

Vankomysiiniresistenttien enterokokkien vanA/B-geenien tunnistusmäärityksen verifiointi GeneXpert[®]-analysaattorilla

Susanne Kokkonen

Meri Latvamäki

OPINNÄYTETYÖ
Marraskuu 2021

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalyytikko

KOKKONEN, SUSANNE & LATVAMÄKI, MERI:
Vankomysiiniresistenttien enterokokkien vanA/B-geenien tunnistusmäärityksen verifiointi GeneXpert® -analysaattorilla

Opinnäytetyö 52 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Marraskuu 2021

Enterokokit ovat ihmisen suoliston normaaliin mikrobistoon kuuluvia grampositiivisia bakteereja. Niillä on matala taudinaiheuttamiskyky, mutta opportunistipatoogeneina ne voivat aiheuttaa erilaisia infektioita elimistön vastustuskyvyn alennuttua. Ne ovat moniresistenttejä ja usein ainoa antibiootti niiden aiheuttamien infektioiden hoitoon on vankomysiini. Jos myös vankomysiiniä kohtaan on kehittynyt vastustuskyky, on kyseessä VRE, eli vankomysiiniresistentti enterokokkikanta. VRE:n aiheuttajista tärkeimpiä ovat resistenssityypit VanA ja VanB.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida vanA- ja vanB -geenien tunnistamiseen käytettävä Xpert vanA/vanB -molekyylitestin Cepheidin GeneXpert® -analysaattorille. Tutkimusmenetelmän verifiointilla varmistetaan laboratorion kyky täyttää uuden menetelmän suorituskykyvaatimukset ja tuottaa sitä käyttäen luotettavia ja toistettavia, sekä vertailukelpoisia tuloksia verrattuna vakiomenetelmällä saataviin tuloksiin. Menetelmän verifiointi on suoritettava ja hyväksyttävä ennen kuin se voidaan ottaa käyttöön rutiinidiagnostiikassa. Opinnäytetyössä verifiointi rajattiin tutkimaan menetelmän herkkyys, tarkkuus ja toistettavuus.

Opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä toimeksiantajan, Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian ja mikrobiologian toimintayksikön kanssa, kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Tutkittavista 38 näytteestä tehtiin rinnakkaismäärityksinä herkkyysmääritykset ja PCR-testaus GeneXpert® -analysaattorilla, jolla määritettiin myös menetelmän toistettavuus. Tulokset analysoitiin kvantitatiivisesti ja menetelmien tuloksia verrattiin keskenään, sekä GeneXpert®:in tunnistamia geenejä referenssilaboratorion ilmoittamiin tietoihin. Toistettavuusajojen tuloksista laskettiin keskihajonta ja CV%.

Tulokset osoittavat Xpert vanA/vanB -molekyylitestin soveltuvan rutiinidiagnostiikkaan vanA- ja vanB -geenien tunnistamiseen herkkyuden, tarkkuuden, sekä toistettavuuden puolesta. Kokonaisuutena herkkyysmääritysten ja PCR:n tulokset täsmäävät keskenään ja toistettavuuksissa vaihtelu on suhteellisen pientä.

Asiasanat: VRE, vanA/B, enterokokki, GeneXpert®, verifiointi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Biomedical Laboratory Scientist

KOKKONEN, SUSANNE & LATVAMÄKI, MERI:
Verification of a GeneXpert® Identification Test for VanA/B Genes in Vancomycin Resistant Enterococci

Bachelor's thesis 52 pages, appendices 5 pages
November 2021

Enterococci are gram-positive bacteria belonging to the normal microbial system of the human gut. They have a low pathogenicity, but as opportunistic pathogens, they can cause a variety of infections when the body's immune system is reduced. They are multi-resistant and the only antibiotic to treat infections is vancomycin. If resistance is developed also to vancomycin, it is a VRE, i.e. a vancomycin-resistant enterococcal strain. The most important causes of VRE are the resistance types VanA and VanB.

The purpose of the thesis was to verify Xpert vanA / vanB molecular test for the identification of vanA and vanB genes on a Cepheid GeneXpert® analyzer. The verification ensures that the laboratory is able to meet the performance requirements of the new method and thereby able to produce reliable and reproducible test results, comparable to the results obtained by a standard procedure. The verification of the method must be performed and approved before it can be used in routine diagnostics. In the thesis, the verification was limited to the sensitivity, accuracy, and reproducibility of the method.

Sensitivity assays and PCR assays were performed in parallel on 38 samples using a GeneXpert® analyzer, which was also used to test reproducibility of the method. The results were analyzed quantitatively, and the results of the methods were compared to each other, as well as the genes identified by GeneXpert® to the data reported by the reference laboratory. From the results of the repeatability runs, were calculated the standard deviation and CV%.

The results demonstrate that the Xpert vanA/vanB molecular assay is suitable for routine diagnostics to identify the sensitivity, accuracy, and reproducibility of the vanA and vanB genes. The results of the sensitivity assays and the PCR are consistent and the variability in reproducibility is relatively small.

Key words: VRE, vanA/B, enterococci, GeneXpert®, verification

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	BAKTEERIT	6
3	ENTEROKOKIT	9
3.1	Esiintyvyys ja ominaisuudet	9
3.2	Kliininen merkitys	11
4	MIKROBILÄÄKKEET	13
4.1	Antibiootit	13
4.2	Vankomysiini	14
5	MIKROBILÄÄKERESISTENSSI	16
5.1	Resistentit bakteerit.....	16
5.2	Resistentit enterokokit.....	16
6	VANKOMYSIINIRESISTENSSI	18
6.1	VRE.....	18
6.2	Van-geenit.....	19
7	ANALYTIKKA.....	23
7.1	Bakteerin tunnistus.....	23
7.2	Herkkyysmääritykset.....	23
7.3	PCR	25
7.3.1	Real-Time qPCR	25
7.3.2	GeneXpert®	27
8	VERIFIOINTI.....	29
9	TUTKIMUKSEN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT	31
10	TUTKIMUSMENETELMÄT	32
11	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	34
12	TUTKIMUKSEN TULOKSET	37
13	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA.....	40
13.1	Johtopäätökset	40
13.2	Eettisyys	41
13.3	Luotettavuus	41
	LÄHTEET	43
	LIITTEET	50

1 JOHDANTO

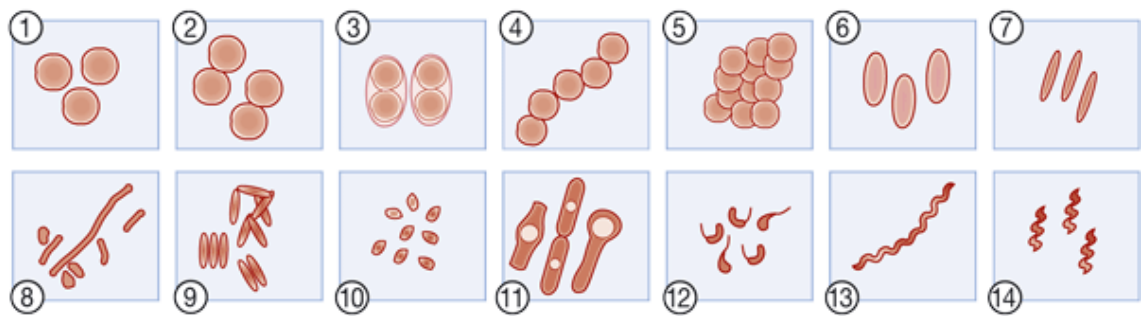
Enterokokit (*Enterococcus*) ovat niin ihmisen kuin myös monen eläinlajin suoliston normaaliin mikrobistoon kuuluvia grampositiivisia bakteereja. Enterokokit ovat opportunistipatogeeneja, eli ne toimivat taudinaiheuttajina vasta, jos kantajan vastustuskyky on heikentynyt esimerkiksi kilpailevien bakteerien tuhouduttua mikrobilääkityksen seurauksena. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020a, 2020d.) Ne voivatkin aiheuttaa vakavia haava- tai yleisinfektioita osastohoidossa oleville potilaille. Enterokokit ovat resistenttejä monille antibiooteille, ja usein vankomysiini saattaa olla ainut toimiva antibiootti näille bakteereille. Ihmisen yleisimmät enterokokkilajit ovat *E. faecalis* sekä *E. faecium*. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2020.)

Opinnäytetyön aihe on vankomysiinille resistenttien vanA- ja vanB-geenien tunnistusmenetelmän verifiointi. Työhön kuuluu puhtaiden enterokokkikantojen viljely erikoiselatusaineilla, tunnistaminen ja herkkyysmääritys, sekä niiden tulosten vertaaminen PCR-tekniikalla saatuihin tuloksiin. Menetelmällä todetaan enterokokit, joiden herkkyys vankomysiinille on alentunut.

Opinnäytetyö tehdään Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian ja mikrobiologian toimintayksikölle (jatkossa puhutaan mikrobiologian toimintayksiköstä). Heillä on käytössään Cepheidin GeneXpert®, mutta vanA- ja vanB-geenejä tunnistavaa geenitestiä ei ole verifioitu ja sen luotettavuutta testattu. Tällä hetkellä Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin VRE-näytteet tutkitaan Huslabin laboratoriossa. Menetelmää on toivottu verifioitavaksi, ettei geenimääritystä tarvitse ostaa ulkopuolisesta laboratoriosta ja näytteitä lähettää Helsinkiin, vaan ne voitaisiin tutkia itse Seinäjoella. (Kauppila 2020.) Kustannusten pienenemisen ohella näytteiden tulosten nopeampi valmistuminen vaikuttaa positiivisesti potilasturvallisuuteen, sillä jos näytteet saadaan analysoitua nopeammin, infektiotapauksissa tehokkain mikrobilääkitys voidaan myös aloittaa nopeammin.

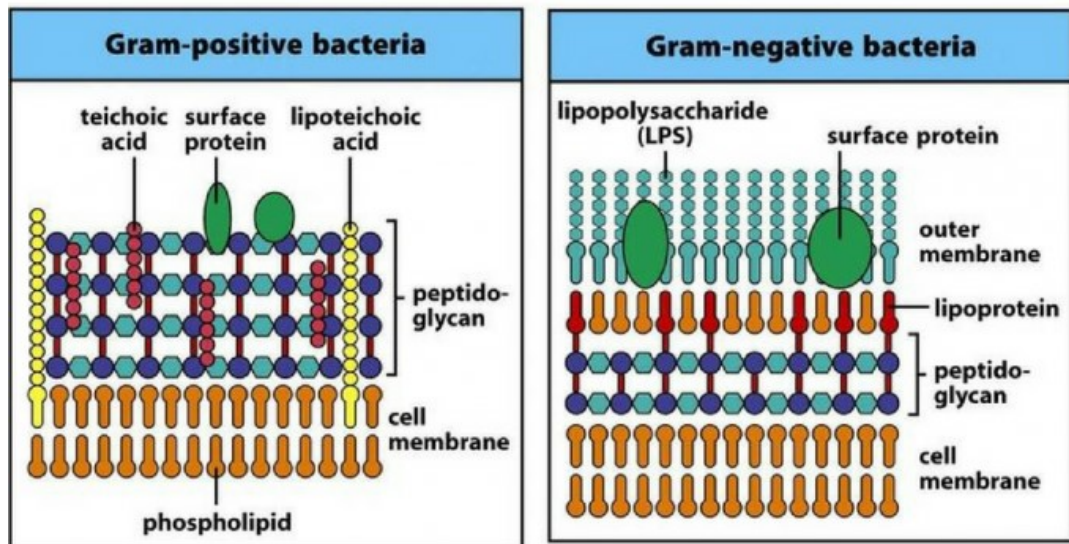
2 BAKTEERIT

Bakteerit ovat mikroskooppisia yksisoluisia organismeja. Yli miljoonasta bakteerilajista yli tuhat aiheuttaa ihmiselle erilaisia klinisiä infektioita. Bakteerit jaotellaan muotonsa mukaan (kuva 1) pallomaisiin kokkeihin (coccus) ja sauvabakteereihin (bacillus). Muitakin bakteerimuotoja on, mm. korkkiruuvimaiset spirokeetat tai käyristyneet ja pilkunmuotoiset vibriot. Mikroskoopilla tarkasteltaessa bakteerit ovat yleensä ryhmittyneet niille tyypillisiin muodostelmiin: kokit voivat muodostaa kahden bakteerisolun diplokokkeja (diplococcus) sekä useamman bakteerisolun ketjuja tai ryhmiä. (Carlson & Koskela 2011; Skurnik & Vuopio 2020b.)



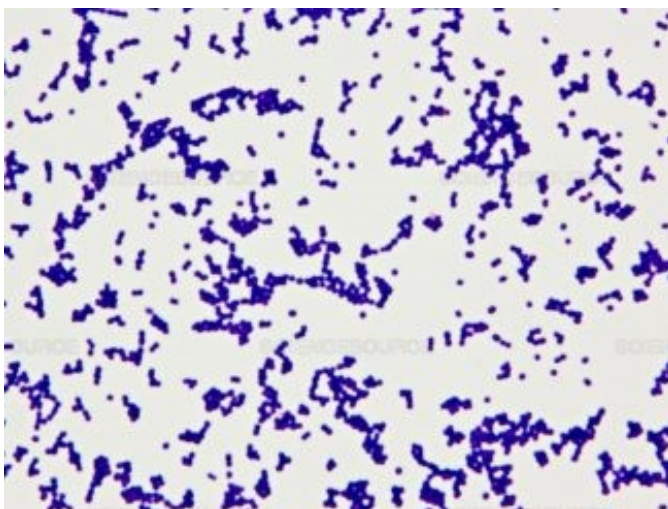
KUVA 1. Erilaisia bakteerimuotoja ja -ryhmittymiä. 1) Kokkeja 2) Diplokokki 3) Diplokokkeja 4) Ketjukokki 5) Rypälekokki 6) Pullea sauva 7) Hentoja sauvoja 8) Pleomorfisia sauvoja 9) Palisadeja 10) Pieniä kokkobasilleja 11) Itiöllisiä sauvoja 12) Pilkunmuotoisia bakteereja 13) Spirokeetta 14) Spirilleja Alkuperäispiirros: Vaara 2011 (Carlson & Koskela 2011)

Muodon lisäksi bakteerit jakautuvat aerobisiin ja anaerobisiin, sekä niiden soluseinän rakenteen mukaan grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin (kuva 2) lajeihin (Carlson & Koskela 2011). Useimpien bakteerien solukalvoa ympäröi polymeerirakenteisesta peptidoglykaanista eli mureiinista koostuva soluseinä. Mureiinkerros on jättimolekyylillä ja kuin tiheäsyinen verkkopussi bakteerisolun ympärillä. Soluseinän paksuuden mukaan bakteerit jaetaan kahteen pääluokkaan, grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin bakteereihin. Grampositiivisten bakteerien soluseinä on huomattavasti paksumpi kuin gramnegatiivisten; gramnegatiivisilla bakteereilla peptidoglykaanikerroksia on 1-3, grampositiivisilla kerroksia on useita kymmeniä. Soluseinän ominainen, bakteerikohtainen rakenne on perustana useiden mikrobilääkkeiden toimintamekanismille. (Skurnik & Vuopio 2020.)

