliinille saadun tuloksen tulkinnan mukaan.

8.5 Jatkotutkimushaasteet

Vuonna 2019 Journal of Antimicrobial Chemotherapy -lehdessä julkaistussa artikkelissa verrattiin kolmea eri MIC-liuskatestiä VanB-tyyppisesti matala-asteisesti resistenttien *E. faecium* -kantojen havaitsemisessa. Tutkimuksessa verrattiin MIC-herkkyysmääritystä EUCAST-standardin mukaisella gradienttidiffuusiomenetelmällä ja niin kutsuttua makrometodia, jossa muilta osin standardinmukaisessa herkkyysmäärityksessä käytettiin tavallista rikkaampaa kasvatusalustaa, rikkaampaa 2 McFarlandin bakteerisuspensiota 0,5 McFarlandin sijaan ja pidennettiin maljan kasvatusaika 48 tuntiin. Makrometodin käyttö paransi MIC-liuskatestien sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä huomattavasti. Tutkijoiden mukaan huomattavia hyötyjä saatiin jo pelkästään pidentämällä inkubaatioaikaa. Tutkijat ehdottivatkin, että makromenetelmää tulisi käyttää, kun on kyse *E. faecium* -kannan VRE-epäilyn tarkistuksesta eikä VRE-PCR:ää ole käytettävissä. (Klare – Bender – Fleige – Kriebel – Hamprecht – Gatermann – Werner 2019). Artikkelissa kuvatun kaltaisen makrometodin käyttöä matala-asteisen vankomysiiniresistenssin havaitsemisessa voisi tutkia lisää ja selvittää, miten pidempi kasvatusaika tai rikkaampi bakteerisuspensio vaikuttaisi testaukseen ja kuinka niitä voisi soveltaa rutiinityöhön.

Jatkotutkimusta VRE-PCR -menetelmällä voisi harkita tehtävän myös *E. faecalis* -kannoista sekä virtsanäytteistä löytyvistä *E. faecium* -kannoista, jotta saataisiin vielä laajempi kuva matala-asteisen VRE:n esiintymisestä. Myös virtsaviljelyissä on mahdollista, että samantyyliset matala-asteisesti resistentit kannat jäävät rutiinityössä huomaamatta, ja onkin hyvä myös niiden kohdalla huomioida tarkasti vankomysiinin estorenkaan reunan tarkkuus.

Lähteet

AMPLIDIAG. A family of multiplex diagnostic tests and platform for mid to high volume screening. CarbaR+VRE. Verkkodokumentti. <https://mobidiag.com/products/amplidiag/>. Luettu 20.2.2020

Antikainen, Jenni 2017. HUSLAB palveluntuotanto, työohjeet. VRE-reaaliaika PCR.

Arias, Cesar – Murray, Barbara 2012. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nature reviews. Microbiology 10 (4). 266-78. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3621121/#>.

Arias, Cesar – Munita, Jose 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology Spectrum 4 (2). 5–24. Verkkodokumentti. <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>. Luettu 22.9.2019.

Blaskovich, Mark – Hansford, Karl – Butler, Mark – Jia, ZhiGuan – Mark, Alan – Cooper, Matthew 2018. Developments in Glycopeptide Antibiotics. ACS infectious diseases 4(5). 715–735. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00258>.

Bush, Karen – Bradford, Patricia 2016. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 6 (8). Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968164/>.

Cappuccino, James G. – Welsh, Chad 2018. Microbiology: A Laboratory Manul. Pearson Global Edition. 117.

CHROMagar ™ VRE. CHROMagar. 2017. Verkkodokumentti. <http://www.chromagar.com/fichiers/1577109267NT_EXT_027_V9.0.pdf> Luettu 7.2.2020.

European Centre of Disease Prevention and Control 2019. Factsheet for experts - Antimicrobial resistance. Verkkodokumentti. <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>. Luettu 23.9.2019.

