



Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*
– laboratoriodiagnostiikan kehittäminen ISLAB:n Mikkelin
aluelaboratoriossa

Opinnäytetyö

Jenny Koskela

Sanna Turunen

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Hyväksytty ____ . ____ . _____

SAVONIA- AMMATTIKORKEAKOULU

Terveysala, Kuopio

OPINNÄYTETYÖ

Tiivistelmä

Koulutusohjelma: Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t): Jenny Koskela & Sanna Turunen	
Työn nimi: Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> – laboriodiagnostiikan kehittäminen ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa	
Päiväys: 1.11.2010	Sivumäärä / liitteet: 58 / 6
Ohjaajat: Päätoiminen tuntiopettaja Reetta Pylkkönen & sairaalamikrobiologi Päivi Suomala	
Työyksikkö / projekti: ISLAB:n Mikkelin aluelaboration klinisen mikrobiologian osasto	
<p>Tiivistelmä:</p> <p>Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> eli MRSA on yleinen sairaalainfektioiden aiheuttaja. MRSA:n aiheuttamien infektioiden hoito on vaikeaa bakteerin geenimuutoksesta johtuvan alentuneen mikrobilääkeherkkyyden takia. MRSA:sta on sen nopean levinneisyyden myötä kehittynyt merkittävä haaste terveydenhuollolle, sillä MRSA-epidemiat aiheuttavat hoito-osastoilla toiminnanmuutoksia ja lisätyötä muun muassa pidentäen hoitajaksoja ja vaikeuttaen esimerkiksi leikkaushaavojen paranemista. Toiminnanmuutokset ja lisätyöt kasvattavat puolestaan hoitokustannuksia. MRSA:n aiheuttamien infektioiden ja oireettomien MRSA-kantajien nopea tunnistaminen onkin ensiarvoisen tärkeää tartuntojen leviämisen estämiseksi.</p> <p>Tämä opinnäyte toteutettiin kehittämistyönä, jonka tarkoituksena oli MRSA-laboriodiagnostiikan kehittäminen ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Työn tavoitteena oli selvittää tehostaako näytteiden rikastaminen MRSA:n tunnistamista. Rikastamisen tehoa selvitettiin kahdella tavalla. Ensimmäiseksi, vertailtiin keskenään kahta eri rikastusmenetelmää: yksittäisrikastamista ja poolirikastamista, jossa useita samasta potilaasta otettuja näytteitä yhdistetään samaan rikastusviljelyyn. Toiseksi, laimennossarjojen avulla verrattiin rikastettujen ja rikastamattomien näytteiden bakteerikasvua. Laboriodiagnostiikan kehittämisen ohella tutkimusnäytteiden avulla oli tarkoitus selvittää MRSA:n esiintyvyyttä päivystyspoliklinikan kautta osastoille otettavilla potilailla Mikkelin keskussairaalassa.</p> <p>Kehittämistyön laborioriotutkimuksissa kesäkuussa 2009 analysoitiin yhteensä 140 potilaan näytteet, joista vain yksi oli positiivinen MRSA-löydös. Yksipuoliseksi osoittautuneen aineiston perusteella ei voitu vertailla luotettavasti kahta eri rikastusmenetelmää. Kehittämistyöstä saatiin kuitenkin arvokasta kokemusta rikastusmenetelmien käytöstä ja poolirikastusmenetelmän testausta on jatkettu toisessa ISLAB:n aluelaboratoriossa. Laimennossarjojen avulla todettiin MRSA-näytteiden rikastamisen tehostavan MRSA:n kasvua. Kehittämistyön toteutuksen jälkeen yksittäisten näytteiden rikastaminen otettiin rutiinikäyttöön ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa.</p>	
Avainsanat: MRSA, <i>Staphylococcus aureus</i> , mikrobiologinen diagnostiikka, sairaalabakteeri, rikastaminen	
Julkinen <input checked="" type="checkbox"/>	Salainen <input type="checkbox"/>

SAVONIA UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Health Professions Kuopio

THESIS

Abstract

Degree Programme: Biomedical Laboratory Science	
Authors: Jenny Koskela & Sanna Turunen	
Title of Thesis: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> – Development of Laboratory Diagnostics in IS-LAB's Regional Laboratory at Mikkeli	
Date: 1.11.2010	Pages / appendices: 58 / 6
Supervisor: Senior lecturer Reetta Pylkkönen & hospital microbiologist Päivi Suomala	
Contact persons: Department of Clinical Microbiology, ISLAB's Regional Laboratory in Mikkeli	
<p>Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> or, in other words, MRSA is a common cause for hospital acquired infections. The treatment of infections caused by MRSA is difficult due to decreased microbial drug hypersensitivity. Rapid diffusion of MRSA has proved a challenge to the health care system. In hospital wards MRSA epidemics have resulted in changes and extra work because the epidemics, as an example, prolong treatment periods and hinder the healing of surgical wounds. As a result, medical expenses have increased. Thus the quick identification of MRSA infections as well as of asymptomatic carriers of MRSA is essential in order to prevent contagion.</p> <p>This thesis was carried out as a project. The purpose of the project was to develop MRSA laboratory diagnostics in ISLAB's Regional Laboratory in Mikkeli. The aim was to find out if swab enrichment boosts the identification of MRSA. Swab enrichment was examined in two ways. First, two methods of swab enrichment were compared. The methods compared were the enrichment of a single swab and an experimental method of enriching a pole of multiple swabs from the same patient. Second, a series of multiple dilutions was used to compare the significance of bacteria growth between enriched and non-enriched swabs. In addition to the development of laboratory diagnostics one aim of the thesis was to determine the incidence of MRSA at the central hospital of Mikkeli.</p> <p>At the laboratory screening phase in June 2009 a total of 140 swabs were analyzed. Only one of them tested positive to MRSA. The comparison of the two methods of swab enrichment was unreliable because of the one sided research material. However, the experience gained on the enrichment methods in this project was useful. The testing of the method of enriching a pole of multiple swabs has been continued in another ISLAB's regional laboratory. The series of multiple dilutions proved that swab enrichment boosts the growth of MRSA. After this project the enrichment of a single swab has been taken into routine use in ISLAB's Regional Laboratory in Mikkeli.</p>	
Keywords: MRSA, <i>Staphylococcus aureus</i> , microbiological diagnostics, hospital bacteria, swab enrichment.	
Public <input checked="" type="checkbox"/>	Secure <input type="checkbox"/>

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> JA MRSA.....	7
2.1 Stafylokokit ja <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2 Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	8
2.3 <i>Staphylococcus aureuksen</i> ja MRSA:n rakenne	9
2.4 <i>Staphylococcus aureuksen</i> aiheuttamat taudit ja niiden hoito	11
3 LABORATORIODIAGNOSTIIKKA	15
3.1 Mikrobiologinen näytteenotto.....	15
3.2 MRSA-näytteenotto ja näytteen säilytys	15
3.3 MRSA-näytteen rikastaminen.....	17
3.4 Bakteerinäytteen viljely ja kasvatus	17
3.5 <i>Staphylococcus aureuksen</i> tunnistaminen	19
3.6 <i>Staphylococcus aureuksen</i> mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen	20
3.7 MRSA:n tunnistaminen ja nimeäminen.....	23
3.8 Tutkimusmenetelmien validointi mikrobiologian laboratoriossa	24
4 AIKAISEMPIA TUTKIMUKSIA MRSA-DIAGNOSTIIKASTA	25
5 KEHITTÄMISTYÖN TARKOITUS	27
6 KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS	28
6.1 Kehittämistyöprosessi.....	28
6.2 Tutkimusnäytteiden kerääminen.....	28
6.3 Tutkimusnäytteiden rikastaminen ja viljeleminen	29
6.4 <i>Staphylococcus aureuksen</i> ja MRSA:n tunnistaminen	31
6.5 MRSA-rikastuksen testaus tunnetulla MRSA-bakteerikannalla.....	34
7 KEHITTÄMISTYÖN TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA	36
7.1 Kehittämistyön tulosten ja toteutuksen tarkastelu	36
7.2 Kehittämistyön luotettavuus ja eettisyys	41
7.3 Ammatillinen kehittyminen	44
LÄHTEET	45
LIITTEET	52

1 JOHDANTO

Staphylococcus aureus on yleinen bakteeri ihmisiholla osana normaalia bakteerikantaa eli normaaliflooraa. *S. aureus* voi kuitenkin aiheuttaa monenlaisia lieviä ja vakavia infektioita kantajan vastustuskyvyn pettäessä. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010, 83; Jawetz, Melnick & Adelberg 1995, 186.) *Staphylococcus aureus* onkin yksi yleisimmistä sairaalainfektioiden aiheuttajista muun muassa vuonna 2005 tehdyn kansallisen sairaalainfektioiden prevalenssitutkimuksen mukaan (ks. taulukko 1).