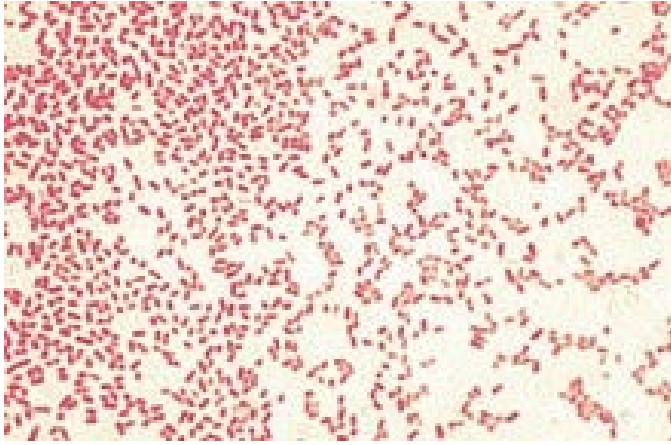


KUVA 2. Grampositiivisen ja gramnegatiivisen soluseinän eroavaisuudet (Humagain 2018)

Bakteerien tunnistaminen ja luokittelu grampositiivisiksi ja -negatiivisiksi selvitetään gramvärjäyksellä. Objekttilasille kiinnitetyn bakteerinäytteen solut värjätään violeteiksi käsittelemällä näyte emäksisellä kristalliviolettiliuoksella ja väri kiinnittyy jodi-kaliumjodidiliuoksella. Kun objektilasi huuhdellaan asetoni -etanoliseoksella, grampositiivisten bakteerien soluseinä pitää kristallivioletin solussa (kuva 3), kun taas gramnegatiivisista väri pääsee huuhtoutumaan pois (kuva 4). Gramnegatiiviset bakteerit saadaan näkyviin värjäämällä näyte lopuksi safraniinilla. Mikroskoopilla tarkasteltaessa grampositiiviset bakteerit näkyvät syvän sinisenä tai violetina, kun gramnegatiiviset bakteerit puolestaan punaisena tai pinkkinä. (Carlson & Koskela 2011; Atlas & Snyder 2015, 322.)



KUVA 3. Grampositiivisen bakteerin gramvärjäysreaktio (Humagain 2018)



KUVA 4. Gramnegatiivisen bakteerin gramvärjäysreaktio (Humagain 2018)

Värjäysreaktioon vaikuttavat soluseinärakenteiden erot ovat olennaisia myös bakteerien tunnistamisen sekä mikrobilääkityksen valinnan kannalta. Grampositiivisten bakteerien soluseinä estää monien lääkeaineiden läpäisyn. (Järvinen, Huovinen & Vaara 2011; Atlas & Snyder 2015, 322.)

3 ENTEROKOKIT

3.1 Esiintyvyys ja ominaisuudet

Enterokokit ovat laajalle levittäytyneitä bakteereja, jotka kuuluvat ihmisen suoliston normaaliin mikrobistoon ja niitä voi löytää muidenkin nisäkkäiden lisäksi maaperästä, kasveista, vedestä, ruuasta, sekä muista eläinlajeista kuten linnuista, matelijoista ja hyönteisistä. Eri enterokokkilajien esiintyvyys näyttää vaihtelevan isännän mukaan, ja siihen vaikuttavat myös isännän ikä, ruokavalio ja muut tekijät, jotka voivat liittyä fysiologisten olosuhteiden muutoksiin, kuten taustalla olevat sairaudet (esim. diabetes, munuaissairaudet tai syöpä) ja aikaisempi mikrobilääkitys. Enterokokit ovat opportunistipatogeenia, jotka aiheuttavat infektion vasta kantajan vastustuskyvyn heikennyttyä tai esimerkiksi kilpailevien bakteerien tuhouduttua mikrobilääkityksen seurauksena. (Martins Teixeira, Carvalho, Facklam & Shewmaker 2015, 405; Rantakokko-Jalava & Anttila 2020d.)

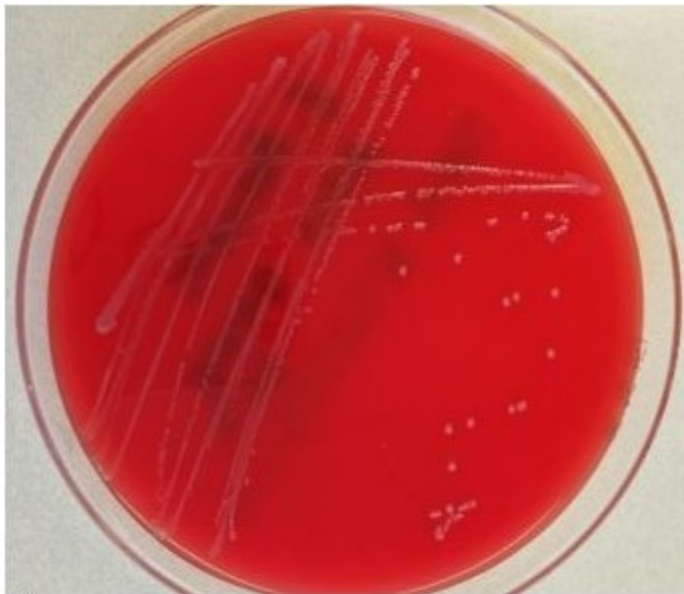
Enterococcus-sukuun kuuluvat bakteerit ovat grampositiivisia, aerobisia ja katalaasinegatiivisia (eräillä grampositiivisilla bakteereilla esiintyvä entsyymi) kokki-bakteereja, jotka esiintyvät yksittäin, pareina tai lyhyissä ketjuissa. Luontaisten ominaisuuksiensa johdosta enterokokit ovat vaatimattomia kasvualustansa suhteen ja voivat kasvaa ankarissakin olosuhteissa. Ne ovat fakultatiivisesti anaerobisia bakteereja, eli vaikka ne ovat aerobisia bakteereja, ne sietävät vähähappisia ja jopa hapettomia olosuhteita sekä selviävät suolaisissa olosuhteissa (6,5 %) sekä korkeassa pH:ssa (9,6). Ne voivat kasvaa niin hypo- kuin hypertonisessa, sekä happamassa ja emäksisessä väliaineessa, aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa. Optimilämpötila niiden kasvuille on 35-37°C mutta ne voivat kasvaa 10-45°C välillä. Näiden ominaisuuksien lisäksi niillä on myös kyky vaihtaa keskenään geneettistä materiaalia, jonka johdosta ne pystyvät mukautumaan erilaisiin uusiin ympäristöihin ja kykenevät kolonisoimaan lukuisia ekologisia lokeroita. (Martins Teixeira ym. 2015, 403, 405; Depardieu & Courvalin 2017, 289; Rantakokko-Jalava & Anttila 2020d.)

Enterokokki-infektioiden diagnostiikassa pääasiällisin menetelmä on bakteeriviljely, ja enterokokit kasvavat hyvin viljeltäessä tavallisille elatusaineelle (kuva 5).

Verimaljalla (kuva 6) 24 tuntia kasvatetun enterokokin pesäkkeet ovat halkaisijaltaan useimmiten 1–2 mm, mutta jotkut variantit voivat muodostaa pienempiäkin pesäkkeitä. (Martins Teixeira ym. 2015, 403.)



KUVA 5. *E. faecalis* -pesäkkeitä kromogeenisella virtsamaljalla. Kuva: Lamminpää, J. & Meurman, O. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020b)



KUVA 6. *E. faecalis* ei-hemolyttisinä pesäkkeinä verimaljalla. Kuva: Lamminpää, J. & Meurman, O. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020b)

Jotkut bakteerilajit tuottavat solunulkoisia entsyymejä, jotka hajottavat, eli hemolysoivat elatusaineen punasoluja. Tämä aiheuttaa elatusaineessa olevien punasolujen osittaisen tai täydellisen tuhoutumisen (kuva 7) ja bakteeripesäkkeiden ympärille muodostuu hemoglobiinin hajoamisen seurauksena väritön alue. (Tankeshwar 2021.)



KUVA 7. Hemolyysin eri tyyppjä (alfa- beeta- ja gamma -hemolyysi) (Tankeshwar 2021)

Noin kolmasosa *E. faecalis*-lajin viljellyistä pesäkkeistä saattaa kasvaa β -hemolyyttisenä (hajottaa punasolut täysin elatusaineella) esimerkiksi hevosenverimaljalla, mutta non-hemolyyttisenä (gamma- (γ), eli ei-hemolyyttinen) lampaanverimaljalla. Osa *E. faecalis*-lajin pesäkkeistä voi kasvaa β -hemolyyttisenä millä tahansa verimaljalla. Muut lajit ovat yleensä joko γ - (ei-hemolyyttinen, non-hemolyyttinen), tai α -hemolyyttisiä (hajottaa punasolut osittain elatusaineella). (Martins Teixeira ym. 2015, 403; Rantakokko-Jalava & Anttila 2020b.)

3.2 Kliininen merkitys

Ihmisen elimistössä enterokokit kuuluvat etupäässä ruoansulatuselimistön mikrobistoon ja niitä pidetään yhtenä runsaimmin suolistoa asuttavista grampositiivisista kokeista. Patogeeneinä ne useimmiten infektoivat virtsateitä ja leikkaushaavoja, palovammoja sekä sappiteitä, mutta vakavimmillaan ne voivat aiheuttaa sydämen sisäkalvon tulehduksen. Enterokokkeja esiintyy yleisesti myös pehmytkudostulehduksissa sekä vatsansisäisissä ja lantionpohjan infektioidissa. Harvinaisempia infektoita ovat aivokalvontulehdus, luutulehdus ja septinen niveltulehdus. Lajeja esiintyy vaihtelevissa suhteissa ihmisen ruoansulatuskanavassa ja vähemmissä määrin mm. suussa ja urogenitaalialueella. Enterokokit osallistuvat

myös ihmisen energia-aineenvaihduntaan. Ne ovat homofermentatiivisia, eli niiden pääasiallinen hiilihydraattisynteesin lopputuote on maitohappo. Kaksi pääasiallisesti ihmisiä infektoivaa lajia ovat *E. faecalis* ja *E. faecium*. Enterokokkeja on tunnistettu 23 lajia, mutta 60 %:ssa tapauksista eristetty laji on *E. faecalis* ja 20 %:ssa *E. faecium*. Muut lajit, muun muassa *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ja *E. durans*, aiheuttavat alle 5 % enterokokki-infektioista. (Teixeira ym. 2015, 405, 413; Reyes, Zervos & John 2017, 811; Rantakokko-Jalava & Anttila 2020a.)

Enterokokit ovat viimeisten vuosikymmenten aikana kehittyneet suhteellisen harmittomana pidetyistä bakteereista lääketieteellisesti tärkeiksi, moniresistenteiksi taudinaiheuttajiksi, joilla on merkittävä vaikutus niin potilaiden sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen, kuin terveydenhuollon kustannuksiin. (Reyes ym. 2017, 811.) Vaikka *E. faecalis* on yleisempi patogeeni, *E. faecium*ista on kehittynyt vallitsevampi sairaalainfektioiden aiheuttajana. Immunosuppressio (immunovasteen heikentäminen), pitkäaikainen kolonisaatiokyky, herkkä leviäminen potilaiden välillä ja kyky muodostaa biokalvoja ovat tehneet enterokokeista merkittävimpiä patogeeneja sairaaloissa, mikä on lisännyt ponnisteluja optimaalisten infektioiden torjuntatoimenpiteiden parantamiseksi. (Reyes ym. 2017, 811.)

4 MIKROBILÄÄKKEET

4.1 Antibiootit

Käsitteenä mikrobilääke tarkoittaa niin luonnosta saatavia mikrobien tuottamia antibiootteja, kuin synteettisesti valmistettuja mikrobeja tuhoavia tai niiden kasvua estäviä yhdisteitä (Huupponen, Vaara & Kantele 2018). Mikrobilääkkeet jaotellaan bakteerilääkkeisiin eli antibiootteihin, viroslääkkeisiin, sienilääkkeisiin sekä parasiittilääkkeisiin. Suomessa oli vuonna 2015 myynnissä 53 eri antibiootia. (Vuento 2020.)

Ensimmäisenä kliinisesti merkittävänä bakteerilääkkeenä pidetään sulfavalmiste Prontosilia (sulfonamidi). Lääkkeen antimikrobinen vaikutus huomattiin vuonna 1932 ja kliiniseen käyttöön se otettiin vuonna 1935. Se tehoi hyvin oman aikansa tappaviin tauteihin ja lääkkeen kehittäjä, saksalainen Gerhardt Domagk, palkittiin vuonna 1939 Nobelin palkinnolla. Esimerkiksi aivokalvontulehduksen aiheuttama kuolleisuus laski Prontosilin käytön myötä 65 %. Prontosil on jäänyt kuitenkin Alexander Flemingin vuonna 1929 löytämän penisilliinin varjoon. (Huovinen & Vaara 2011.)

Mikrobilääkkeiden kehittämistyö lähti kunnolla käyntiin toisen maailmansodan vauhdittamana ja molemmilla, niin sulfalla kuin penisilliinillä, oli oleellinen rooli sodassa. Myös lääketeollisuuden puolella käynnistyi sota, sillä saksalaisten kehittämän sulfan vaikutukset sotilaiden haavainfektioiden hoidossa olivat tunnettuja, joten liittoutuneiden oli kiireesti kehitettävä oma lääke. (Huovinen & Vaara 2011.)