Garibyan, Lilit – Avashia, Nidhi 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/> Luettu 22.9.2019.

Hancock, Lynn E. – Murray, Barbara E. – Sillanpää, Jouko 2014. Enterococcal Cell Wall Components and Structures. Teoksessa: Gilmore, Michael S. 2014. Enterococci. From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190431/?fbclid=IwAR0BFg6XF8sd-hjo-XrpKidgH1_jNVM7p3G57r6c6tA94O8vGj9PCqG9HtQM> Luettu 23.9.2019.

Higuita, Nelson I. Agudelo – Huycke, Mark M. 2014. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. Teoksessa: Gilmore, Michael S. 2014. Enterococci. From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/> Luettu. 25.2.2020

Klare, Ingo – Bender, Jennifer K. – Fleige, Carola – Kriebel, Nancy – Hamprecht, Axel – Gatermann, Sören – Werner, Guido 2019. Comparison of VITEKVR 2, three different gradient strip tests and broth microdilution for detecting vanB-positive Enterococcus faecium isolates with low vancomycin MICs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 74 (10). 2926–2929. Saatavilla myös osoitteessa <https://doi.org/10.1093/jac/dkz310>.

Lebreton, Francois - Willems, Rob J. L. – Gilmore, Michael S. 2014. Enterococcus diversity, Origins in nature, and Gut Colonization. Teoksessa: Gilmore, Michael S. 2014. Enterococci. From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/> Luettu 25.2.2020

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>.

Nissinen, Antti 2009. Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä Versio 6. Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä - Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe). Verkkodokumentti. <https://www.thl.fi/attachments/Fire/kiekkomenetelma.pdf> Luettu 20.3.2020.

Ramsey, Matthew – Hartke, Axel – Huycke, Mark. 2014. The Physiology and Metabolism of Enterococci. Teoksessa: Gilmore, Michael S. 2014. Enterococci. From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190432/> Luettu 25.2.2020

Rantakokko-Jalava, Kaisu – Anttila, Veli-Jukka 2010. Enterokokit. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko - Meri, Seppo - Vaara, Martti – Ahola, Tero 2010. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: 1. Immunologia. Kustannus Oy Duodecim.

Sihvonen, Reetta – Holma, Tanja – Pätäri-Sampo, Anu 2018. Mikrobilääkkeille resistentit bakteerit yleistyvät. Duodecim 134 (15). 1467–1475. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/304196/duo14428.pdf?sequence=1>.

Singhal, Neelja – Kumar, Manish – Kanaujia, Pawan K. – Virdi, Jugsharan S. 2016. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525378/> Luettu. 25.2.2020

Suomen Bioanalyytikkoliitto ry 2017. Bioanalyytikon, Laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Verkkodokumentti. < https://www.bioanalyytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf > Luettu 9.10.2019

Taanila, Aki 2019. 10 Korrelaatio ja sen merkitsevyys. Verkkodokumentti. <https://tilastoapu.wordpress.com/2011/11/01/10-korrelaatio-ja-sen-merkitsevyys/>Luettu 26.3.2020.

Taanila, Aki 2013. Mann-Whitney U -testi. Verkkodokumentti. <https://tilastoapu.wordpress.com/2012/03/08/mann-whitney-u-testi/>. Luettu 26.3.2020.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2019. VRE esiintyvyys. Verkkodokumentti. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiat/tartuntatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyys/vre-esiintyvyys>. Luettu 19.9.2019.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020. VRE esiintyvyys. Verkkodokumentti. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/vre-eli-vankomysiiniresistentti-enterokokki/vre-esiintyvyys-suomessa> Luettu 10.4.2020

Thermo Fisher Scientific 2016. Real-Time PCR: Understanding Ct. Verkkodokumentti. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> Luettu 20.10.2019

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. Verkkodokumentti. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf>. Luettu 19.2.2020.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2019. New definitions of S, I and R from 2019. Verkkodokumentti. <http://www.eucast.org/newsiandr/>. Luettu 19.11.2019.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2017. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Verkkodokumentti. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf>. Luettu 23.9.2019.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta (TENK) 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). Verkkodokumentti. <https://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanto>. Luettu 9.10.2019

Weaver, Keith E. 2019. Enterococcal Genetics. Microbiology Spectrum 7 (2). Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.GPP3-0055-2018>.