Taulukko 1. Sairaalainfektioiden aiheuttajamikrobit ja niiden jakauma infektioyypeittäin (KTL 2005).

Aiheuttajamikrobi tai ryhmä	Leikkausalueen infektiot (n=126)	Virtsatieinfektiot (n=125)	Primaarinen bakteremia/fungemia (n=44)	Keuhkokuume (n=21)	Muut (n=83)	Kaikki sairaalainfektiot (n=399)
<i>Escherichia coli</i>	10 (5)	50 (38)	4 (7)	3 (9)	5 (4)	72 (13)
→ <i>Staphylococcus aureus</i>	29 (13)	4 (3)	9 (16)	3 (9)	9 (8)	54 (10)
<i>Enterococcus faecalis</i>	18 (8)	21 (16)	3 (5)	1 (3)	5 (4)	48 (9)
Koagulaasinegatiiviset stafylokokit	28 (13)	3 (2)	10 (18)	1 (1)	2 (2)	44 (8)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15 (7)	10 (8)	2 (4)	0 (0)	7 (6)	34 (6)
<i>Candida albicans</i>	12 (6)	0 (0)	5 (9)	4 (12)	11 (10)	32 (6)
<i>Clostridium difficile</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	28 (25)	28 (5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (0)	10 (8)	1 (2)	2 (6)	1 (1)	17 (3)
<i>Enterococcus faecium</i>	9 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (3)	3 (3)	14 (3)
Muut	96 (44)	35 (26)	21 (38)	18 (55)	35 (38)	213 (38)

Erityisesti ongelmia terveydenhuollossa aiheuttaa metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* eli MRSA. Vaikka MRSA ei itsessään aiheuta *Staphylococcus aureus* vakavampia sairauksia, sen aiheuttamien sairauksien hoitaminen on vaikeaa ja kallista, koska perinteiset antibiootit eivät tehoa MRSA:han. Jatkuvasti yleistyvät MRSA-epidemiat aiheuttavat hoito-osastoilla toiminnanmuutoksia ja lisätyötä, koska epidemiat muun muassa pidentävät hoitajaksoja, vaikeuttavat esimerkiksi leikkaushaavojen paranemista ja aiheuttavat potilaille ylimääräistä kipua. Nämä lisätyöt ja toiminnanmuutokset kasvattavat hoitokustannuksia ennakoimattomasti. (Salmenlinna, Lyytikäinen, Kanerva & Vuopio-Varkila 2008, 190–193.)

MRSA:n leviämistä pyritään estämään Suomessa monenlaisin keinoin, koska MRSA-infektioiden seuraukset ovat ikäviä sekä potilaille että hoitoyksiköille. Keskeisimpiä keinoja tartuntojen torjumiseksi ovat MRSA:n seulontaviljelyt ja MRSA:n mikrobiologinen tunnistaminen, käsien huolellinen desinfektio, kosketuseristys ja MRSA-positiivisten potilaiden kohortointi eli eristäminen muista potilaista. MRSA-positiivisten tapausten myötä myös henkilökunnan seulonnan merkitys korostuu, vaikkakaan henkilökunnasta ei oteta usein näytteitä, sillä henkilökunnan MRSA-seulonnoista saatu hyöty on todettu vähäiseksi. MRSA:n aiheuttamien infektioiden ja oireettomien MRSA-kantajien nopea tunnistaminen onkin ensiarvoisen tärkeää tartuntojen leviämisen estämiseksi. (Laine & Laaksonen-Heikkilä 2008, 13–14; Salmenlinna ym. 2008, 190–193.)

Tämän opinnäytetyön aihe saatiin keväällä 2009 Itä-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (ISLAB) Mikkelin aluelaboratorion sairaalamikrobiologilta ja Mikkelin keskussairaalan infektioylilääkäriltä. Opinnäytetyö toteutettiin kehittämistyönä, jonka tarkoituksena oli MRSA-laboratoriodiagnostiikan kehittäminen ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Työn tavoitteena oli selvittää tehostaako näytteiden rikastaminen MRSA:n tunnistamista. Tämän lisäksi kehittämistyöhön kuului kaksi alatavoitetta: kahden laboratoriomenetelmän vertailu ja MRSA:n esiintyvyyden selvittäminen Mikkelin keskussairaalassa. Mikkelin keskussairaala oli kehittämistyön kohdeyhteisönä kiinnostava, koska Etelä-Savon sairaanhoitopiirin alueella MRSA:n esiintyvyys on ollut viime vuosina korkeahkolla tasolla (Salmenlinna ym. 2008, 190–193).

Henkilökohtaisena tavoitteenamme oli syventää tietämystä kliinisen mikrobiologian diagnostiikasta, erityisesti MRSA-diagnostiikan osalta. Tähän liittyen pyrimme kehittämään kliinisen mikrobiologian laboratoriotyössä tarvittavia taitoja, soveltamaan teoriatietoa käytäntöön sekä arvioimaan analysointimenetelmiä ja niiden tuloksia kriittisesti. Tavoitteenamme oli myös kehittää moniammatillisessa yhteistyössä tarvittavia taitoja ja oppia hyödyntämään eri alojen asiantuntijoiden tietämystä. Koko opinnäytetyöprosessin tavoitteena oli lisäksi harjaantua tieteellisen tiedon käyttöön ja kriittiseen arviointiin sekä oman työskentelyn eri vaiheiden kirjalliseen esittämiseen.

2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS JA MRSA

2.1 Stafylokokit ja *Staphylococcus aureus*

Stafylokokit ovat yleisiä ihmisen normaaliflooran kuuluvia bakteereja. Ulkomuodoltaan ne ovat pyöreitä pallomaisen rakenteen omaavia, grampositiivisesti värjäytyviä kokki-bakteereja. Stafylokokit aiheuttavat enimmäkseen lieviä infektioita, jotka paranevat ilman lääkettä. Vakavat infektiot vaativat kuitenkin antibioottihoitoa, johon on perinteisesti käytetty penisilliinin sukuisia antibiootteja. Stafylokokeille, kuten useimmille bakteereille, kehittyä aikaa myöden vastustuskyky käytettyjä antibiootteja kohtaan. Tämän takia esimerkiksi penisilliinille resistenttien stafylokokkien hoitoon kehitettiin uusi antibiootti metisilliini, joka otettiin käyttöön 1950-luvun lopulla. (THL 2009; Lyytikäinen & Vuopio-Varkila 2005, 107; Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen, 2005, 98–99.)

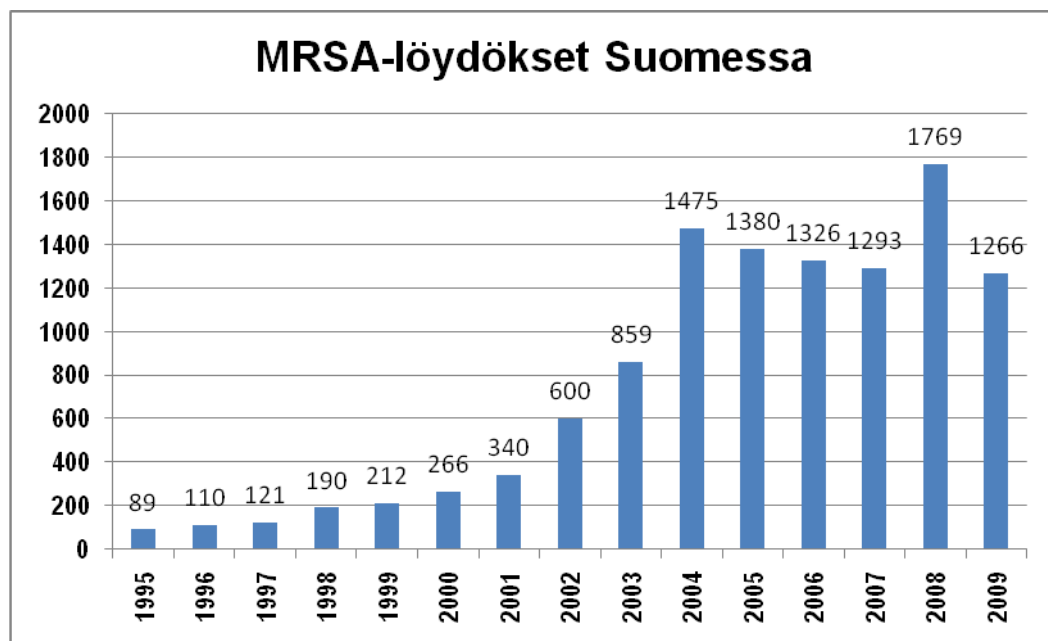
Staphylococcus aureus on muista stafylokokeista poiketen ainoa koagulaasiposiitivinen stafylokokki. *S. aureuksen* aiheuttamia infektioita on pystytty hoitamaan grampositiivisiin bakteereihin tehoavilla mikrobilääkkeillä. Vuosien saatossa infektioiden hoito on vaikeutunut, koska muiden stafylokokkien tapaan *S. aureukselle* on ominaista kehittää herkästi resistenssi mikrobilääkkeitä kohtaan. (Prescott, Harley & Klein 1999, 782–786; Vuopio-Varkila & Sivonen 1997, 414.)