Bakteerilääkkeiden kehitys jatkui ja vuonna 1945 löydettiin ensimmäinen tuberkuloosilääke, streptomysiini. 1940- ja 50-luvuilla löydöstä seurasi useita muitakin, kuten erytromysiini, tetrasykliinit sekä vankomysiini. 1980-luvulla alkoi olla vaikeaa löytää täysin uusia yhdisteitä ja kehitystyö hiipui. Olemassa olevista mikrobilääkkeistä, kuten kefalosporiineista, penisilliinin tapaan beetalaktaameihin kuuluvista bakteerilääkkeistä, on kuitenkin saatu kehitettyä johdannaisia. (Huovinen

& Vaara 2011.) Ne jaetaan ensimmäisen, toisen ja neljännen polven kefalosporiineihin. Polvien edetessä niiden kirjo laajenee. (Vuento 2020.)

Bakteerilääkkeet jaotellaan niiden vaikutustavan mukaan (Huupponen, Vaara, Khawaja & Kantele, 2018). Esimerkiksi kefalosporiinit ja penisilliinit ovat bakteereja tappavia, eli bakterisidisiä antibiootteja, vaikuttaen bakteerin soluseinän rakenteeseen hajottaen sen. Bakteriostaattiset antibiootit kuten doksisykliini ja makrolidi puolestaan estävät bakteerien proteiinisynteesiä ja lisääntymistä vaikuttamalla niiden geeneihin tai aineenvaihduntaan. Edellä mainittujen lisäksi antibiootteja on myös foolihapposynteesiä estäviä, nukleiinihappoaineenvaihduntaan vaikuttavia ja pääasiallisesti virtsatieinfektioissa käytettäviä lääkkeitä, sekä tuberkuloosilääkkeet. (Huupponen ym. 2018; Vuento 2020.)

4.2 Vankomysiini

Amycolatopsis orientalis -bakteerin tuottama vankomysiini on yleisin käytössä olevista glykopeptidiantibiooteista, sekä myös ensimmäinen glykopeptidi, jota käytettiin grampositiivisten bakteerien aiheuttamiin vakaviin infektioihin (Depardieu & Courvalin 2017, 289; Huupponen ym. 2018). Glykopeptidit ovat yksi bakteerin soluseinän rakenteeseen vaikuttavien antibioottien ryhmä, jotka vaikuttavat vain grampositiivisten bakteerien aiheuttamaan infektiin (Huupponen ym. 2018). Vankomysiiniä voidaan käyttää myös allergiatapauksissa penisilliinijohdosten sijasta (Ilmavirta, Hämäläinen, Kokki & Ranta 2020).

Glykopeptidien vaikutusmekanismi perustuu niiden sitoutumiseen bakteerin soluseinän peptidoglykaanin esiasteisiin suurella affiniteetilla, estäen bakteerin soluseinän peptidoglykaanisynteesiä ja solukalvon läpäisevyyttä (Lewis & Bush 2015; Depardieu & Courvalin 2017, 289). Pitkään vankomysiini oli lähes ainoa, sekä kaikista tärkein lääke, joka vaikutti *Enterococcus faeciumin* aiheuttamiin yleisinfektioihin (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c). Vankomysiinin lisäksi on myös toinen glykopeptidilääke, teikoplaniini, mutta sen käyttö on vähäisempää ja sen kirjo muistuttaa paljolti vankomysiiniä. Uudempia lipoglykopeptidejä on kehi-

tetty (oritavansiini, dalbavansiini ja telavansiini), mutta niidenkään kirjo ei merkittävästi eroa vankomysiinistä ja kliiniset kokemukset niiden käytöstä ovat tois-
taiseksi vähäisiä. (Huupponen ym. 2018; Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c.)

Enterokokki-infektion hoidossa vankomysiini infusoidaan laskimoon hitaasti, paikallisen laskimoärsytyksen vähentämiseksi. Liian nopeasti infusoituna antibiootti saattaa myös aktivoida syöttösoluja, joista vapautuu histamiinia sekä muita välittäjäaineita. Tämä voi aiheuttaa punoitusta, kutinaa, hengenahdistusta ja mahdollisesti verenpaineen voimakasta laskua. (Ilmavirta ym. 2020.)

Vankomysiini on munuais- ja sisäkorvatoksinen antibiootti. Se poistuu muuttumattomana munuaisten kautta ja munuaisten vajaatoiminta herkästi aiheuttaa sen kasaantumista. Käytettäessä suurina annoksina tai yhdessä muiden munuaistoksisten lääkkeiden kanssa, tai potilaan munuaisfunktion ollessa alentunut tai suuresti vaihteleva, sen seerumipitoisuutta on seurattava. (EPSHP 2018.) Vankomysiinin käyttö on kuitenkin Suomessa vakiintunutta ja sitä tutkitaan kansainvälisesti enemmän kuin koskaan, sillä antibioottiresistenttien bakteerikantojen yleistyminen lisää sen käyttöä. Oto- eli sisäkorvatoksisuus on nykyaikana vähäisempää lääkkeen ollessa puhtaampaa kuin alkuaikoina. (Ilmavirta ym. 2020.)

5 MIKROBILÄÄKERESISTENSSI

5.1 Resistentit bakteerit

Mikrobilääkeresistenssi voidaan luokitella luontaiseen ja hankittuun resistenssimekanismiin: aiemmin jollekin tietylle mikrobilääkkeelle herkkä bakteerikanta voi muuntua sille resistentiksi. Resistenssimekanismista tärkein perustuu bakteerien ominaisuuteen tuottaa mikrobilääkkeitä tuhoavia entsyymejä. Luontainen resistenssimekanismi voi myös perustua esimerkiksi bakteerin seinämän rakenteeseen, joka estää lääkettä läpäisemästä sitä. (Vaara & Kantele 2018b.)

Hankittu resistenssi voi olla seurausta esimerkiksi bakteerissa tapahtuneesta mutaatiosta tai bakteeriin on voinut siirtyä resistenssiä välittävää DNA:ta (resistenssi- eli R-tekijät) sisältävä konjugatiivinen plasmidi, joka on kromosomista irrallinen, sytoplasmassa sijaitseva DNA-molekyyli. Konjugatiivinen plasmidi voi siirtyä samanlaiseen tai lähisukuiseen bakteeriin ja siirtää geneettisen informaation aiemmin tiettyä antibioottia kohtaan herkkään bakteeriin. (Vaara & Kantele 2018b.)

5.2 Resistentit enterokokit

Enterokokkien luontaista vastustuskykyä useita antibiootteja kohtaan selittää niiden soluseinän rakenne (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c). Esimerkiksi bakteerien soluseinään vaikuttavista antibiooteista useimmiten käytettyjen beetalaktaamiantibioottien (esim. penisilliini) toiminta perustuu beetalaktaamin sitoutumiseen bakteerin soluseinän PBP-proteiineihin (penicillin binding protein eli penisilliiniä sitova proteiini) (Järvinen ym. 2011). Enterokokkien soluseinän PBP-proteiini on poikkeavaa tyyppiä (PBP-5), johon beetalaktaamit eivät pysty sitoutumaan tai sitoutuvat heikosti. Herkimmillekin enterokokeille on onnistuttu kehittämään vain harvoja tehoavia mikrobilääkkeitä, ja bakteerin luontaisen antibioottiresistenssin lisäksi se voi muodostaa hankitun resistenssin lääkeaineita kohtaan mutaation, tai konjugatiivisen transposonin tai plasmidin kuljettaman vieraan geneettisen materiaalin seurauksena. Resistentit enterokokit kykenevät muuntamaan

soluseinänsä PBP-proteiineja sekä tuottamaan niitä lisää ja joskus jopa tuottamaan β -laktamaasia. Myös muita resistenssin kehittämisen keinoja on havaittu. (Depardieu & Courvalin 2017, 289; Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c, 2020e.)

Infektion aiheuttaneen enterokokin lajintunnistus on tärkeää resistenttien kantojen ja tarpeellisen hoidon määrittämisen vuoksi. Tyypillisesti enterokokki-infektioon on käytetty ampisilliinia (penisilliini) ja ampisilliiniresistentin infektion hoitoon vankomysiiniä. Kuitenkin usein esimerkiksi *E. faecalis* on herkkä ampisilliinille, mutta resistentti kinupristiini-dalfopristiinille. Yleensä *E. faecium* on resistentti ampisilliinille, herkkä kinupristiini-dalfopristiinille ja resistentti korkeille vankomysiinipitoisuuksille. (Reyes ym. 2017, 811; EPSHP 2020.)

6 VANKOMYSIINIRESENSSENSI

6.1 VRE

Ensimmäisen kerran suurille vankomysiinimäärille resistenteistä enterokokeista raportoitiin vuonna 1988 (Depardieu & Courvalin 2017, 290). 1990-luvun Yhdysvalloissa vankomysiinille resistentit enterokokit (VRE) alkoivat yleistyä (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c), ja vankomysiiniresistenttien enterokokkien aiheuttamien infektioiden määrä sairaaloissa nousi vuosien 2000 ja 2006 välisenä aikana 9,820 tapauksesta 21,352:een. Vankomysiiniresistenttien *E. faecium*-iso-laattien prosentuaalinen määrä nousi 1980-luvun puolivälin 0 %:sta yli 80 %:iin vuoteen 2007 mennessä. (Depardieu & Courvalin 2017, 290.) Vaikka Euroopassa VRE:tä tavataan vähemmän, viime vuosina VRE-löydösten määrä on kasvanut myös Suomessa. Suomessa vuonna 2017 on raportoitu *E. faecium*in invasiivisista kannoista 0,7 % olleen VRE:tä ja jo vuonna 2018 osuus oli noussut 2,4 %:iin. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c.)

Vankomysiinille resistenttejä enterokokeja esiintyy omina kantoinaan tavallisimmissa ihmisellä esiintyvissä enterokokkilajeissa (*E. faecalis* ja *E. faecium*). Resistenssin syistä tärkeimpinä näillä lajeilla ovat resistenssityypit VanA ja VanB (Ahmed & Baptiste 2018).

Kliinisistä näytteistä on eristetty myös vankomysiiniriippuvaisia kantoja (VDE, vancomycin-dependent enterococcus) (Depardieu & Courvalin, 289). Ensimmäinen tunnettu VDE-tapaus löydettiin virtsanäytteestä vuonna 1992 Amerikassa, josta tehdystä tutkimuksesta julkaistiin tutkimusraportti vuonna 1994 (Fraimon, Jungkind, Lander, Delso & Dean 1994). Samana vuonna on raportoitu myös kahdesta VDE-tapauksesta Yhdistyneessä kuningaskunnassa, kun kahden, eri sairaaloissa hoidossa olleiden potilaiden ulostenäytteistä eristettiin VDE (Woodford, Johnson, Morrison, Hastings, Elliott, Worthington, Stephenson, Chin & Tolley 1944). *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* -lehti julkaisi vuonna 2017 Kuon, Huangin ja Leen tutkimusraportin (2017), jossa he raportoivat vuonna 2015 Taiwanissa virtsanäytteen VRE-seulonnan yhteydessä havaitusta VDE:stä, joka ei kasvanut veri- eikä kolistiini-nalidiksiinihappo-maljalla, mutta kasvoi

chromidID VRE-maljalla (vankomysiiniä sisältävä kromogeeninen elatusaine VRE:n tunnistamiseen). Enterokokkikanta oli resistentti vankomysiinille, mutta myös tarvitsi sitä kasvaakseen. (Kuo, Huan & Lee 2017, 926–927.) Tutkimuksista on raportoitu myös mm. Brasiliassa (Kerbaui, Perugini, Yamauchi & Yamada-Ogatta 2011, 253–257) ja Intiassa (Banerjee & Anupurba 2013, 91–92). Amerikkalaiset tutkijat Mitchell, Mattei ja Alby (2017) karakterisoivat VDE:n genomia ja havaitsivat, että heidän veriviljelypulloista eristämistään kannoista vain anaerobit olivat vankomysiiniriippuvaisia. Tutkimuksensa perusteella he päättelivät, että myös aerobinen kanta oli ollut alkujaan vankomysiiniriippuvainen, mutta muuttunut kasvaessaan aerobisessa viljelypulloissa. (Mitchell, Mattei & Alby 2017.)

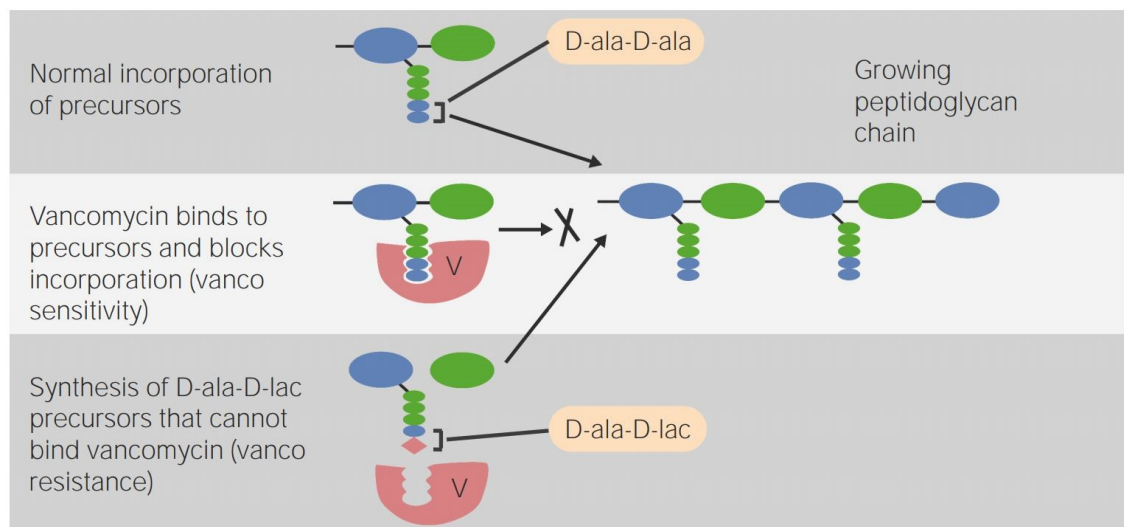
6.2 Van-geenit

Bakteereissa geenit sijaitsevat kromosomissa yleensä yhdessä toimivina joukkoina eli operoneina. Yksi operoni sisältää samassa prosessissa toimivia vierekkäisiä geenejä. (Khan Academy 2021). Enterokokeista on löydetty yhdeksää eri glykopeptidiresistenssityyppiä, jotka vaikuttavat vankomysiinin sitoutumiskohtaan bakteerin soluseinässä. Kahdeksan tyyppiä (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM ja VanN) on hankittuja ja VanC on *E. gallinarum*in ja *E. casseliflavus*in, sekä *E. flavescens*in luontainen ominaisuus. (Lewis & Bush 2015, 1229; Depardieu & Courvalin 2017, 291.)