World Health Organization 2018. Antimicrobial resistance. Verkkodokumentti. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Luettu 22.9.2019.

Kiekkoherkkyysmäärityksessä mitatut estovyöhykkeiden halkaisijat (mm)

Nro	ID	AMP malja 1		AMP malja 2		TZP malja 1		TZP malja 2		VAN malja 1		VAN malja 2	
		Hilla	Anitta	Hilla	Anitta	Hilla	Anitta	Hilla	Anitta	Hilla	Anitta	Hilla	Anitta
1	3	27	25	26	26	27	26	26	27	19	20	19	20
2	5	13	14	14	14	19	19	19	19	19	18	19	18
3	6	27	28	28	28	28	28	29	30	21	21	21	21
4	11	14	15	14	14	19	19	18	18	20	20	19	19
5	17	10	10	10	10	16	16	15	16	20	20	20	20
6	19	22	25	23	25	22	25	21	24	19	19	19	19
7	26	25	24	24	25	26	26	25	25	19	19	19	19
8	34	20	23	20	23	21	25	21	24	19	19	20	20
9	39	10	11	11	11	15	15	18	18	19	19	19	20
10	45	17	17	18	18	21	22	21	21	19	19	19	18
11	49	11	12	11	12	17	18	17	18	19	19	20	20
12	55	13	13	13	13	17	17	18	17	19	19	19	20
13	56	14	14	15	15	18	19	19	19	16	15	15	15
14	57	13	13	12	13	25	25	24	24	21	20	20	20
15	59-1	22	24	23	24	26	27	28	27	21	21	22	22
16	59-2	24	25	23	25	27	29	27	28	22	22	22	22
17	61	14	14	14	15	18	19	18	20	17	18	18	18
18	62	22	23	21	23	23	24	22	24	18	18	18	18
19	69	23	24	23	24	25	25	26	26	20	20	20	20
20	76	11	11	10	12	17	18	17	19	18	18	18	18
21	85	9	11	9	10	17	19	18	19	19	19	19	19
22	94-1	10	12	11	12	16	17	16	17	17	18	17	17
23	94-2	11	12	11	12	16	17	16	17	17	17	17	17
24	95	14	14	14	14	22	21	22	21	18	19	19	19
25	97	20	20	20	20	21	24	21	24	18	18	18	18
26	109	8	10	8	9	15	15	14	14	19	19	19	19
27	118	14	13	13	14	23	25	23	25	15	15	15	15
28	121	25	25	25	25	26	27	26	27	16	16	16	16
29	125	10	12	11	12	15	17	16	17	19	18	19	19
30	135	9	10	9	10	14	15	14	15	19	18	19	18
31	157	10	11	10	11	17	18	17	18	19	19	19	19
32	167	9	10	9	10	14	15	14	15	22	22	23	22
33	170	18	15	16	17	24	27	23	26	23	23	22	22
34	172	6	6	6	6	6	6	6	6	15	15	16	15
35	172	6	6	6	6	6	6	6	6	15	15	15	15

Taulukossa lyhenne AMP tarkoittaa ampisilliinia, TZP piperasilliinitatsobaktaamia ja VAN vankomysiiniä. Mittaustulokset on ilmoitettu millimetreinä. Taulukossa vihreällä taustavärillä on merkitty herkät kannat ja oranssilla taustavärillä erotetaan resistentit kannat: ampisilliini S ≥ 10 mm ja R ≤ 8 mm, vankomysiini S > 12 mm ja R < 12 mm. Sinisellä taustalla on merkitty herkän ja resistentin väliin arvoiltaan jäävät tulokset.