Resistenssi penisilliiniryhmän valmisteita kohtaan perustuu stafylokokkien plasmidivälitteiseen β -laktamaasi tuotantoon. Lääkkeen sitoutumista ja siten sen antibakteerista vaikutusta heikentävät muutokset penisilliiniä sitovassa proteiinissa. Penisilliinin on tunkeuduttava bakteerin seinämään, jotta se pystyy vaikuttamaan halutulla tavalla. Resistentin bakteerin seinämä voi olla miltei läpäisemätön useille penisillineille. (Huupponen 2003, 802.)

2.2 Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* eli MRSA on sairaalabakteerina tunnettu *S. aureuksen* muuntunut muoto. Ensimmäinen MRSA-kanta löydettiin Iso-Britanniasta jo muutama vuosi metisilliinin käyttöönnoton jälkeen 1960-luvun alussa. (Huovinen 2005; Prescott ym. 1999, 786.) Suomessa MRSA:n esiintyvyyttä on seurattu valtakunnallisesti tartuntatautirekisterin avulla vuodesta 1995 lähtien (Salmenlinna ym. 2008, 190–193). Vuonna 2009 tähän Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen ylläpitämään rekisteriin ilmoitettiin 1266 MRSA-kantajuutta ja 30 verestä tai likvorista löydettyä MRSA-infektiota. Etelä-Savon sairaanhoitopiirissä MRSA-tapauksia oli 100 000 asukasta kohden 44 vuonna 2006, 39 vuonna 2007, 35 vuonna 2008 ja 33 vuonna 2009. (THL 2010.)

MRSA:sta on sen nopean levinneisyyden myötä kehittynyt haaste terveydenhuollolle, koska tämän sairaalabakteerin aiheuttamien infektioiden hoito on hankalampaa kuin normaalin mikrobilääkeherkkyyden omaavien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoito. Metisilliiniresistenttien *Staphylococcus aureus* -löydösten määrä on myös kasvanut sekä Suomessa (ks. kuvio 1) että maailmalla 2000-luvulla. (Reygaert 2009a, 111–114; Kerttula 2007, 13–14, 52.) Sairaanhoitopiirien välillä MRSA:n esiintyvyydessä on tosin suuria eroja (Salmenlinna ym. 2008, 190–193).



Kuvio 1. MRSA-löydösten lukumäärä Suomessa vuosina 1995–2009 (THL 2010).

MRSA kolonisaatio, eli tilanne, jossa mikrobi asettuu lisääntymään normaaliflooran sekaan aiheuttamatta tautia (Duodecim 2010), voi sairaalaolosuhteissa levitä nopeasti myös oireettomien potilaiden ja hoitohenkilökunnan välityksellä (Vuopio-Varkila ym. 2010, 90–91). Nopean leviämisen kannalta haasteita lisää myös se, että pitkäaikaiskantajuuden poisto ei aina onnistu. Häätöhoito suunnitellaan yksilöllisesti. Hoidon aikana vältetään bakteerien siirtymistä uudelleen hoidetulle alueelle ja toisiin ihmisiin. Hoidon onnistumisen kannalta on tärkeää noudattaa annettuja hygieniaohjeita ja antibioottivoitteiden käyttöä. (SataDiag 2010.) Kerran tartunnan saanut henkilö voi pysyä kantajana vuosikausia ja toimia tartunnanlähteenä (Vuopio-Varkila ym. 2010, 90–91).

MRSA leviää muiden sairaalabakteerien tavoin käsien välityksellä potilaasta toiseen ja aiheuttaa infekti- ja tartuntaepidemioita. Tehokkaimmin MRSA:n leviämistä voidaan estää huolehtimalla hyvästä käsihygieniasta. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 90–91; Kimari 2008, 298–301.)

2.3 *Staphylococcus aureuksen* ja MRSA:n rakenne

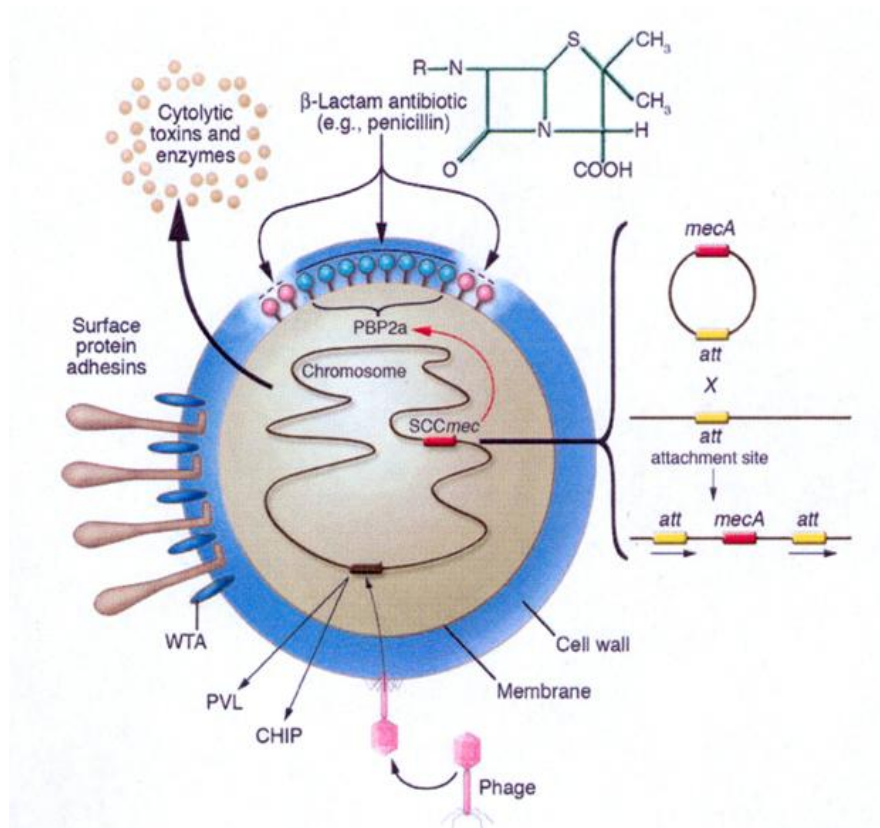
Staphylococcus aureus on grampositiivinen kokkibakteeri. Grampositiivisen bakteerin soluseinä koostuu tyypillisesti peptidoglykaanikerroksesta ja teikkohapoista. Paksu peptidoglykaanikerros antaa bakteerin soluseinälle muodon ja jäykkyyden. Samalla se tekee soluseinän herkäksi esimerkiksi penisilliinille ja penisilliinin johdannaisille. Peptidoglykaanikerrokseen voi liittyä kahdenlaisia teikkohappoja, joista erityisesti lipoteikkohappo käynnistää tulehdusreaktion infektion aikana. *S. aureuksella* on soluseinän peptidoglykaanikerrokseen kiinnittyneinä myös adhesiineja, joiden avulla bakteeri tarttuu elimistön solujen ja rakenteiden pintaan. Suurimmalla osalla *S. aureus* -kannoista on soluseinän ympärillä kapseli, joka tekee bakteerit vastustuskykyisiksi fagosytoosille eli solunsyönnille. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 84–85; Vuopio-Varkila ym. 2005, 99; Puhakka & Salkinoja-Salonen 2002, 98–102.)

Bakteerin mahdollinen grampositiivisuus määritetään yleisesti gramvärjäysmenetelmällä. Gramvärjäyksessä objektilasille kiinnitetty näyte värjätään ensin emäksisellä kristallivioletilla ja tämän jälkeen näyte käsitellään jodilla. Jodikäsittelyn jälkeen näyte huuhdellaan asetoni-alkoholiseoksella ja lopuksi näyte värjätään safraniinilla.

Mikäli näytteessä on grampositiivisia bakteereja, kuten *Staphylococcus aureus*, värjäytyvät ne sinivioleteiksi, kun taas gramnegatiiviset bakteerit ovat värjäyksen jälkeen vaaleanpunaisia. Värjäytyvyyden erot johtuvat grampositiivisten ja -negatiivisten bakteerien soluseinämien toisistaan poikkeavista rakenteista. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 21; Solunetti 2006; Carlson & Koskela 2005, 22; Liimatainen 2000, 126–127.)