Koska enterokokit vaihtavat herkästi keskenään geneettistä materiaalia, vanA- ja vanB -geenit liikkuvat enterokokkilajien sekä -kantojen välillä helposti. Verrattuna toisiinsa vanA -geenin aiheuttama vankomysiiniresistenssi on voimakkaampaa, mutta vanB:n välittämää resistenssiä on vaikeampaa havaita. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2020c.) Rantakokko-Jalavan ja Anttilan mukaan (2011) enterokokkisivun *E. casseliflavus* ja *E. gallinarum* omaavat vanC -geenin, jonka vaikutuksesta ne sietävät kohtalaisesti vankomysiiniä, mutta resistenssin siirtymisestä muihin kantoihin ei ole havaintoja (Rantakokko-Jalava & Anttila 2011, 127).

Kliinisesti merkittävimmät operonit ovat VanA ja VanB. Ilmentääkseen resistenssiä kumpikin operoni koodaa kolmen geenin joukkoa; VanA -operoniin kuuluvat geenit vanH, vanA ja vanX, ja operoniin VanB puolestaan geenit vanHB, vanB ja

vanXB. (Lewis & Bush 2015, 1229.) Geenit aiheuttavat modifioitujen peptidoglykaanien esiasteiden synteesiä (Depardieu & Courvalin 2017, 290). Normaalisti enterokokkien peptidoglykaanin esiasteiden pentapeptidiketju päättyy D-alaniini-D-alaniini (D-Ala-D-Ala) -pääteeseen, vankomysiiniresistenttien enterokokkien esiasteiden päätteet ovat erilaiset (kuva 8); muun muassa VanA ja VanB koodaavat terminaalisia D-laktaatti-esiasteita (D-Ala-D-Lac) ja VanC puolestaan terminaalisia D-seriini-esiasteita (D-Ala-D-Ser). (Patel & Richter 2015, 1229; Ahmed & Baptiste 2018.)



KUVA 8. Vankomysiiniresistenssin toimintamekanismi (Lecturio 2021)

VanA on yleisin enterokokeilla tavatuista glykopeptidiresistenssityypeistä. VanA-tyyppin kannoille on ominaista korkea resistenssitaso sekä vankomysiinille että teikoplaniinille. VanA:n geenit koodaavat proteiineja, jotka ovat välttämättömiä resistenssin ilmentämiseksi. VanH on dehydrogenaasi, joka muuttaa pyruvaatin D-laktaatiksi, VanA on ligaasi, joka käyttää D-laktaatin ja D-alaniinin tähteitä syntetisoidakseen depsipeptidin D-Ala-D-Lac, joka liitetään D-Alaniinin sijasta peptidoglykaanin esiasteeseen. VanX on D-Ala-D-Ala-dipeptidaasi (D-alanyyli-D-alaniinidipeptidaasi), joka vähentää normaalien D-Ala-pääteisten peptidoglykaanien esiasteiden määrää hydrolysoimalla endogeenisen/kromosomaalisen D-Ala-D-Ala-ligaasin muodostamaa D-Ala-D-Ala-dipeptidiä. (Depardieu & Courvalin 2017, 292.)

VanA sijaitsee yleensä plasmidin kuljettamassa transposonissa (DNA-jakso) Tn1546 mutta se voi olla myös osa bakteriaalista kromosomia. (Depardieu &

Courvalin 2017, 291–292; Ahmed & Baptiste 2018.) Depardieu ja Courvalin (2017) epäilevät Tn1546:n kaltaisia elementtejä saaneiden plasmidien konjugaalisen siirtymisen olevan todennäköinen syy VanA -resistenssin leviämislle enterokokkien välillä. He mainitsevat myös tutkimusdatasta, jonka mukaan VanA -tyypin osalta resistenssi voi olla alkuaan peräisin glykopeptidiä tuottavista organismeista, tai maaperän organismeista. (Depardieu & Courvalin 2017, 289, 293.)

VanB -tyypille on ominaista vaihteleva resistenssi vain vankomysiinille. Tyypillinen VanB-operoni on geneettisesti samantapainen, kuin vanA ja myös VanB aikaansaa resistenssin tuottamalla D-laktaatti-päätyisiä peptidoglykaanin esiasiaita. VanB sisältää geenit vanHB, vanB ja vanXB, jotka vastaavasti koodaavat dehydrogenaasia, ligaasia ja dipeptidaasia, joilla on korkea sekvenssi-identtisyys (67–76 %) VanA:n geenien kanssa. Spesifisten nukleotidisekvenssien perusteella VanB -operonista on erotettu kolme alatyyppeä, vanB1, vanB2 ja vanB3, mutta niillä ei ole havaittu olevan vaikutusta resistenssin voimakkuuteen. (Depardieu & Courvalin 2017, 293.)

VanB-resistenssialleelien siirtyminen tapahtuu transposonien, kuten Tn1547, Tn1549 ja Tn5382 kautta. (Ahmed & Baptiste 2018.) VanB-geeniklustereita kuljettavat suuret konjugatiiviset elementit, jotka siirtyvät kromosomista toiseen. (Depardieu & Courvalin 2017, 295.) Konjugatiivinen vanB-transposoni (Tn1549) on yleinen VanB-tyypin enterokokkien keskuudessa ja se on pääasiassa kromosomaalinen transposoni, jota harvoin esiintyy plasmideissa. (Ahmed & Baptiste 2018.) VanB-operoni voi sijaita myös plasmideissa. Depardieun ja Courvalinin mukaan suuri osa VanB-tyypin resistenssin leviämisestä näyttää johtuvan Tn916:n kaltaisten konjugatiivisten transposonien kuljettamien vanB2-klustereiden leviämisestä. VanB1 yhdistetään transposoniin Tn1547. (Depardieu & Courvalin 2017, 295.)

VanC eroaa geneettisesti VanA ja VanB -operoneista. VanC-resistenssi perustuu terminaaliseen D-Ala-D-Ser:iin päättyvien peptidoglykaanien esiasteiden synteesiin. VanC-resistenssin tiedetään olevan luontaisesti enterokokkilajeissa *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ja *E. flavescens*. VanC-geeneistä tunnetaan kolme alatyyppeä, vanC-1 (*E. gallinarum*illa), vanC-2 (*E. casseliflavus*ksella) ja vanC-3 (*E.*

flavescensilla). Joskus vanC:n alatyyppejä nähdään myös näiden enterokokkila-
jien merkkiaineina. (Depardieu & Courvalin 2017, 296; Ahmed & Baptiste 2018.)

7 ANALYTIikka

7.1 Bakteerin tunnistus

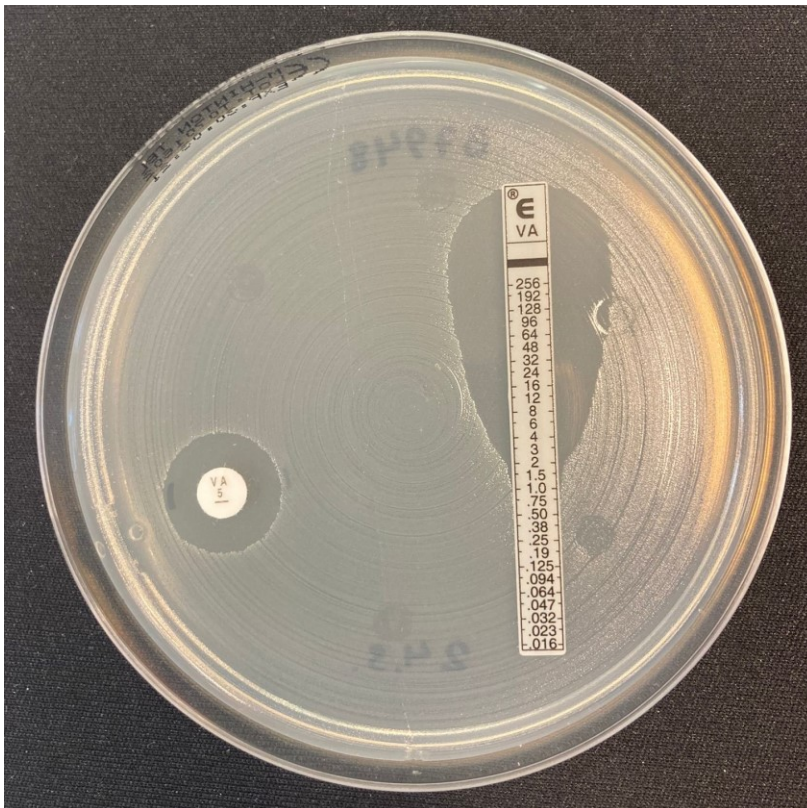
Jos viljellyllä maljalla kasvaa enterokokki, suoritetaan jatkotutkimuksia mahdollisen vankomysiiniresistentin enterokokkikannan osoittamiseksi. Useimmiten nämä tutkimukset tehdään ulostenäytteestä. Bakteerin kasvettua noin vuorokauden ajan, tehdään sille lajityypitys MALDI-TOF-laitteella. (EPSHP 2020.)

MALDI-TOF (MALDI = Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization, TOF = Time-Of-Flight) on massaspektrometrinen menetelmä, jolla saadaan tunnistettua infektioita aiheuttavia bakteri-, virus- sekä sienilajeja. Lasersäde aiheuttaa matriisiin sidotun näytteen hajoamisen ioneiksi, jotka lentävät sähkökentässä kiihtyen massansa ja sähkövarauksensa mukaan. Laite laskee molekyylien tarkan massan niiden lentoajan perusteella ja määrittää näytteelle nimen suureen tietokantaan talletettujen, tunnettujen ionien massojen perusteella. (Lavigne, Espinal, Dunyach-Remy, Messad, Pantel & Sotto 2012.)

7.2 Herkkyysmääritykset

Lajityypityksen jälkeen tehdään herkkyysmääritys, jotta saadaan selville, onko bakteerin herkkyys vankomysiiniä kohtaan alentunut. (EPSHP 2020). Herkkyysmääritys suoritetaan kiekkodiffuusiomenetelmänä erilliselle herkkyysmääritysmaljalle. Maljan bakteerikasvun tulee olla jatkuvaa ja tasaista, eikä siinä saa kasvaa erillisiä pesäkkeitä. Viljellylle maljalle asetetaan antibioottia sisältäviä kiekkoja annostelijan avulla, ja bakteerien kasvaessa myös lääkeaineet leviävät kiekkoista elatusaineeseen. Herkkyysmääritysten tulkinta tehdään mittaamalla kiekon ympärille muodostuvan estorengaan (kuva 9) kokoa. Lääkeaineelle herkät bakteerit muodostavat estorengaan (mitä herkempi bakteri, sitä suurempi estorengas), ja lääkkeelle resistentit bakteerit eivät muodosta estorengasta lainkaan. (Bayot & Bragg, 2021.)

Herkkyysmäärittäminen voidaan tehdä myös E-liuskoilla (kuva 9), joilla voidaan määrittää lääkaineherkkyyden MIC-arvo (minimum inhibitory concentration, pienin mahdollinen lääkainemäärä, johon bakteeri reagoi) määritettävälle bakteerille. Liuskaan on valmiiksi imeytetty lääkaine, jonka pitoisuus nousee mitta-asteikon lukemien mukaan, ja se asetetaan elatusaineelle viljellyn bakteerikannan päälle. Bakteerin kasvettua tulos luetaan mitta-asteikolta estovyöhykkeen ja estopisteen kohdalta. VAN-E-liuskan mitta-asteikko ilmoitetaan välillä 0,008 μ g/ml ja 256 μ g/ml. (Rengaraj, Mariappan & Kamalanadhan, 2016.)



KUVA 9. Estorengas VA-kiekon ja VAN-E-liuskan ympärillä (Latvamäki 2021)

Suomessa noudatetaan Eurooppalaisen mikrobilääkkeiden herkkyysmäärittämissuositusten (EUCAST) suosituksia mikrobilääkeresistenssin määrittämisessä käytettävistä herkkyysmäärittämismenetelmistä ja tulkintataulukoista. Herkkyystulkintojen (SIR) määrittelyt jaetaan kolmeen luokkaan (taulukko 1): S (susceptible, lääkkeelle herkkä), I (intermediate, herkkyydeltään alentunut, mutta terapeuttinen hoitovaste on mahdollinen, jos lääkkeen pitoisuutta voidaan nostaa) ja R (resistant, resistentti kyseiselle lääkaineelle, eli lääke ei tehoa kyseiseen bakteerikantaan). (Rengaraj ym. 2016; Rantakokko-Jalava & Hakanen 2020.)

TAULUKKO 1. Herkkyysmäärittysten standardit (Weinstein 2020; Eucast 2020)

	Kiekkomääritys mm	MIC-arvo
S = susceptible	≥ 12 mm	≤ 4µg/ml
I = intermediate		5-31µg/ml
R = resistant	≤ 11 mm	≥ 32µg/ml

7.3 PCR

Kun herkkyysmäärittämisellä saadaan osoitettua resistenttejä enterokokkikantoja, niistä määritetään resistenssigeenit vanA ja vanB käyttäen PCR-menetelmää. (EPSHP 2020). PCR (polymeraasiketjureaktio) on menetelmä, jossa DNA-ketjua monistetaan miljooniksi kopioiksi, jotta geenin kvantitatiivinen määrittäminen on mahdollista (Behlke ym. 2019).

PCR-menetelmän ensimmäiset julkaistut tutkimukset ovat vuodelta 1985 ja se on ollut siitä asti laajasti käytössä monissa tutkimuksissa kansainvälisesti. PCR on kuitenkin menetelmänä hyvin kontaminaatioherkkä. (Behlke ym. 2019.)

7.3.1 Real-Time qPCR

Ennen PCR-testausta tehtävässä näytteen esivalmistelussa näyte lisätään usein testikaseteissa valmiina olevaan puskuriliuokseen. Entsyymispesifisen puskuriliuoksen tehtävänä on saada aikaan DNA:n monistumiselle sopivat olosuhteet sekä stabiloida polymeraasientsyymin toimintaa. Polymeraasientsyyminä yksi yleisimmin käytettävistä on Taq eli *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty entsyyymi. Tämän lisäksi tarkkuutensa vuoksi laajasti käytössä on myös Pfu eli *Pyrococcus furiosus* -bakteerientsyyymi (NCBI 2017). Molemmilla näistä entsyyymeistä on PCR:ään sopivia ominaisuuksia; ne voivat osallistua uusien DNA-juosteiden tekemiseen ja kestävät hyvin korkeitakin lämpötiloja. Polymeraasientsyymin tehtävänä on vastinjuosteen rakentaminen yksittäisistä dNTP-molekyyleistä. (Behlke ym. 2019; Park 2011.)

PCR:ssä on kolme vaihetta: denaturaatiovaihe, alukkeiden kiinnittymisvaihe ja pidentymisvaihe eli ekstensiovaihe. Denaturaatiovaiheessa templaatti-DNA kuumennetaan 93–96°C, jolloin DNA denaturoituu ja vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Tämän seurauksena saadaan yksijuosteista DNA:ta, johon oligonukleotidialukkeet voivat sitoutua. Oligonukleotidialukkeet ovat synteettisiä DNA-jaksoja, jotka tunnistavat monistettavan templaatti-DNA:n alueen päät ja määrittävät monistettavan kohdealueen sitoutumalla komplementaarisiiin juosteisiin tällä alueella. Denaturaatioon vaikuttavat liuoksen tyyppi, templaatin kompleksisuus, suolapitoisuus ja pH. (Behlke ym. 2019; Park 2011.)

Toisessa vaiheessa lämpötila lasketaan noin 40–72°C ja oligonukleotidialukkeet kiinnittyvät tässä vaiheessa yksisäikeiseen DNA:han emäsparisäännön mukaisesti (G-C, T-A). (Behlke ym. 2019; Park 2011.)

Kolmas vaihe eli ekstensiovaihe tapahtuu useimmiten noin 72°C asteessa. Tässä vaiheessa DNA-polymeraasi luo yhdessä ionikonsentraatioliuoksena käytetyn magnesiumkloridiliuoksen kanssa vastinjuosteet yksijuosteiselle DNA:lle liittämällä siihen deoksinukleotideja (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) aloittaen 3'-päädystä ja edeten 5'-päättyyn. (Behlke ym. 2019; Park 2011.)

Kolmannen vaiheen reaktion loputtua reaktioseos jäädytetään huoneenlämpöiseksi. Reaktioiden jälkeisen DNA-molekyylien muodostumisen valmistuttua reaktio aloitetaan jälleen alusta, ja näitä syklejä toistetaan useampia aloittaen ensimmäisestä vaiheesta. Uusissa sykleissä myös juuri syntetisoidut DNA-molekyylit toimivat templaatteina. DNA:n määrä kaksinkertaistuu jokaisessa sykissä, ja syklejä suoritetaan yhteensä noin 25–45. (Behlke ym. 2019.)

Perinteisessä PCR-menetelmässä detektio tapahtuu vasta kolmannen vaiheen lopussa monistuksen loputtua (Park 2011). Real-Time qPCR (reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR) on suoraan kehittynyt perinteisestä PCR:stä ja perustuu samaan tekniikkaan. Reaaliaikaisessa PCR:ssä monistumista ja reaktion edistymistä voidaan kuitenkin seurata reaaliajassa fluoresenssin avulla. Reaaliaikaisen PCR:n on tutkittu olevan ainakin 100-kertaisesti herkempi kuin ns. perinteinen PCR, ja tulosten valmistuminen vie vain joitain kymmeniä minuutteja. (Park 2011.) Reaaliaikaisen PCR:n jatkuvan mittaamisen avulla reaktion tuloskäyriä on

mahdollista käyttää mittaamaan alkuperäisen näytteen DNA:n eli templaatti-DNA:n molekyylien määrää. Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytön kannalta positiivisia tekijöitä ovat myös muun muassa suljetut ”testikasetit” (vähentää kontaminaattioriskiä), nopeat ja helpot analyysit, todella laajat määrien mittaamisen asteikot ja selkeästi suurempi luotettavuus ja herkkyys. Kvantitatiivinen, reaaliaikainen PCR on myös melko edullinen ja luotettava menetelmä. (Behlke ym. 2019.)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä tuotteen detektion seuraaminen läpi jokaisen vaiheen on mahdollista reaktioon lisättävien fluoresoivien molekyylien ansiosta. Molekyylit reagoivat DNA:n määrän lisääntymiseen fluoresoivalla signaalilla, ja fluoresenssin vahvuus kasvaa suhteessa kasvavaan DNA:n määrään. Syklejä voidaan tarvita useampia tarvittavan tason tavoittamiseksi, jotta fluoresenssisignaalia voidaan mitata. (Behlke ym. 2019; Cepheid 2018.)

Fluoresoivat merkkiaineet jaetaan kahteen kategoriaan, epäspesifiin ja templaatti-spesifiin merkkiaineisiin. Epäspesifiin kuuluvat fluoresoivat väriaineet, joista yleisimmin käytetty väriaine on SYBR Green I. Spesifiin kuuluvat hydrolyysiin perustuvat koettimet, esimerkiksi TaqMan-koetin. (Behlke ym. 2019.)

7.3.2 GeneXpert®

Työssä PCR-testauksessa käytetty GeneXpert® on laite, joka käyttää tekniikkaan reaaliaikaista PCR:ää. Reaaliaikaiselle PCR:lle tyypillisesti se suorittaa ajon aikana jatkuvasti fluoresenssisignaalin mittaamista läpi kaikkien vaiheiden ja kerää fluoresenssin lähettämää dataa. Laite ajaa näytteet noin tunnin sisällä. (Cepheid 2018.)

GeneXpert® käyttää DNA-polymeraasientsyyminä Taq-polymeraasia ja ekstensiovaiheen ionikonsentraationa magnesiumkloridiliuosta. Näytteiden ajoon on käytössä valmistajan omat kertakäyttöiset näytekasetit. Fluoresenssikoettimena laitteella on käytettävissä sekä sekvenssispesifisiä, fluoresenssimerkittyjä TaqMan-koettimia että värileimattuja, spesifisyydeltään suuria Molecular Beacon-koettimia. (Cepheid 2013.)

GeneXpert® ilmoittaa testin tulokset CT- eli cycle threshold –arvona (liite 1), joka tarkoittaa PCR:n monistusreaktion kierrosten määrää testauksen aikana. Tästä tuloksesta selkeästi positiiviseksi vanA/vanB-määrityksessä on luettavissa tulokset, joissa CT-arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin 25. Tästä suuremmat kierrosten määrät vähentävät tuloksen luotettavuutta. Kuitenkin selkeät negatiiviset tulokset ilmoitetaan tuloksella 0, jolloin PCR-reaktio ei ole edes käynnistynyt kyseisen geenin suhteen. (Zhou ym. 2014; Lemmer ym. 2017.)

8 VERIFIOINTI

Tutkimusmenetelmien verifiointilla varmistetaan, että laboratorio pystyy täyttämään testimenetelmän suorituskykyvaatimukset ja että verifioitavalla menetelmällä saadaan vertailukelpoisia tuloksia verrattuna vakiomenetelmällä saataviin tuloksiin. Verifiointi voidaan suorittaa esimerkiksi silloin, kun jo toisessa laboratoriossa käytössä oleva ja validoitu menetelmä otetaan käyttöön. Yleisesti verifiointiin kuuluu menetelmän toistettavuuden, uusittavuuden, herkkyuden, tarkkuuden ja näytematriisin vaikutuksen määrittely. Käytettävät testit ovat usein kaupallisia ja validoitu jo valmistajan toimesta. (Hägg 2016, 7–8, 43.) Verifiointi on suoritettava ennen kuin menetelmää voidaan käyttää rutiinidiagnostiikkaan (Food and Drug Administration 2020).

Analyyttinen herkkyys eli havaitsemisraja (LOD, limit of detection) kuvaa analyysin, esimerkiksi mikrobien, pienintä pitoisuutta näytteessä, jonka verifioitava laite luotettavasti havaitsee. Analyttinen tarkkuus ilmaisee menetelmän kykyä havaita ja mitata ainoastaan kohteena olevaa analyyttiä. Tarkkuuden määrittämiseen voidaan käyttää tunnettujen näytteiden sarjaa, jolloin laitteen antamia tuloksia verrataan tunnettuihin tuloksiin. (Wolk 2017.)

Diagnostinen herkkyys (sensitiivisyys) kuvaa, kuinka todennäköisesti laite tunnistaa positiivisen näytteen. Diagnostinen tarkkuus (spesifisyys) puolestaan sen todennäköisyyttä, että laite tunnistaa negatiivisen näytteen. (Duodecim 2016.)

Verifiointin toistettavuus kertoo yksittäisten näytteiden rinnakkaismääritysten tulosten yhteneväsyydestä, eli kuinka paikkansapitävä laitteen antama tulos on, kun se määrittää saman näytteen useaan kertaan. Keskihajonta (varianssin neliöjuuri), lasketaan toistettavuustulosten perusteella. Keskihajonta kertoo tulosten keskimääräisen poikkeaman keskiarvosta ja mitä suurempi keskihajonta on, sitä enemmän esimerkiksi toistettavuusnäytteiden tuloksissa on vaihtelua. Keskihajonta lasketaan yleensä tilastoaineistojen analysointia varten suunniteltua tilasto-ohjelmaa apuna käyttäen. (Wolk 2017.)

Tässä tutkimuksessa verifiointi on rajattu menetelmän herkkyuden, tarkkuuden ja toistettavuuden mittaamiseen. Näiden muuttujien tuloksia verrataan Seinäjoen klinisen mikrobiologian yksikössä jo käytössä olevien menetelmien tuloksiin. Luotettavuutta on mitattu vertaamalla verifioitavan GeneXpert® -analysaattorin tuloksia käytössä olevaan VRE-kantojen herkkyysmääritysten tuloksiin.

9 TUTKIMUKSEN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Opinnäytetyön tavoitteena on toteuttaa vankomysiinille resistenttien geenien osoittamiseen soveltuvan geenitestin verifiointi Seinäjoen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriolle. Mikrobiologialla ei ole vielä käytössä verifioitua geenitestiä.

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, vastaavatko verifioitavan geenitestin tulokset, eli sen tunnistamat vanA- ja vanB-geenit jo verifioidulla menetelmällä saatuja tuloksia.

Opinnäytetyön tutkimusongelmat ovat

- Mikä on verifioitavan geenitestin herkkyys tunnistaa vanA- ja vanB -geenit?
- Mikä on verifioitavan geenitestin tarkkuus tunnistaa vanA- ja vanB -geenit?
- Onko menetelmä toistettavuudeltaan luotettava?
- Täyttääkö verifioitava menetelmä kriteerit, joiden perusteella se voidaan ottaa käyttöön?

10 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tutkimusmenetelmänä opinnäytetyössä on käytetty kvantitatiivista eli määrällistä menetelmää. Kvantitatiivinen tutkimus vastaa kysymyksiin miksi, missä ja paljonko. Kvantitatiiviset tutkimusmenetelmät painottavat objektiivisia mittauksia ja tilastollista, matemaattista tai numeerista analysointia, ja usein tutkimuksessa selvitetään myös eri asioiden välisiä riippuvuuksia tai muutoksia, joita ilmiöissä on tapahtunut. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa kartoitetaan yleensä olemassa olevaa tilannetta, mutta asioiden syitä ei pystytä välttämättä riittävästi selvittämään. (Heikkilä 2014; LeTourneau University 2021)

Kvantitatiiviset tutkimusmenetelmät painottavat objektiivisia mittauksia ja tilastollista, matemaattista tai numeerista analysointia, jonka data on kerätty tyypillisesti muun muassa erilaisilla kyselyillä, haastatteluilla, systemaattisella havainnoinnilla ja kokeellisilla tutkimuksilla. Tutkimuksen vaiheisiin kuuluvat tutkimusongelman määrittäminen, aikaisempaan kirjallisuuteen perehtyminen, tutkimussuunnitelman laatiminen, tiedonkeruutavan suunnittelu ja tiedonkeruuvälineen rakentaminen, tietojen kerääminen, tietojen analysointi sekä tulosten raportointi. (Heikkilä 2014.) Kirjallinen loppuraportti koostuu johdannosta, kirjallisuudesta ja teoriasta, menetelmistä, tuloksista ja pohdinnasta (LeTourneau University 2021).

Tutkimuksessa on mitattu GeneXpertin® herkkyyttä, tarkkuutta ja toistettavuutta, ja sen tuloksia on käsitelty taulukoin ja lisäksi toistettavuuksista on laskettu keskiarvo ja keskihajonta, ja niistä variaatiokerroin (CV%). Numeerinen analysointi on toteutettu käyttäen Excel -laskelmataulukko-ohjelmistoa.

Keskihajonta lasketaan hyödyntäen toistettavuusnäytteiden tuloksia niiden keskiarvoon. Keskihajonnan voi laskea myös ilman laskinohjelmiston hyödyntämistä (kaava 1), jolloin ensin lasketaan aineiston (toistettavuuden rinnakkaistulosten) arvojen poikkeamat suhteessa keskiarvoon, eli varianssi. Varianssi saadaan laskemalla arvojen ja keskiarvon erotuksen neliö (toinen potenssi) kaavalla

$$s^2 = \frac{1}{n}((x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2), \quad (1)$$

jossa s^2 merkitsee varianssia, n arvojen määrää, x_i on yksittäinen arvo ja \bar{x} keskiarvo. (Tilastokeskus n.d.; Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja n.d.)