Yksittäisen bakteerisolun tärkein osa plasmidien ohella on solun sisällä solulimassa rengasmaisena oleva kromosomi, joka sisältää bakteerin genomin. *S. aureuksen* genomille on tyypillistä, että se pystyy siirtymään kannasta toiseen. Siirtyviä osia ovat erityiset insertiojaksot, bakteriofagiperäinen DNA, transposonit ja patogeenisuussaarekkeet. Patogeenisuussaarekkeet voivat sisältää tärkeitä geenejä, jotka liittyvät bakteerin virulenssiin ja restenssiin. Mikäli *S. aureuksella* todetaan patogeenisuussaarekegeeni SCCmec, luokitellaan tämä MRSA:ksi. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86; Heikkilä & Meurman 2005, 34.)

MRSA:n alentunut lääkeaineherkkyys johtuu ylimääräisen beetalaktamaasin tuoton sijaan hankitusta geenistä. SCCmec saarekkeen osa *mecA*-geeni koodaa muuttunutta peptidoglykaanin, eli soluseinän synteesin entsyymiä PBP2a:ta. *MecA*-geenin vaikutuksesta bakteeri on resistentti kefalosporiineille ja karbapeneemeille sekä stafylokokipenisilliineille, kuten metisilliinille, kloksasilliinille ja dikloksasilliineille. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86; Virolainen-Julkunen 2005.) *MecA*-geenin vaikutuksesta muuntunut *Staphylococcus aureuksen* soluseinärakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. MRSA:n rakenne (Foster 2004).

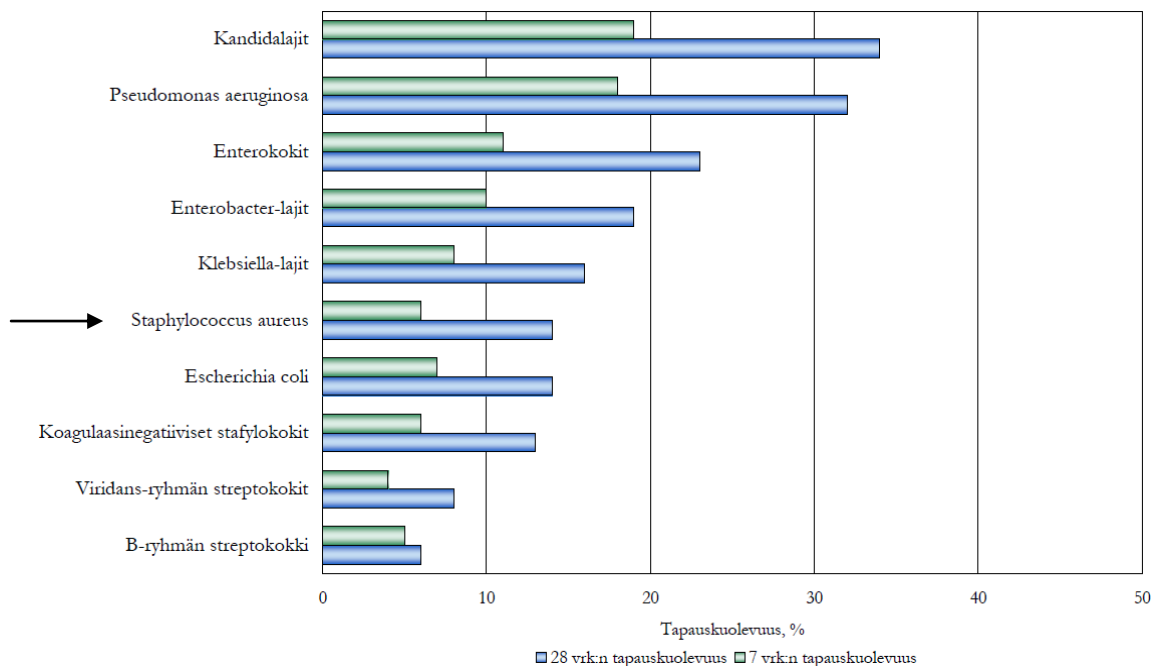
Staphylococcus aureus tuottaa ympäristöönsä useita eksoentyymiä, hemolysiinejä ja toksiineja. Näistä osaa käytetään hyväksi bakteerin laboriodiagnostiikassa, kuten koagulaasientyymiä sekä puna- ja muita eukaryoottisoluja hajottavaa hemolysiiniä. Hemolysiiniä käytetään hyväksi tarkastellessa bakteerin aiheuttamaa hemolyyysiä verimaljalla. *S. aureus* tuottaa myös superantigeneja. Näitä ovat joukko enterotoksiineja, joista osa liittyy ruokamyrkytystapauksiin, ja TSST-1, joka aiheuttaa toksisen sokioireyhtymän. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 85–86.)

2.4 *Staphylococcus aureuksen* aiheuttamat taudit ja niiden hoito

Staphylococcus aureus ja sen resistentit muodot kuten MRSA voivat aiheuttaa monenlaisia infektioita. Yleisimpiä niistä ovat märkäiset iho- ja pehmytkudosinfektiot, luu- ja nivelinfektiot sekä leikkaushaavainfektiot. *S. aureus* voi myös aiheuttaa vakavia yleisinfektioita, kuten sepsis ja endokardiitti. Lieviä iho- ja pehmytkudosinfektioita ovat puolestaan karvatuppitulehdus ja paisetauti, sekä pikkulapsilla märkärupi. *S. aureus* voi aiheuttaa myös ruusuntyyppisen infektion, mutta yleensä sen aiheuttaja on kuitenkin A-

ryhmän streptokokki. Synnytyksen jälkeisten rintatulehdusten tavallisin taudin aiheuttaja on myös *S. aureus*. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86–87; Prescott ym. 1999, 782–785.)

Staphylococcus aureuksen aiheuttaman sepsiksen yleisoreita ovat korkea kuume ja vilunväristykset. Rajuoireisen ja nopeasti etenevän taudin seurauksena potilaan yleiskunto voi heikentyä, hengitystiheys ja pulssi nopeutua sekä esiintyä lievää sekavuutta. Myös vatsa-, lihas- ja nivelkipuja voi esiintyä. Jos *S. aureuksen* aiheuttama sepsis komplisoi- tuu, potilaalle voi kehittyä metastatuisia infektiopesäkkeitä sisäelimiin. Seurauksena voivat olla myös septinen sokki tai aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymä (ARDS). Vakavia *S. aureuksen* aiheuttaman sepsiksen komplikaatioita ovat esimerkiksi endokardiitti, osteomyeliitti, septinen artriitti sekä meningiitti. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 87–89.) Pahimmillaan sepsis voi johtaa kuolemaan jopa muutamassa päivässä. Kuvion 2 diagrammista voidaan havaita, että *Staphylococcus aureus* on merkittävä aiheuttajamikrobi juuri kuolemaan johtaneissa sepsis-tapauksissa. (KTL 2007.)



Kuvio 2. Veriviljelypositiivisten sairaalainfektioiden tapauskuolleisuus aiheuttajamikrobien mukaan SIRO-ohjelmassa vuosina 1999–2006 (KTL 2007).

Endokardiitti on yleinen *S. aureuksen* aiheuttama sydämen sisäkalvon tulehdus, joka on taudinkuvaltaan yleensä akuutti. Taudin kuvaan kuuluu edellä eriteltyjä sepsiksen yleisoreita, joiden lisäksi sydäimestä saattaa kuulua uusi tai muuttuva sivuääni. Tautiin voi

myös liittyä sydämen tiheälyöntisyyttä, matalaa verenpainetta sekä lihas- ja selkäkipuja. Muiden oireiden lisäksi jopa 40 %:lla endokardiittia sairastavista potilaista ilmaantuu myös neurologisia oireita. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 88.)

Staphylococcus aureus voi aiheuttaa luu- ja nivelinfektioita, jotka voivat kehittyä joko hematogeenisesti sepsiksen yhteydessä tai vamman takia syntyneenä sekundaari-infektiona. Osteomyeliitti eli hematogeeninen luuydintulehdus on tavallisempi lapsilla kuin aikuisilla. Aikuisilla sepsiksen yhteydessä suhteellisen tavallinen komplikaatio on nikamatulehdus. Nivelreumaa sairastavilla potilailla *S. aureus* on tavallinen septisen artriitin aiheuttaja. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 89.)