Keskihajonta on varianssin neliöjuuri, jota yleensä käytetään ilmoitettavana hajontalukuna. Keskihajonnan laskemiseksi varianssin arvo, eli arvojen ja keskiarvon erotuksen neliöstä otetaan neliöjuuri. Keskihajonnan yksikkö on sama, kuin laskennassa käytetyn arvon yksikkö. Jos toistettavuuden kaikki arvot ovat samoja, keskihajonnan arvo on nolla. (Tilastokeskus n.d.) Koko perusjoukon keskihajonta voidaan laskea erilaisilla kaavoilla (kaavat 2 ja 3):

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n}((x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2)}, \quad (2)$$

tai vaihtoehtoisesti

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}, \quad (3)$$

joissa σ merkitsee keskihajontaa, n arvojen määrää, x_i on yksittäinen arvo \bar{x} keskiarvo ja \sum (sigma) yhteenlaskua. (Tilastokeskus n.d.; Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja n.d.)

Variaatiokerroin suhteuttaa keskihajonnan ja aineiston keskiarvon, eli määrittää arvojen suhteellisen hajonnan poistamalla keskiarvon vaikutuksen keskihajontaan. Variaatiokerroin ilmoitetaan prosentteina (CV%). CV% lasketaan kaavasta (4)

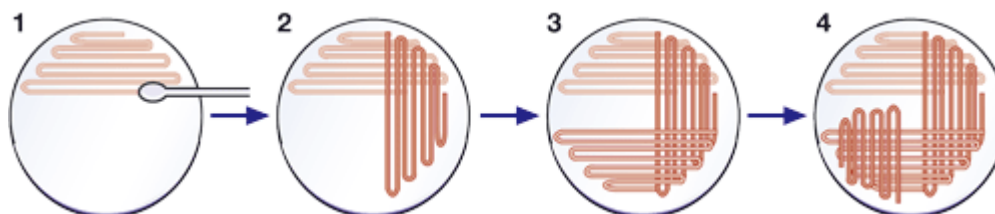
$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} * 100, \quad (4)$$

jossa CV% merkitsee variaatiokerrointa, s arvojen keskihajontaa ja \bar{x} keskiarvoa. (Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja n.d.)

11 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

VRE-geenitestin verifiointityö toteutettiin käytännössä klinisen mikrobiologian laboratoriossa. Verifiointiin sisällytettiin alun perin 40 näytettä, joista 20 valmiiksi VRE-geenien suhteen positiiviseksi testattua oli saatu Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokselta (THL) ja 20 negatiiviseksi testattua mikrobiologian omista näytteistä. Näytteistä kuitenkin karsittiin kaksi negatiivista näytettä pois jo ensimmäisen hajotusviljelyn jälkeen näytteiden huonolaatuisuuden vuoksi, jolloin negatiivisia näytteitä jäi lopulliseen työhön vain 18. Jokaista näytettä oli valmiiksi pakastettuna 50µl ja näytteet sekoitettiin huolellisesti ennen viljelyä.

Työ aloitettiin ensimmäisenä päivänä sekä negatiivisten että positiivisten näytteiden kohdalla lampaanverimaljoille suoritettuna hajotusviljelynä (kuva 10). Näytettä siirrettiin viljelysilmukalla yksi mikrolitra verimaljalle, jossa se viljelysauvan avulla hajotettiin koko maljalle. Viljellyt maljat siirrettiin yön yli kasvamaan hiilidioksidikaappiin.



KUVA 10. Kaaviokuva hajotusviljelytekniikasta (Carlson & Koskela 2011)

Seuraavana päivänä jokaiselle näytteelle tehtiin herkkyysmääritys Müller-Hinton-maljoille sekä PCR-testaus GeneXpertillä®. Herkkyysmääritystä varten tehtiin 0.5 McFarlandin vahvuinen suspensio, johon sekoitettiin viljelysauvalla yksittäisiä pesäkkeitä 0,9% NaCl -putkeen. Liuos sekoitettiin huolellisesti ja näytettä levitettiin dreijaamalla MH-maljalle pumpulitikun avulla. Jokaiseen herkkyysmääritysmaljaan kiinnitettiin VAN-kiekko sekä VAN-E-liuska ja maljat siirrettiin yöksi lämpökaappiin.

GeneXpertin® PCR-määritykseen käytettiin samaa suolaliuosta kuin herkkyysmäärityksiin, ja nämä tehtiin samalla kertaa. PCR-määritykseen käytettiin GeneXpert®-laitteen omia Cepheidin-näytetikkuja, valmiita kaupallisia reagensseja

sekä puskuriliuosta sisältävää testikasettia. GeneXpertin® työohjeiden (liite 2) mukaisesti näytetikkua sekoiteltiin suspensioliuoksessa ja katkaistiin sen jälkeen reagenssipulloon. Lisätyn näytetikun pään sisältävän reagenssipullon sekoittamisen jälkeen pipetoitiin kaikki reagenssipullon näytemateriaali testikasettiin. Testikasetti asetettiin yhteen GeneXpert®-laitteen moduuleista, jolloin kone suorittaa itse PCR-määrittelyn ja antaa tuloksen negatiivisena tai positiivisena sekä vanA-että vanB- geenin osalta.

Tästä seuraavana päivänä suoritettiin herkkyysmäärittelytulosten tulkinta mittaamalla estorenkaiden kokoa sekä Van-E -liuskojen MIC-arvoa. Herkkyysmäärittelytulosten ja GeneXpertin® tuloksia verrattiin jo tässäkin vaiheessa toisiinsa ja tarkistettiin, että tulokset täsmäsivät.

Kaikista positiivisista näytteistä tehtiin vielä puhtasviljelyt lampaanverimaljoille ja siirrettiin hiilidioksidikaappiin yöksi. Näistä positiivisten näytteiden puhtasviljelyistä suoritettiin seuraavana päivänä vielä lajityypitys massaspektrometrisesti.

Lisäksi GeneXpertin® menetelmän toistettavuutta mitattiin tekemällä kuudesta näytteestä ajot kolmeen kertaan. Näistä näytteistä kahdesta oli tehty jo aikaisempina päivinä uudet, vertailevat PCR-ajot herkkyysmäärittelymaljojen epäselvän tuloksen vuoksi, ja näitä uudelleen tehtyjä testauksia käytettiin myös toistettavuuden mittaamisessa. Näiden kahden näytteen kolmansien ajojen lisäksi neljästä näytteestä tehtiin vielä kaksi uutta lisäajoa PCR-laitteella. Työn etenemisen yhteenveto on tehty erikseen taulukkoon 2.

TAULUKKO 2. Opinnäytetyön eteneminen.

1. päivä	Hajotusviljely lampaanverimaljoille pakastetuista näytteistä Viljellyt näytteet yöksi hiilidioksidikaappiin
2. päivä	Viljellyistä kannoista PCR-testaus GeneXpert®: llä Viljellyistä kannoista herkkyysmääritys Müller-Hinton-maljoille Herkkyysmääritysmaljat yöksi lämpökaappiin
3. päivä	Herkkyysmääritysten tulosten tulkinta PCR:n ja herkkyysmäärityksen tulosten vertailu Viljellyistä positiivisista kannoista uudet puhtasviljelyt Puhtasviljelymaljat yöksi hiilidioksidikaappiin
4. päivä	Herkkyysmääritysten 2 vuorokauden muutosten tulkinta Puhtasviljelyistä lajimääritys MALDI-TOF-laitteella Toistettavuuden testaaminen GeneXpert®: llä (3 näytettä)
5. päivä	Toistettavuuden testaaminen GeneXpert®: llä (3 näytettä)

12 TUTKIMUKSEN TULOKSET

Opinnäytetyöhön valituista näytteistä oli tiedossa ja eroteltuina jo etukäteen tunnetut positiiviset THL:n näytteet sekä Seinäjoen keskussairaalan omista potilasnäytteistä kerätyt negatiiviset kontrollinäytteet. Kaikki näytteet olivat enterokokeja.

Lopullisissa tuloksissa mukana oli 18 negatiivista näytettä sekä 20 positiivista näytettä. Tuloksissa negatiiviset, mikrobiologian omista potilasnäytteistä saadut näytteet on nimetty B-alkuisina numeroina (liite 3), ja positiiviset THL:n näytteet juoksevina numeroina 1-20 (liite 4). Negatiivisista näytteistä 16 näytettä olivat selkeästi negatiivisia, ja herkkyysmäärityksessä Van-kiekon ympäriltä mitattava millimetriarvo oli pääosin välillä 12,2–18,9 ja MIC-arvo välillä 0,5–2,0. Näiden lisäksi yhdellä maljalla esiintyi vielä yksittäisinä pesäkkeinä lisäkasvua 2 vuorokauden jälkeen, jonka johdosta voisi olettaa, että maljalla oleva viljely saattoi olla kontaminoitunut jossain vaiheessa. Muut herkkyysmääritysmaljat olivat muuttumattomia 2 vuorokauden uusintatulokinnassa, eikä niillä ollut kasvanut lisäpesäkkeitä.

Kaikista mikrobiologian yksikössä aikaisemmin negatiivisiksi osoitetuista kannoista saatiin negatiiviset tulokset myös GeneXpert®: llä. Tämä osoittaa menetelmän olevan tarkkuudeltaan hyvä. Negatiivisten näytteiden joukossa oli myös kaksi näytettä, joissa kiekon millimetriarvo oli 0 ja MIC-arvo 6,0 ja 3,0. GeneXpert®: llä testattaessa molemmat olivat kuitenkin negatiivisia. Näistä kahdesta näytteestä tehtiin vielä lajityypitys MALDI-TOF-laitteella varmistukseksi, ja tässä lajityypityksessä näiden näytteiden lajeiksi paljastui *E. gallinarum* ja *E. casseliflavus*. Nämä lajit kuuluvat vanC-geenityyppeihin, minkä takia ne eivät näyttäytyneet positiivisina GeneXpert®: in vanA- ja vanB-geenien testauksessa.

Kaikki THL:n positiivisiksi ilmoittamat kannat olivat myös GeneXpert®: llä testattaessa positiivisia, mikä viittaa tutkittavan menetelmän herkkyyteen sen osoitettua myös geenien osalta tulokset yhteneviksi. Suurin osa näytteistä osoittautui MALDI-TOF:n lajityypityksessä *Enterococcus faecium* -lajiksi, ja kaksi näytettä oli lajiltaan *Enterococcus faecalis*. Positiivisista näytteistä 10 oli GeneXpert®: llä tes-

tattaessa vanA-positiivisia ja 8 vanB-positiivisia. Kahdessa näytteistä GeneXpert® antoi tulokseksi sekä vanA- että vanB-positiivisen, ja näistä toisessa toistettavuuksia ajettaessa tulos oli kahdella muulla kerralla kuitenkin vanB-positiivinen. Positiivisten näytteiden herkkyysmäärityksissä tulos vaihteli välillä 06 ja 12,1 mm, kun taas MIC-arvon tulokset vaihtelivat välillä 6 µg/ml ja yli 256 µg/ml. Tulos 06 tarkoittaa nollatulosta eikä estorengasta muodostu, eikä tämä tulos kuvaa millimetrimäärää. Herkkyysmääritysten numeeriset tulokset eivät korreloineet GeneXpert®:in CT-arvojen tulosten kanssa, vaan GeneXpert®:llä kaikki tulokset olivat hyvin samaa luokkaa keskenään herkkyysmäärityksen eroista riippumatta. GeneXpert®:in positiiviset tulokset olivat luotettavia, sillä samojen näytteiden tulokset olivat positiivisia myös referenssilaboratorion (THL) määritysten mukaan. CT-arvo oli lähes kaikissa näytteissä selkeästi positiivinen.

GeneXpert®:in ajon toistettavuuksia (taulukko 3) testattaessa viisi kuudesta näytteestä oli tuloksiltaan samaa jokaisessa toistossa, mutta yhdessä näytteessä yksi toisto antoi eri tuloksen kuin muut, ja siinä sekä vanA että vanB olivat positiivisia. Tämän näytteen kahdessa muussa ajossa tulokset kuitenkin täsmäsivät keskenään.

Toistettavuuksista laskettiin mikrobiologian yksikön pyynnöstä vielä keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin Excelin avulla. Keskiarvon ja keskihajonnan avulla saatiin laskettua jokaiselle toistolle variaatiokerroin, joka kertoo prosentteina toistettavuuksien tulosten suhteellisen hajonnan ilman keskiarvon vaikutusta. EPSHP:n käytäntönä on, että variaatiokertoimen olisi hyvä olla alle 10 %. Tuloksissa variaatiokerroin vaihteli välillä 0,35 % ja 15,73 %. Tutkimuksessa kahden toistettavan näytteen variaatiokerroin ylitti 10 % tavoitearajan, mutta tavoitearaja on suuntaa antava eikä kerro koko toistettavuuden onnistumisesta.

TAULUKKO 3. Toistettavuuksien keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin.

Toistettavuudet	Mittaustulos	Keskiarvo	Keskihajonta	CV %
Näyte 1	1: 18,0 2: 18,6 3: 18,0	18,2	0,35	1,92 %
Näyte 3	1: 17,9 2: 17,8 3: 17,9	17,8	0,06	0,35 %
Näyte 4	1: 16,7 2: 17,3 3: 19,1	17,7	1,25	7,06 %
Näyte 5	1: 16,2 2: 21,4 3: 20,1	19,2	2,70	14,06 %
Näyte 12	1: 18,2 2: 21,0 3: 18,6	19,2	1,51	7,86 %
Näyte 20	1: 15,1 2: 17,5 3: 20,7	17,8	2,80	15,73 %

13 POHDINTA

13.1 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tavoitteena oli toteuttaa vankomysiiniresistenssiä aiheuttavien geenien testauksen verifiointi Seinäjoen klinisen mikrobiologian laboratoriolle. Tavoite saatiin toteutettua tekemällä sovitusta määrästä näytteitä herkkyysmäärittäminen sekä GeneXpert®:in PCR-testaus ja vertailemalla näiden tulosten paikkansapitävyyttä keskenään.

Vertailujen avulla PCR-menetelmän toimivuus saatiin osoitettua käytännössä näiden kyseisten geenien tunnistamiseen. Kokonaisuutena herkkyysmäärittäminen ja PCR-testauksen tulokset täsmäsivät keskenään ja geenitestin toistettavuudessa suurimmaksi osaksi vaihtelu oli hyvin pientä. GeneXpert® tunnisti vanA- ja vanB -geenit luotettavasti.

Tutkittava menetelmä voidaan todeta herkäksi (sensitiivisyys) sen osoitettua positiiviseksi oikeiden geenien suhteen kaikki referenssilaboratorion (THL) vanA/vanB-positiiviseksi ilmoittamat kannat. Positiivisista näytteistä ajettiin myös toistot, joista jokaisesta saatiin positiiviset tulokset. Menetelmä voidaan myös todeta tarkaksi (spesifisyys) sen osoitettua negatiiviseksi kaikki tunnetut negatiiviset näytteet. Negatiivisista näytteistä ei tehty toistoja.

Tämän työn perusteella voidaan todeta, että Xpert vanA/vanB -geenitesti soveltuu käytettäväksi kliinisessä laboratoriotyössä vanA- ja vanB-geenien tunnistamiseen. PCR-menetelmä on kiekkoherkkyysmäärittäystä herkempi menetelmä, ja geenien tunnistaminen pelkän vankomysiiniresistentin enterokokkikannan tunnistamisen sijaan auttaa potilaan hoitosuunnitelman laatimisessa. Mahdollisuus käyttää geenitestiä Seinäjoen keskussairaalan klinisen mikrobiologian yksikössä mahdollistaa näytteiden nopeamman suorittamisen ja paremman potilasturvallisuuden, kun näytteitä ei tarvitse lähettää ulkopuolisiin laboratorioihin tehtäväksi.

13.2 Eettisyys

Etiikka filosofian osa-alueena selvittää oikean ja väärän, hyvän ja pahan, sekä moraalisen toiminnan näkemyksiä. Tutkimuseetikassa on kyse vastuullisista, eettisistä ja rehellisistä toimintatavoista tutkimuksenteossa. Ihmistieteiden tutkijan on noudatettava näitä toimintatapoja kunnioittaakseen tutkimiansa ihmisiä ja tuottaakseen kestäväää tietoa. (Kallinen & Kinnunen n.d.; Mustajoki & Korhonen 2021.) Tutkimuseettinen neuvottelukunta (TENK) on laatinut hyvän tieteellisen käytännön (HTK) tutkimuseettisen ohjeen yhteistyönä suomalaisen tiedeyhteisön kanssa. HTK:n tavoitteena on hyvän tieteellisen käytännön edistäminen ja varmistaa loukkausepäilyjen asiantunteva, oikeudenmukainen ja mahdollisimman nopea käsittely. Tutkimusta tehdessä tulee noudattaa rehellisyyttä, tarkkuutta ja huolellisuutta tutkimustyössä, tutkimustulosten tallettamisessa ja niiden esittämisessä. Tutkijan tulee myös kunnioittaa muiden tutkijoiden työtä ja viitata heidän julkaisuihinsa asianmukaisesti, antaen aiemmin tehdylle työlle sen ansaitseman arvon käyttäessään sitä omassa tutkimuksessaan. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta n.d.)

Työssä eettisyys toteutui tutkimusta tehdessä tulosten kirjaamisen ja koko prosessin aikaisena tietojen ja tutkimusmateriaalin oikeellisena, rehellisenä ja huolellisena käsittelynä. Näytteiden potilastiedot eivät olleet mukana missään työvaiheessa ja näytteiden anonymiteetti oli näin ollen myös helppo säilyttää. Kaikki tulokset ja tulosten mahdollinen vaihtelu on kirjattu ja ilmoitettu kokonaisuudessaan tuloksissa.

13.3 Luotettavuus

Tutkimuksen tasoa ja luotettavuutta on arvioitava koko tutkimusprosessin ajan. Luotettavuutta voi varmistaa käyttämällä tutkimuksessa esimerkiksi erilaisia analyysimenetelmiä ja aineistotyyppejä, sekä suunnittelemalla tutkimustyön ja -kysymykset huolellisesti. Tätä tapaa luotettavuuden kohottamiseen kutsutaan triangulaatioksi ja sillä pyritään osoittamaan, että tutkimustulokseen ei ole päädytty sattumanvaraisesti, vaan samaan tulokseen voidaan päätyä erilaisia menetelmiä käyttäen ja toistettavasti. Kvantitatiivisen tutkimuksen laatua voidaan arvioida sen

luotettavuuden (reliabiliteetti) ja pätevyyden (validiteetti) kautta. Validiteetti viittaa siihen, kuinka tarkasti tutkimuksessa käytetty menetelmä mittaa juuri sitä, mitä sen on tarkoitus mitata. Reliabiliteetti puolestaan tarkoittaa menetelmän johdonmukaisuutta ja tulosten toistettavuutta. Jos sama tulos voidaan saavuttaa toistuvasti samoilla menetelmillä samoissa olosuhteissa, mittausta voidaan pitää luotettavana. (Koppa 2021; Middleton 2021.)

Tässä opinnäytetyössä luotettavuutta mitattiin GeneXpert®: in ja THL:n tuloksia vertaamalla, jonka lisäksi myös VRE-kantojen kiekkoherkkyysmäärittämiä verrattiin GeneXpert®: in tuloksiin. Vertailu osoitti hyvin työn tulosten luotettavuuden ja määrittelyn herkkyuden tulosten täsmätessä toisiinsa myös toistettavuuksia testatessa, vaikka variaatiokertoimessa oli joiltakin osin pientä vaihtelua. Kaikki vanA/vanB-positiivisina näytteinä saadut kannat olivat myös tämän työn tutkimuksen tulosten suhteen positiivisia, ja kaikki tunnetut negatiiviset olivat myös tässä negatiivisia, eli tarkkuus ja herkkyys toteutuivat työssä.

13.4 Jatkotutkimusaiheet

Emme ole löytäneet aiempia suomenkielisiä tutkimuksia GeneXpert®: in herkkydestä vanA- ja vanB-geenejä kohtaan, vaan kaikki tehdyt tutkimukset ovat kansainvälisiä. Laajemmalle jatkotutkimukselle voisi siis olla Suomessakin kysyntää. Menetelmän käyttöä potilasnäytteiden analysointiin voisi jatkotutkimuksena testata enemmänkin ja suorittaa vielä suuremmasta satunnaisotannasta myös toistettavuudet. Tässä työssä positiiviset ja negatiiviset näytteet ovat olleet jo etukäteen varmistettuja, mutta tuntemattomienkin kantojen käyttö testauksessa voisi olla hyödyllistä.

LÄHTEET

Ahmed, M. & Baptiste, K. 2018. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance*. Jun 2018. 590–606. Luettu 11.11.2021. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0147>

Alfahemolyttinen. 2014. Tieteen termipankki. Verkkosivu. Luettu 1.11.2021. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:alfahemolyttinen>

Atlas, R., & Snyder, J. 2015. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. Gram stain. Teoksessa Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M. Richter, S. & Warnock, D. (toim.) *Manual of Clinical Microbiology Volume 1*. 11. painos. Kanada: ASM Press.

Bayot, ML. & Bragg, BN. 2021. Antimicrobial Susceptibility Testing. National Center for Biotechnology Information 31.7.2021. Verkkosivu. Luettu 20.11.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>

Beetahemolyttinen. 2014. Tieteen termipankki. Verkkosivu. Luettu 1.11.2021. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:beetahemolyttinen>

Behlke, M., Berghof-Jager, K. & Brown, T. ym. 2019. Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology. Iso-Britannia: Caister Academic Press. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/detail.action?docID=5897834>

Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologian perustekniikat. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Infektiosairaudet*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 17.10.2021. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/isa00302/do?p_haku=gramv%C3%A4rj%C3%A4ys#q=gramv%C3%A4rj%C3%A4ys

Depardieu, F. & Courvalin, P. 2017. Glycopeptide-Resistance in Enterococci. Teoksessa Mayers, D., Sobel, J., Ouellette, M., Kaye, K. & Marchaim, D. (toim.) *Antimicrobial Drug Resistance. Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 1*. 2. painos. Sveitsi: Springer International Publishing AG Switzerland.

Enterokokki, vankomysiiniresistentti, viljely. 2020. Työohje. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Luettu 11.12.2020. <https://www.epshp.fi/files/4784/VREVi-1788.pdf>

Fraimon, H., Jungkind, D., Lander, D., Delso, D. & Dean, J. 1994. Case report. Urinary Tract Infection with an Enterococcus faecalis isolate that Requires Vancomycin for Growth. Ann Intern Med. 1994 Jul 1;121(1):22–6. Luettu 12.11.2021. Vaatii käyttöoikeuden.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-121-1-199407010-00004>

Hajontaluvut. n.d. Tietoarkisto. Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja. Tampereen yliopisto. Verkkosivu. Luettu 24.11.2021.
<https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/menetelmaopetus/kvanti/hajontaluvut/hajontaluvut/>

Heikkilä, T. 2014. Kvantitatiivinen tutkimus. Luento. Tilastollinen tutkimus. Verkkosivu. <http://www.tilastollinentutkimus.fi/1.TUTKIMUS-TUKI/KvantitatiivinenTutkimus.pdf>

Horelli-Kuitunen, N. & Orpana, A. 2016. Geenitestauksen menetelmiä. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 11.12.2020. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/lfg00905/do?p_haku=pcr#q=pcr

Humagain, S. 2018. Differences between Gram positive and Gram negative bacteria. MH Themes 2021. Luettu 12.11.2021. <https://onlinesciencenotes.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>

Huovinen, P. & Vaara, M. 2011. Bakteerilääkehoidon perusteet. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., Vaara, M. (toim.) Infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 29.10.2021. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/isa00801/do?p_haku=pbp#q=pbp

Huupponen, R., Vaara, M. & Kantele, A. 2018. Mikrobilääkkeet ja niiden jaottelu. Teoksessa Ruskoaho, H. ym. (toim.) Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.9.2021. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/lft00372/do?p_haku=mikro-bil%C3%A4%C3%A4kkeet#q=mikro-bil%C3%A4%C3%A4kkeet

Huupponen, R., Vaara, M., Khawaja, T. & Kantele, A. 2018. Glykopeptidit. Teoksessa Ruskoaho, H., Hakkola, J., Huupponen, R., Kantele, A., Korpi, E. R., Moilanen, E., Piepponen, P., Savontaus, E., Tenhunen, O. & Vähäkangas, K. (toim.) Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/lft00384/do?p_haku=vankomysiini#q=vankomysiini

Hägg, M. (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Metrologian neuvottelukunta. Luettu 7.12.2020. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>

Ilmavirta, H., Hämäläinen, S., Kokki, M. & Ranta, V-P. 2020. Vankomysiiniin annoksen säätäminen munuaisten toimintakyvyn ja pitoisuusmääritysten perusteella. Verkkosivu. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. 2020;136(11):1301–10. Luettu 2.11.2021. [Vankomysiiniin annoksen säätäminen munuaisten toimintakyvyn ja pitoisuusmääritysten perusteella \(duodecimlehti.fi\)](https://www.duodecimlehti.fi)

Johdatus tilastotieteeseen. n.d. Tilastokoulu. Tilastokeskus. Verkkosivu. Luettu 24.11.2021. https://tilastokoulu.stat.fi/verkkokoulu_v2.xql?course_id=tkoulu_tilaj&lesson_id=3&subject_id=2&page_type=sisalto

Järvinen, A., Huovinen, P. & Vaara, M. 2011. Beetalaktaamit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., Vaara, M. (toim.) Infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/isa00802/do?p_haku=beetalaktaami#q=beetalaktaami

Kallinen, Timo & Kinnunen, Taina. n.d. Etnografia. Teoksessa Jaana Vuori (toim.) Laadullisen tutkimuksen verkkokäsikirja. Verkkosivu. Tampere: Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. Luettu 23.11.2021. <https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/menetelmaopetus/kvali/tutkimusetiikka/tutkimusetiikka-ihmistieteissa/>

Kauppila, J. Ylilääkäri. 2020. Opinnäytetyö VanA/B. Sähköpostiviesti.

Kerbaudy, G., Perugini, M.R.E., Yamauchi, L.M. & Yamada-Ogatta, S.F. 2011. Case Report. Vancomycin-dependent Enterococcus faecium vanA: characterization of the first case isolated in a university hospital in Brazil. Endocrine Diseases, Nutrition and Metabolism. Braz J Med Biol Res 2011, 44 (3). <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500006>

Kuo, S-F., Huang, S-P. & Lee, C-H. 2016. Vancomycin-dependent Enterococcus faecium can easily be obscured. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2017, 50 (6), 926–927. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.007>

Lavigne, J-P, Espinal, P., Dunyach-Remy, C., Messad, N., Pantel, A. & Sotto, A. 2012. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. De Gruyter. 51 (2), 257-270.

Lewis, J. & Bush, K. 2015. Antibacterial Agents. Glycopeptides and lipopeptides. Teoksessa Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M. L., Richter, S. & Warnock, D. (toim.) Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. Section III. Antibacterial Agents and Susceptibility Test Methods. 11. painos. Kanada: ASM Press.

Martins Teixeira, L., Carvalho, M., Facklam, R. & Shewmaker, P. 2015. Enterococcus. Teoksessa Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K.,

Funke, G., Landry, M. Richter, S. & Warnock, D. (toim.) Manual of Clinical Microbiology Volume 1. Section II Bacteriology. 11. painos. Kanada: ASM Press.

The Lecturo Medical Concept Library. 2021. Glycopeptides. Mechanism of action. Verkkosivu. Päivitetty 21.6.2021. Luettu 12.11.2021. <https://www.lecturio.com/concepts/glycopeptides/>

Methods, Method Verification and Validation. 2020. Food and Drug Administration. Julkaistu 30.6.2020. Luettu 22.11.2021. <https://www.fda.gov/media/73920/download>

Mitchell, S.L., Mattei, L.M. & Alby, K. 2017. Whole genome characterization of a naturally occurring vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* from a patient with bacteremia. *Infection, Genetics and Evolution* 52 (2017) 96–99. Luettu 10.11.2021. Vaatii käyttöoikeuden. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.002>

Mustajoki, H. & Korhonen, I. 2021. Mikä ihmeen tutkimusetiikka? Vastuullinen tiede. *Tutkimusetiikka ja tiedeviestintä Suomessa*. Verkkosivu. Luettu 23.11.2021. <https://vastuullinentiede.fi/fi/tutkimuksen-suunnittelu/mika-ihmeen-tutkimusetiikka>

Park, D. 2011. PCR Protocols, Third Edition. 3. painos. Iso-Britannia: Humana Press.