Staphylococcus aureuksen aiheuttamasta paikallisinfektiosta tai kolonisaatiosta voi puolestaan kehittyä akuutti ja rajoireinen toksinen sokkioireyhtymä. Oireyhtymässä bakteerin aiheuttama toksiini imeytyy verenkiertoon aiheuttaen korkeaa kuumetta, oksentelua ja ripulia sekä verenpaineen laskua ja sokkioireita. Taudinkuvaan liittyy usein ihotumaa, monielinvaurioita ja toimintahäiriöitä keskushermostossa. Myös voimakkaita lihaskipuja sekä limakalvojen punoitusta nielussa, emättimessä tai sidekalvoilla voi esiintyä. Suurin osa toksisen sokkioireyhtymän tapauksista liittyy tamponin käyttöön ja *S. aureuksen* kolonisaatioon, mutta oireyhtymä voi esiintyä myös muiden *S. aureuksen* aiheuttamien infektioiden yhteydessä. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 88–89; Prescott ym. 1999, 782–785.)

Staphylococcus aureuksen aiheuttamien infektioiden lääkehoitona käytetään yleisesti stafylokokkipenisilliinejä. Vakavien infektioiden hoitoon käytetään suonensisäistä antibioottilääkitystä. Komplisoituneen sepsiksen tai endokardiitin kohdalla lääkitys kestää vähintään 4–6 viikkoa. Toksisen sokkioireyhtymän hoidossa on peruselintoimintojen ylläpitämisen lisäksi tärkeää saada bakteerin toksiinin tuotanto loppumaan nopeasti. MRSA-infektiot hoidetaan samalla periaatteella kuin herkkien *S. aureus* -kantojen aiheuttamat infektiot, mutta antibiootihoidon valinnassa tulee ottaa huomioon bakteerin mikrobiolääkeherkkyys. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 91–95.)

Vaikka MRSA-infektioiden hoito on hyvin hankalaa, eivät MRSA-kannat kuitenkaan ole taudinaiheuttajina herkkiä *S. aureuksia* vaarallisempia, sillä infektiot ovat usein vaikeusasteeltaan ja oireiltaan hyvin samankaltaisia taudinaiheuttajasta riippumatta. (Vuo-

pio-Varkila ym. 2010, 90). MRSA:n aiheuttamien infektioiden hoidossa ensiarvoisen tärkeää on saada mahdollisimman pian selville bakteerin mikrobilääkeherkkyys, jotta hoitoon osataan käyttää oikeaa lääkitystä. Tästä syystä laboratoriodiagnostiikan kehittäminen on yksi tehokkaimmista keinoista MRSA:n aiheuttamien infektioiden torjunnassa. (Reygaert 2009b, 120–123; van Hal ym. 2007, 2486–2490.)

3 LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

3.1 Mikrobiologinen näytteenotto

Mikrobiologisten laboratoriotutkimusten tavoitteena on ohjata hoitavaa lääkäriä infekti- ja immuunisairauksien hoidossa (Katila & Laatikainen 2003, 338). Mikrobiologisten laboratoriotutkimusten luotettavien tulosten edellytyksenä ovat edustavat ja laadukkaat näytteet. Mikrobiologisten laboratoriotutkimusten perusteella saadaan tietoa potilaan sairaudesta ja osataan valita oikea hoitomuoto. Laboratoriotutkimusten perusteella voidaan yleisemmällä tasolla selvittää infektioiden epidemiologiaa ja bakteerien mikrobilääkeherkkyystilannetta. (Vuento 2005, 63–68.)

Mikrobiologisen näytteen ottamisessa on tärkeä käyttää oikeanlaista näytteenottovälinettä ja -tekniikkaa. Näytteenottovälineiden ja näyteastioiden tulee olla steriilejä. Niiden käyttökelpoisuus on tarkistettava aina ennen näytteenottoa. Oikealla näytteenotto-tekniikalla pyritään puolestaan välttämään näytteen kontaminoitumista. Tämän vuoksi näytteenottovälineitä on myös käsiteltävä aseptisesti. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008, 90–91.)

Näytteenottokohta, näytteenoton ajoitus ja näytteelle sopivat kuljetus- ja säilytysolosuhteet määräytyvät tutkimuspyynnön perusteella. Yleensä näyte otetaan tulehtuneesta kohdasta pyrkien välttämään tervettä kudosta, koska normaalifloora voi häiritä tutkimusta. Näyte pyritään ottamaan ennen mahdollisen mikrobilääkityksen aloittamista, jotta lääkityksellä ei olisi vaikutusta tuloksiin. Näytteen säilytysaika on minimoitava, sillä näytteen tulee antaa oikea ja luotettava kuva potilaan tilasta näytteenottohetkellä. (Tuokko ym. 2008, 90–91; Ylönen 2005, 102.)

3.2 MRSA-näytteenotto ja näytteen säilytys

Näyte MRSA-tutkimusta varten otetaan yleensä, mikäli potilaalla epäillään MRSA-kantajuutta tai tartunnalle altistuminen on todennäköistä (Tuokko ym. 2008, 97). Tämän

lisäksi kantajaksi todetulta otetaan seurantanäytteitä hoidon onnistumisen selvittämiseksi (SataDiag 2010).

MRSA-näyte otetaan yleensä nielusta, nenästä tai infektiokohdista, kuten haavoista tai intuboidun potilaan trakeasta. Hyviä näytteenottoaikoja ovat myös katetriin ja dreeneihin tai vastasyntyneen lapsen napa. Aiemmin kantajiksi todetuilta näyte otetaan kolonisoituneesta paikasta. (Tuokko ym. 2008, 97.)

Nielunäyte otetaan pyörittämällä näytteenottotikkua molempien nielurisojen pinnalla ja takanielussa melko voimakkaasti painaen. Näytteenotossa on varottava koskettamasta näytteenottotikulla muihin suun osiin, kuten kieleen tai hampaisiin, sillä niistä tarttuva normaalifloora häiritsee tuloksen tulkintaa. Näytteenotossa on hyvä käyttää apuna spaattelia, jolla pidetään potilaan kieltä alhaalla. Juuri ennen näytteenottoa potilas ei saa syödä, juoda, imeskellä kurkkupastilleja tai käyttää nielua desinfioivia huuhteita. (Tuokko ym. 2008, 93–94.)

Nenänäyte otetaan molemmista sieraimista pyörittelemällä näytteenottotikkua 1–2 cm syvyydessä. Mikäli näyte otetaan infektiokohdasta, kuten ihorikosta tai haavasta, näytteenottoa ei saa puhdistaa ennen näytteenottoa. Näyte otetaan halutusta kohdasta näytteenottotikkua pyörittämällä, niin että siihen tarttuu bakteereja. (Matikainen, Mietinen & Wasström 2010, 122.)

Näytteenottotikut ovat aina steriilejä ja yksittäispakattuja. Tikkujen vanupäät voivat olla dacronia, puuvillaa tai keinokuitua. Näytteenottotikkujen kuljetukseen käytetään pehmeää agarhyttelöä sisältävää geelikuljetusputkea. Kuljetusputken geeli suojaa bakteereita hapelta sekä kuivumiselta ja ehkäisee bakteerien lisäkasvua. Käyttämättömät putket voidaan säilyttää huoneenlämmössä, mutta näytteenoton jälkeen niitä tulee säilyttää jääkaapissa. Näytteet säilyvät jääkaapinlämpötilassa korkeintaan yhden vuorokauden ajan. (Tuokko ym. 2008, 91.)

3.3 MRSA-näytteen rikastaminen

Bakteeriviljelyissä kasvaa yleensä etsityn bakteerilajin lisäksi ns. normaaliflooran bakteereja, jotka voivat vaikeuttaa patogeenisen bakteerilajin tunnistamista. Rikastamisen tarkoituksena on suosia etsittyä bakteerilajia toisten bakteerien kustannuksella valitsemalla sille sopivat kasvuolosuhteet. Rikastamista voidaan tehdä esimerkiksi sietokykyä hyväksikäyttämällä, kuten lisäämällä elatusaineeseen jotakin ainetta, jonka tiedetään olevan myrkyllistä muille bakteereille. (Salkinoja-Salonen 2002a, 58–59.) Tässä kehittämistyössä rikastukseen käytettiin nestemäistä elatusainetta, johon oli lisätty antibioottia, jonka toivottiin hillitsevän muiden bakteerien kuin MRSA:n kasvua.

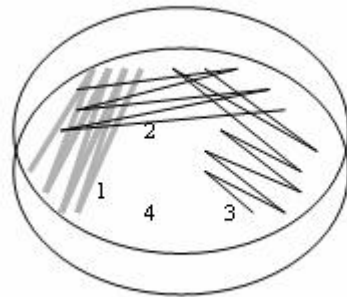
Kehittämistyössä itse rikastaminen suoritettiin kahdella eri tavalla. Perinteisen yksitaiten näytteiden rikastamisen ohella käytettiin poolirikastamista. Poolirikastusmenetelmässä kaksi tai kolme samasta potilaasta otettua näytettä yhdistetään yhteen rikastusputkeen, josta näytteet viljellään yhdelle viljelymaljalle. (Suomala 2009.)