Quantitative Research and Analysis: Quantitative Methods Overview. 2021. LeTourneau University. Margaret Estes Library. Verkkosivu. Luettu 22.11.2021. <https://lib-guides.letu.edu/quantresearch>

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2011. Enterokokkien lääkeresistenssi. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) *Mikrobiologia*. 1.–2. painos. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.11.2020.

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2020a. Enterokokit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/mbg00083/do>

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2020b. Enterokokki-infektioiden diagnostiikka. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Julkaistu 24.6.2020. Luettu 29.10.2021. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiportti.fi/op/mbg00088/do?p_haku=bakteeriviljely#q=bakteeriviljely

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2020c. Enterokokki-infektioiden hoito ja ehkäisy. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Julkaistu 24.6.2020. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/mbg00089/do>

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2020d. Enterokokki-infektioiden patogeneesi. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) Mikrobiologia. Kustannus Oy Duodecim. Julkaistu 24.6.2020. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiporrtti.fi/op/mbg00086/do>

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V-J. 2020e. Enterokokkien rakenne ja virulenssitekijät. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) Mikrobiologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiporrtti.fi/op/mbg00084/do>

Rantakokko-Jalava, K., Hakanen, A. 2020. Mikrobilääkkeiden herkkyyden tulkinnassa käytettäviin SIR-määritelmiin tulossa muutoksia. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. Verkkosivu. Luettu 22.11.2021. <https://thl.fi/fi/web/infektioaudit-ja-rokotukset/-/mikrobilaaikkeiden-herkkyyden-tulkinnassa-kaytettaviin-sir-maaritelmiin-tulossa-muutoksia->

Rengaraj, R., Mariappan, S., Sekar, U. & Kamalanadhan, A. 2016. Detection of Vancomycin Resistance among Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus. J Clin of Diagn Res.2016; 10(2):DC04-DC06. Luettu 20.11.2021. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/17552.7201>

Reyes, K., Zervos, M. & John, J. 2017. Enterococcal Infections in Adults. Teoksessa Mayers, D., Sobel, J., Ouellette, M., Kaye, K. & Marchaim, D. (toim.) Antimicrobial Drug Resistance. Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2. 2. painos. Sveitsi: Springer International Publishing AG Swirzerland

Saunders, N. & Lee, M. 2013. Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications. Caister Academic Press, 2013. <https://ebook-central.proquest.com/lib/tampere/reader.action?docID=5897808>

Sensitiivisyys. 2016. Terveyskirjasto. Duodecim. Verkkosivu. Luettu 24.11.2021. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03075>

Spesifisyys. 2016. Terveyskirjasto. Duodecim. Verkkosivu. Luettu 24.11.2021. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03206>

Skurnik, M. & Vuopio, J. 2020. Bakteenin soluseinä. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) Mikrobiologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.11.2020. Vaatii käyttöoikeuden. https://www.oppiporrtti.fi/op/mbg00009/do?p_haku=bakteerin%20solusein%C3%A4#q=bakteerin%20solusein%C3%A4

Skurnik, M. & Vuopio, J. 2020. Eubakteerit ja arkeonit: prokaryootinen kehityslinja. Teoksessa Hedman, K. ym. (toim.) Mikrobiologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 2.11.2021. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiporrtti.fi/op/mbg00002/do>

Tankeshwar, A. 2021. Blood Agar and Types of Hemolysis. Microbe online. Verkkosivu. Luettu 1.11.2021. <https://microbeonline.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-types-of-hemolysis/>

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Julkaistu 1.1.2020. Luettu 21.11.2021. https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

Tutkimuksen toteuttaminen. 2021. Kurssi- ja oppimateriaalipolku Koppa. Jyväskylän yliopisto. Päivitetty 27.9.2021. Luettu 23.11.2021. <https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/tutkimusprosessi/tutkimuksen-toteuttaminen#tutkimustulosten-luotettavuus>

Vilka, H. 2007. Tutki ja Mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Vancomycin Orion kuiva-aine välikonsentraatiksi infuusionestettä varten. 2020. Pharmaca Fennica. Verkkosivu. Luettu 27.11.2020. <https://pharmacafennica.fi/spc/3713250>

Vankomysiini, jäännös- ja huippupitoisuus. Vankomysiini, yksittäisnäyte. Työohje. EPSHP. Päivitetty 26.7.2018. Luettu 2.11.2021. [81.209.127.193/labroaohje/labroaohje.asp?tutkimus=8204](https://www.tutkimuskeskus.fi/81.209.127.193/labroaohje/labroaohje.asp?tutkimus=8204)

VRE eli vankomysiiniresistentti enterokokki. 2019. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Verkkosivu. Luettu 27.11.2020. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-ai-vre-eli-vankomysiiniresistentti-enterokokki>

VRE, Enterokokki, vankomysiiniresistentti, viljely. 2019. Työohje. NordLab. Päivitetty 21.10.2019. Luettu 27.11.2020. <http://oyslab.fi/ohje-kirja/1788.html>

Vuento, R. 2020. Antibiootit. Lääkärikirja Duodecim. Luettu 17.10.2021. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01177>

Woodford, N., Johnson, A. P., Morrison, D., Hastings, J. G. M., Elliott, T. S. J., Worthington, A., Stephenson, J. R., Chin, A. T. & Tolley, J. L. 1994. Vancomycin-dependent enterococci in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1994; 33: 1066.

Weinstein, M. P. 2020. Comparative Evaluation of Penicillin, Ampicillin, and Imipenem MICs and Susceptibility Breakpoints for Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 21.12.2020. Luettu 20.11.2021. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2729-2731.2001>

Zhou, X., Arends, J. P., Kampinga, G. A., Ahmad, H. M., Dijkhuizen, B., van Barneveld, P., Rossen, J. W. A. & Friedrich, A. W. 2014. Evaluation of the Xpert vanA/vanB Assay Using Enriched Inoculated Broths for Direct Detection of

vanB Vancomycin-Resistant Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2014, 52 (12), 4293–4297. Luettu 23.11.2021. <https://doi.org/10.1128/JCM.01125-14>

LIITTEET

Liite 1. GeneXpert®: in tulosraportti.

GeneXpert PC 30/03/21 16:28:29

Test Report

Sample ID: 16 opn
Test Type: Specimen
Sample Type:

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert vanA vanB	1	In Vitro Diagnostic

Test Result:

vanA	NEGATIVE;
vanB	POSITIVE

Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
BG	32.1	400	NA	PASS
vanA	0.0	0	NEG	PASS
vanB	15.3	808	POS	PASS

User: Seinajoen keskussairaala
Status: Done Start Time: 30/03/21 15:45:52
Expiration Date*: 23/01/22 End Time: 30/03/21 16:29:15
S/W Version: 4.8 Instrument S/N: 711234
Cartridge S/N*: 62095353 Module S/N: 676321
Reagent Lot ID*: 13105 Module Name: D1
Notes:
Error Status: OK

Errors
<None>

Tech. Initial/Date

Supervisor Initial/Date

* indicates that a particular field is entered using a barcode scanner

For In Vitro Diagnostics Use Only.

Liite 2. Vankomysiiniresistenssi-geenitesti työhöje.

VANKOMYSIINIRESISTENSSI-GEENITESTI	
Menetelmä	Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio (PCR)
Periaate	Kliinisesti merkityksellinen resistenssi on yleisimmin plasmidivälitteisten vanA- ja vanB-geenien aiheuttamaa. PCR-testin periaatteena on vanA- ja vanB-geenien kvalitatiivinen osoitus tikkuun otetusta rektaali- tai perianaalinäytteestä. (Valmistaja ei ole validoinut maljalta pesäkkeestä tehtävää testiä.)
Näyte	Seulontanäytterektaali- ja perianaali-alueelta. Rektaali- ja perianaalinäyte säilyy 5 vrk jääkaappilämpötilassa (+2 - +8°C).
Laitteisto	GeneXpert-PCR-laite
Reagenssit ja tarvikkeet	Xpert® vanA/vanB , tuotenro: GXVANA/B-CE-10, Cepheid, Immuno-diagnostic, Copanin näytetikkuja, tuotenro 900-370
Suoritus	<p>Esivalmistelu rektaali- tai perianaalinäytetikusta:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Laita käsiin käteen. 2. Katkaise rektaali- ja perianaalialueelta otettu näytetikku näytepuskuripulloon (Sample Reagent), sulje pullon korkki ja vorteksoi 10 s. Jatka kohdasta Työnsuoritus <p>Esivalmistelu pesäkkeestä (HUOM! testiä EI ole validoitu pesäketest.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Laita käsiin käteen 2. Tee pesäkkeestä 0.5 McF vahvuinen suspensio 0.9 % NaCl-putkeen (yleensä 1 pesäke riittää). 3. Kastele Cepheidin yksittäistikku NaCl-putkessa. Katkaise tikku Sample Reagent -pulloon, sulje pullo ja vorteksoi 10 s. Jatka kohdasta Työn suoritus. <p>Työn suoritus:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ota pakkauksesta Xpert vanA/B-testikasetti. Älä kosketa sivussa olevaa muovilehdykää (PCR-kammio) sormin ja tarkista, että lehdykkä on ehjä. 2. Poista korkki näytepuskuriputkesta ja pipetoi varovasti koko sisältö juuri avatun testikasetin oikeanpuoleiseen näytekuoppaan. (HUOM! Varo, ettei keskimmäiseen kammioon (männän aukko) mene roiskeita pipetoidessasi). Sulje testikasetti huolellisesti. Testikasetti tulee siirtää laitteeseen 30 min. sisällä näytteen pipetoinnista kasettiin. 3. Poista käsiin ja desinfioi kädet. 4. Napauta tietokoneen näytöltä CREATE TEST- kuvaketta. 5. Lue viivakoodinlukijalla potilaan laboratoriotunniste Sample ID-kohtaan. 6. Skannaa viivakoodinlukijalla kasetin viivakoodi. Lopuksi napauta START TEST. 7. Laita testikasetti varovasti GeneXpert-laitteeseen tietokoneen näyttämään moduliin, jossa vilkkuu vihreä valo. (HUOM! Testikasetti pitää olla koko ajan pystyasennossa eikä sitä saa kallistaa) 8. Laita ovi yhdellä painalluksella kunnolla kiinni.

Liite 3. Negatiiviset kliinisen mikrobiologian näytteet.

Näyte	VAN- kiekko mm	VAN-E MIC	VAN & VAN- E 2vrk	Xpert vanA	Xpert vanB	Vitek2	Huom.
B1	19,4	1,0	-	0	0	-	
B2	13,8	1,0	-	0	0	-	
B3	-	6,0	-	0	0	Enterococcus gallinarum	VanC
B4	-	3,0	-	0	0	Enterococcus casseliflavus	VanC
B5	14,5	2,0	-	0	0	-	
B6	19,6	0,5	-	0	0	-	
B7	16,2	1,5	-	0	0	-	
B8	14,6	1,5	-	0	0	-	
B9	15,9	1,5	-	0	0	-	
B10	19,5	0,5	-	0	0	-	
B11	15,1	1,0	-	0	0	-	
B12	12,2	2,0	-	0	0	-	
B13	16,6	1,0	-	0	0	-	
B14	16,8	0,75	-	0	0	-	
B15	18,9	0,75	Yksittäisiä pesäkkeitä	0	0	-	
B16	18,7	1,0	-	0	0	-	
B17	16,4	1,0	-	0	0	-	

Liite 4. Positiiviset THL:n näytteet.

1 (2)

Näyte	VAN-kiekkommm	VAN-E MIC	VAN & VAN-E 2vrk	Xpert vanA	Xpert vanB	Vitek2	Huom.
1	9,6	32	-	1: 0 2: 0 3: 0	1: 18,0 2: 18,6 3: 18,0	Enterococcus faecium	1: VanB 2: VanB 3: VanB
2	06	32	-	0	17,3	Enterococcus faecium	VanB
3	-	2,0	-	1: 0 2: 0 3: 0	1: 17,9 2: 17,8 3: 17,9	Enterococcus faecium	1: VanB 2: VanB 3: VanB
4	-	1,5	-	1: 0 2: 37,1 3: 0	1: 16,7 2: 17,3 3: 19,1	Enterococcus faecium	1: VanB 2: VanA/B 3: VanB
5	06	Yli 256	-	1: 16,2 2: 21,4 3: 20,1	1: 0 2: 0 3: 0	Enterococcus faecium	1: VanA 2: VanA 3: VanA
6	06	128	-	0	16,2	Enterococcus faecalis	VanB
7	06	12	-	0	15,8	Enterococcus faecium	VanB
8	06	Yli256	-	15,5	0	Enterococcus faecium	VanA
9	06	Yli 256	-	16,3	0	Enterococcus faecium	VanA
10	06	Yli 256	-	16,3	17,6	Enterococcus faecium	VanA/B

(jatkuu)

11	06	Yli 256	-	0	17,6	Enterococcus faecium	VanB
12	06	Yli 256	-	1: 18,2 2: 21,0 3: 18,6	1: 0 2: 0 3: 0	Enterococcus faecium	1: VanA 2: VanA 3: VanA
13	06	Yli 256	-	15,3	0	Enterococcus faecium	VanA
14	12,1	6	-	0	16,1	Enterococcus faecium	VanB
15	06	Yli 256	-	15,7	0	Enterococcus faecium	VanA
16	10	8	-	0	15,3	Enterococcus faecium	VanB
17	06	Yli 256	-	15,7	0	Enterococcus faecalis	VanA
18	06	Yli 256	-	15,9	0	Enterococcus faecium	VanA
19	06	Yli 256	-	15,3	0	Enterococcus faecium	VanA
20	06	Yli 256	-	1: 15,1 2: 17,5 3: 20,7	1: 0 2: 0 3: 0	Enterococcus faecium	1: VanA 2: VanA 3: VanA