3.4 Bakteerinäytteen viljely ja kasvatus

Mikrobiologian laboratoriossa käytetään bakteerien tunnistamisessa standardimenetelmänä bakteerien viljelyä kiinteille alustoille, eli maljoille, joissa on elatusainetta. Elatusaine sisältää bakteerin kasvamiseen tarvittavia ravinteita ja agarina, joka hyödyttää elatusaineen kiinteään muotoon. Maljoilta on mahdollista tehdä lajintunnistus- ja lääkeherkkyysmäärittämiä 1-2 vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Elatusaineeseen voidaan lisätä myös erilaisia kemikaaleja bakteerin tunnistamisen nopeuttamiseksi. (Katila 2003, 351.)

Mikrobiologisten näytteiden perustutkimusmenetelmänä käytetään hajotusviljelyä erilaisille elatusainemaljoille. Hajotusviljelyssä alkuperäistä näytettä levitetään vain pienelle osalle maljan pintaa. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi bakteerikuljetusputkessa olevalla näytteenottotikulla. Osalle maljan pintaa levitettyä näytettä levitetään edelleen puhtaalla viljelysauvalla asteittain koko maljan pinnalle. Viimeiselle hajotusalueelle saadaan näin vain murto-osa ensimmäisen viljelyalueen bakteereista (ks. kuva 2). (Carl-

son & Koskela 2005, 23.)



1. Viljele näytteenottotikulla noin neljännes verimaljasta tihein vedoin.
2. Viljele bakteriologisella viljelysauvalla noin puolet maljasta viemällä sauva muutaman kerran edellisten vetojen yli
3. Käännä sauva ja hajota edelleen noin neljäsosalle maljasta.
4. Jätä yksi neljäsosa viljelemättä

Kuva 2. Hajotusviljelytekniikka (TYKSLAB 2010).

Potilasnäytteestä suoraan tehdyssä hajotusviljelyssä kasvaa useita erilaisia bakteereita. Hajotusviljelyn tarkoituksena onkin saada erilaiset bakteerit kasvamaan erillisinä pesäkkeinä maljan pinnalla. Näistä yksittäisistä pesäkkeistä voidaan tarvittaessa tehdä puhtasviljelmä tai bakteerin tunnistamiseen liittyviä määrittäyksiä. (Matikainen ym. 2010, 115; Carlson & Koskela 2005, 23.)

Puhtasviljelyn tavoitteena on saada halutun bakteerin yksittäisiä erillisiä pesäkkeitä kasvamaan mahdollisimman puhtaana kiinteän elatusaineen pinnalla (Carlson & Koskela 2005, 23). Teknisesti puhtasviljely tehdään usein samalla tavalla kuin hajotusviljely, mutta puhtasviljelyssä on kuitenkin tärkeää vaihtaa puhtas viljelysauva aina ennen uutta hajotusta.

Bakteeriviljelyt kasvatetaan yleensä lämpökaapissa bakteerille suotuisissa olosuhteissa. Nykyisin käytetään yleisesti +35 °C lämpökaappeja, koska bakteerin luonnollisten kasvuolosuhteiden mukailemiseksi on tärkeää, että lämpötila ei ylitä ihmisen ruumiinlämpöä. Lämpökaappien lämpötilaa seurataan päivittäin kirjaamalla minimi- ja maksimilämpötilat seurantataulukkoon. Näin saadaan seurattua, että lämpötila ei myöskään laske lähelle +30 °C, sillä se hidastaa kliinisesti merkittävien bakteerien kasvua. (Katila 2003, 354.) Viljeltyt maljat tulee kasvattaa lämpökaapissa ylös alaisin käännettynä, jotta pesäkkeiden päälle ei tippuisi vettä, jota voi tiivistyä maljan kanteen (Salkinoja-Salonen 2002b, 81).

Mikrobiologisessa diagnostiikassa verimalja on yleisimmin käytetty epäselektiivinen bakteerimalja. Epäselektiivisyydellä tarkoitetaan sitä, että elatusaineeseen ei ole lisätty mitään bakteerin kasvua rajoittavaa ainetta. Verimaljoissa käytetään yleensä lampaanverta, koska sen avulla pystytään tarkastelemaan luotettavasti bakteerin mahdollisesti aikaansaamaa hemolyysiä eli punasolujen hajoamista. Hemolyysi tai sen puuttuminen helpottaa usein bakteerin lajintunnistusta. (Katila 2003, 352.)

Selektiivisiä viljelymaljoja ovat muun muassa kromogeeniset maljat, kuten tässä kehittämistyössä käytetty ChromID MRSA -malja. Kromogeenisten maljojen sisältämään elatusaineseokseen on liitetty yhdisteitä, jotka muodostavat tunnistuksessa käytettävän värin. Värinmuodostus perustuu spesifiseen entsyymi-substraattireaktioon, jonka lopputuotteena on värillinen bakteeripesäke. Kromogeenisten maljojen selektiivisyys voidaan saada aikaan esimerkiksi antibiooteilla, jolloin maljalla eivät kasva tietyille antibiootille herkät bakteerikannat. Yleensä kaupallisten kromogeenisten elatusaineiden koostumus on liikesalaisuus. Näin ollen niistä ilmoitetaan ainoastaan mahdollinen selektiivinen tekijä ja entsyymi, johon mikrobin tunnistus perustuu. Kromogeenisiä maljoja voidaan käyttää joko primaariviljelymaljoina tai mikrobien jatkotunnistustestauksessa. (Kärpänoja 2007, 39–40.)

3.5 *Staphylococcus aureuksen* tunnistaminen

Bakteerien tunnistukseen käytetään monia erilaisia diagnostisia menetelmiä. Tässä kehittämistyössä käsitellään vain tämän työn toteutuksessa käytettyjä menetelmiä, joilla tunnistetaan *S. aureus* ja MRSA. Tunnistaminen aloitetaan viljelymaljalla kasvavan pesäkkeen tarkastelusta. MRSA:han viittaava bakteerikasvu ilmenee tutkimuksessa käytetyillä ChromID MRSA -maljoilla selkeinä vihertävinä pesäkkeinä. Näistä pesäkkeistä tehtiin koagulaasi- ja latexagglutinaatio-testejä, puhdasviljelmiä, herkkyysmäärytyksiä ja MRSA-screen-testejä. Näitä eri testejä käsitellään työvaiheittain sekä tämän kehittämistyön teoria- että toteutusosiossa. Työvaiheiden järjestys laboratoriossa on esitetty näytteiden kulkua kuvaavassa kaaviossa (ks. liite 1).

Staphylococcus aureus voidaan erottaa muista stafylokokeista koagulaasi putkitestin avulla. Testissä tutkittavaa bakteeria lisätään plasmaa sisältävään koeputkeen. Samanai-

kaisesti tehdään myös positiivinen ja negatiivinen kontrolli tunnetuilla bakteerikannoilla. Putkia inkuboidaan neljä tuntia +35–37 °C:een lämpötilassa. Tämän jälkeen tarkistetaan, onko plasma hyytynyt. Hyytynyt näyte viittaa *S. aureukseen*, jonka tuottama vapaa koagulaasientsyymi saa plasmassa aikaan hyytymisen sitomalla plasman fibrinogeenia. (Esko 1995, 36.)

3.6 *Staphylococcus aureuksen* mikrobilääkeherkkyyden määrittäminen

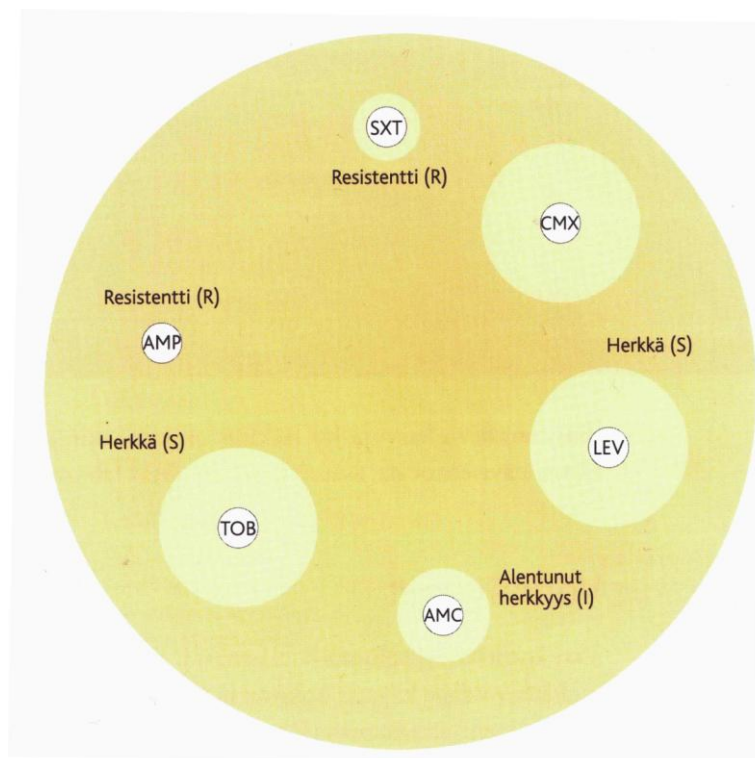
Laboriodiagnostiikassa on yleensä tärkeää bakteerilajin tunnistuksen lisäksi saada selville bakteerin mikrobilääkeherkkyys, jotta löydetään sopiva hoitomuoto (Karhumäki, Jonsson & Saros 2009, 198). Bakteerin herkkyysmäärittämiseen käytetään sellaisia lääkkeitä, joiden tiedetään tehoavan kyseiseen bakteeriin. (Nissinen 2006, 202).

Elimistössä bakteerien mikrobilääkeherkkyys on sidoksissa ympäristöön, bakteerien määrään ja kasvunopeuteen. Mikrobilääkkeen tehoa laboratorio-olosuhteissa kuvataan MIC-arvolla (Minimal Inhibitory Concentration), jolla tarkoitetaan lääkkeen pienintä estopitoisuutta kyseiselle bakteerille. Taudinhoitoon käytettävä lääkitys on vähintään 2-4 kertainen MIC-arvoon nähden. (Huovinen & Vaara 2005, 107; Vaara & Huovinen 1997, 349.)

Bakteerin lääkeherkkyys määritetään antibioottikohtaisten ohjeita noudattaen FiRe -standardin mukaisella S/I/R -asteikolla antibioottikiekon ympärille muodostuvan estorenkaan halkaisijan perusteella. Kyseisellä asteikolla S (*Susceptible*) tarkoittaa, että bakteerin herkkyys ei poikkea normaalista, jolloin infektoita voidaan hoitaa normaalilla lääkannostuksella. Jos bakteeri sietää normaalia korkeampia lääkannoksia, herkkyysmäärittäminen on I (*Indeterminate*). Mikäli bakteeri sietää huomattavasti normaalia korkeampia lääkainepitoisuuksia tai lääke ei tehoa kyseiseen bakteeriin, vastataan tulos R (*Resistant*). (FiRe Standardi - - 2009; Huovinen & Vaara 2005, 107–108; Vaara & Huovinen 1997, 349.) MRSA-kannat jotka tuottavat beetalaktamaasia vastataan resistentiksi kaikille penisillinaasiherkille penisilliineille. Oksasilliiniherkkyydeltään alentuneet MRSA-kannat vastataan resistentiksi myös kaikille beetalaktaameille. Kefoksiiniin resistentit ja oksasilliiniherkkyydeltään alentuneet kannat tulee varmistaa toisella menetelmällä. (FiRe Standardi - - 2009.)

Mikrobiologisessa laboriodiagnostiikassa herkkyysmäärittäykseen käytetään yleisesti antibioottikiekkomenetelmää. Herkkyysmäärittäminen tehdään kyseiseen tutkimukseen sopivalle viljelymaljalle, jolle levitetään tasainen McFarlandin asteikon mukainen bakteerisuspensio. McFarlandin asteikko on silmämääräisesti arvioitava bakteerisuspension tiheys, jossa 0,5 McFarlandia vastaa noin 10^8 elävää bakteeria/ml. (FiRe Standardi - - 2009.)

Herkkyysmäärittäksen peruselatusaineena tulee käyttää Müller-Hinton tai Iso-Sensitest-agaria, jotka on määritellyt suomalaisen standardimenetelmän, FiRe:n, mukaan. Valmiin maljan agarin pinnan tulee olla kirkas ja väritön tai lievästi kellertävä. (Nissinen 2002, 532.) Bakteerisuspension annetaan imeytyä agarille, ja kun malja on pintakuiva, asetetaan antibioottikiekkot sen pinnalle kiekkoannostelijalla tai pinseteillä kevyesti painaen. Oikein asetetusta antibioottikiekkosta alkaa välittömästi diffundoitua lääkettä agarin pinnalle, jolloin bakteerin kasvu antibioottikiekkon ympärillä estyy (ks. kuva 3). (FiRe Standardi - - 2009.)

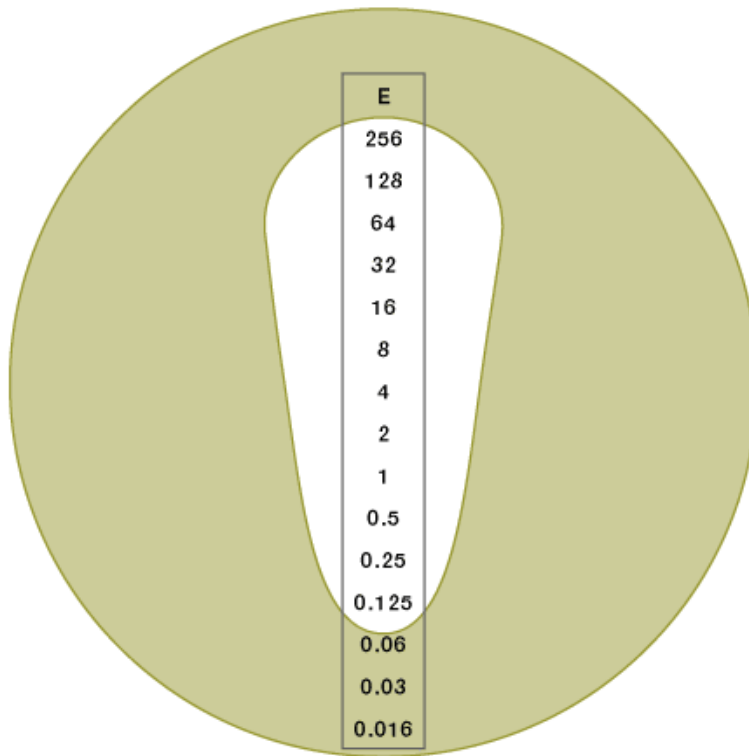


Kuva 3. Mikrobilääkeherkkyysmäärittäminen (Karhumäki ym. 2009, 199).

Mikrobilääkeherkkyyskiekkojen laatu on yksi menetelmän luotettavuuden kannalta keskeinen tekijä. Kiekot tulee suojata kosteudelta käytön ja säilytyksen aikana, jotta lääkkeen teho säilyy alkuperäisellä tasolla. Mikrobilääkekiekot on usein pakattu putkiloihin, jolloin ne sopivat suoraan niille suunniteltuihin kiekkoannostelijoihin. Kiekkoannostelijan käyttö helpottaa mikrobilääkekierokkojen asettamista oikeille etäisyyksille toisistaan. (Thermo Fisher Scientific 2010; Meurman & Nissinen 2006, 205–206.) Mikrobilääkekierokkojen valikoima vaihtelee laboratorioittain (Meurman & Nissinen 2006, 205–206.). Tässä kehittämistyössä stafylokokkiherkkyysmäärittäisiin käytetyt antibiootit on esitetty liitteessä 2.

Tässä kehittämistyössä herkkyysmäärittäisiin käytettiin ensisijaisesti kefoksitiinia sisältäviä antibioottikierokkoja. Kefoksitiini kuuluu kefalosporiineihin, jotka ovat vaikutusmekanismeiltaan penisilliinin kaltaisia mikrobilääkkeitä. Kefalosporiinit jaotellaan sukupolviin niiden vaikutusten ja historiallisen kehityksen perusteella. Ensimmäisen polven kefalosporiinit ovat tehokkaita yleisesti stafylokokkeja vastaan, mutta ne eivät kuitenkaan tehoa metisilliinille resistentteihin kantoihin. Kefoksitiini kuuluu toisen polven kefalosporiineihin, joiden teho on yleensä ensimmäisen polven lääkkeitä parempi. Muista kefalosporiineista poiketen kefoksitiini voidaan myös liittää kefamysiiniryhmään, koska sen rakenne eroaa muista kefalosporiineista ja se kestää hyvin bakteerien tuottamaa beetalaktamaasia. (Huupponen 2003, 807–810.)

Kiekkoherkkyysmäärittäysten lisäksi mikrobiologian diagnostiikassa käytetään kaupallisia Epsilon-testejä. E-testi on helppo ja käytännöllinen, mutta huomattavasti kiekkoherkkyysmäärittäystä kalliimpi, menetelmä esimerkiksi eräiden resistenttien bakteerien MIC-arvon määrittämiseksi. E-testi on ohut liuska, jossa on jatkuva gradientti bakteerilääkettä eli liuskan lääkepitoisuus kasvaa tasaisesti. Liuska asetetaan herkkyysmäärittämaljalle, johon on levitetty tasainen kerros bakteerisuspensiota. Liuskasta diffundoituu mikrobilääkettä maljan pinnalle, jolloin bakteerin kasvun estorenkasta tulee päärynän muotoinen (ks. kuva 4). Muoto syntyy kun tietty lääkepitoisuus estää bakteerin kasvun lähellä liuskaa. Mitä korkeampi lääkeainepitoisuus on, sitä suurempi on kasvun estoalue. (Huovinen & Vaara 2005, 108.)



Kuva 4. E-testin tekemä estorengas (Stegemann & Beckmann 1994).

3.7 MRSA:n tunnistaminen ja nimeäminen

MRSA Screen -agglutinaatiotesti on pikatesti MRSA:n tunnistamiseen. Testissä sekoitetaan keskenään kahta eri uuttureagenssiliuosta ja bakteeripesäkkeitä. Tämän jälkeen reagenssien ja bakteerien seos sentrifugoidaan ja tutkitaan seoksesta saadun supernatantin ja testilateksin reaktiota. Kyseiset aineet reagoivat keskenään, mikäli bakteeri sisältää penisilliiniä sitovaa proteiinia (PBP2'). Reaktio tapahtuu, jos kyseessä on MRSA, jolloin supernatantti ja testilateksi muodostavat agglutinaation kymmenen minuutin kuluessa. Testin toimivuus varmistetaan vertaamalla saatua tulosta supernatantin ja kontrollilateksin reaktioon, joka ei saa muodostaa agglutinaatiota. (Hardy diagnostics 2010; Denka-Seiken 2009.)

MRSA:n tunnistamisen jälkeen seuraa MRSA-kannan nimeäminen. Suomessa tämä tapahtuu spa-geenin tyypityksellä. Tyypityksessä käytetään hyväksi spa-geenin toistojaksojen vaihtelevaa määrää. Näin saadaan neli- tai viisimerkkinen Spa-tyyppi, jonka avulla kantoja voidaan vertailla myös kansainvälisesti. MRSA-kanta voidaan tarvittaessa tyypittää myös muilla menetelmillä, joista yleisin on pulssikenttägeelielektroforeesin

eli PFGE:n käyttö. (Mustala 2010.) PFGE:n käyttö on kuitenkin työlästä ja hidasta, sillä analyysi kestää tällä menetelmällä kokonaisuudessaan noin viikon. Lisäksi PFGE:n tulosten vertailtavuudessa on ongelmia. (Salmenlinna, Lyytikäinen, Kanerva & Vuopio-Varkila 2004.) Suomessa kaikki MRSA-kannat tyypitetään ja nimetään keskitetysti Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen toimesta (Vuopio-Varkila 2005a, 180–182; Vuopio-Varkila 2005b).

3.8 Tutkimusmenetelmien validointi mikrobiologian laboratoriossa

Validoinnilla tarkoitetaan tutkimusmenetelmän kelpoisuuden osoittamista. Sen avulla varmistetaan, että käyttöön otettava menetelmä tuottaa toistettavia ja luotettavia tuloksia. Primäärinen eli perusvalidointi tehdään, kun halutaan ottaa käyttöön kokonaan uusi tai muutettu menetelmä. Sekundaarinen validointi puolestaan tehdään silloin, kun laboratorio haluaa varmistaa valmiin, aiemmin validoidun, menetelmän toimivuuden. (Liimatainen 2002, 12.)

Kliinisessä mikrobiologiassa validoinnissa ei ole käytössä vakiintuneita käytäntöjä esimerkiksi tutkittavien näytteiden minimilukumäärästä. Usein ongelmia tuottaa positiivisten näytteiden vähäisyys tutkimusaineistossa, jolloin näytteitä joudutaan korvaamaan itse valmistetuilla näytteillä. Kliinisen mikrobiologian laboratoriossa menetelmien validoinnissa käytetään usein samoja rinnakkaisia näytteitä eri menetelmien vertailussa. (Liimatainen 2002, 12.)

4 AIKAISEMPIA TUTKIMUKSIA MRSA-DIAGNOSTIIKASTA

MRSA-diagnostiikka on jatkuvan tutkimuksen ja kehittämisen kohteena. Aiheesta on tehty useita tutkimuksia, joissa vertaillaan erilaisia mikrobiologisia ja molekyylibiologisia menetelmiä. Seuraavaksi esitellään muutamia tutkimuksia, joissa on käsitelty MRSA-diagnostiikan kehittämistä yleisesti ja vertailtu erilaisia menetelmiä.

Kanta-Hämeen keskussairaalassa tehdyssä tutkimuksessa MRSA-diagnostiikkaa kehitettiin vertailevan tutkimuksen avulla. Tunnettua MRSA-kantaa viljeltiin kuudelle eri maljalle sekä rikastettuna että ilman rikastusta. Käytetyt maljat olivat lampaanveri-, Orsab-o, mannitolisuola-, Orsab-k, CHROMagarTM MRSA ja MRSA ID -malja. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miltä kasvualustalta MRSA-kannat löydetään nopeimmin ja parhaiten. Tarkkuus maljojen välillä vaihteli 78–85 %. Nopeimmin ja tarkimmin MRSA-kannat löytyivät MRSA ID -maljalta. Rikastamisen avulla löydettiin lisäksi yksi kanta, jota ei havaittu rikastamattoman maljaviljelyn perusteella. Rikastaminen yhdistettynä MRSA ID -maljan käyttöön ilmenikin tutkimuksessa tehokkaimmaksi tavaksi tunnistaa MRSA. (Laine & Laaksonen-Heikkilä 2008, 13–14.)

Journal of Clinical Microbiology lehdessä elokuussa 2007 julkaistussa artikkelissa verrattiin kahta molekylaarista menetelmää ja kolmea selektiivistä maljaa MRSA-diagnostiikan kannalta. Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata PCR-menetelmiä maljaviljelyyn ja selvittää onko PCR:n käytöllä nopeuden lisäksi myös muita etuja. Molekylaarisina menetelminä käytettiin IDI-MRSA PCR -analyysiä ja GenoType MRSA suoraa PCR-analyysiä. Käytetyt maljat olivat puolestaan MRSA ID, MRSASelect ja CHROMagar MRSA. Käytetyistä menetelmistä herkin oli IDI-MRSA PCR. Molekylaariset menetelmät olivat kuitenkin viidestä kuuteen kertaan kalliimpia kuin viljelymenetelmät, joten laboratorioden on kannattavampaa käyttää diagnostiikassa pääasiassa maljaviljelyä. Myös tässä tutkimuksessa MRSA ID -malja oli muita maljoja tarkempi. (van Hal ym. 2007, 2486–2490.)

Boycen ja Havillin tutkimuksessa (2008, 350–351) verrattiin molekylaarista BD Gene-Ohm MRSA PCR -menetelmää ja CHROMagar maljaviljelyä. Tulokset olivat hyvin samankaltaisia kuin edellä mainitussa tutkimuksessa: PCR-menetelmä todettiin olevan

maljaviljelyyn verrattuna herkempi ja nopeampi, mutta myös kalliimpi menetelmä.

Malhotra-Kumarin ym. tutkimuksessa (2010, 1040–1045) arvioitiin ja verrattiin viiden erilaisen kromogeenisen maljan suorituskykyä MRSA:n havaitsemisessa. Tutkimuksessa käytettiin Brilliance MRSA agar, ChromID MRSA, MRSASelect-, CHROMagar- ja BBL-CHROMagar-maljoja. Tutkimuksen mukaan kaikki maljat soveltuvat hyvin MRSA:n seulontatutkimuksiin. Parhaimmat tulokset MRSA:n havaitsemiseen antoivat BBL-CHROMagar- ja CHROMagar-maljat. Heikoimmat tulokset saatiin Brilliance MRSA agar ja ChromID MRSA -maljoilta, sillä niiltä löytyi eniten vääriä positiivisia tuloksia.

Kerttulan (2007, 52–59) väitöskirjassa arvioitiin muun muassa kliinisen mikrobiologian laboratorion MRSA-diagnostisia menetelmiä ja MRSA:n tunnistamista. Tutkimuksessa todettiin kefoksitiini-antibioottitestin ennustavan parhaiten *Staphylococcus aureuksen* metisilliiniresistenssiä. Toinen tutkimuksen osa keskittyi pitkäaikaishoitolaitosten Metisilliiniresistenttien- ja Metisilliiniherkkien *Staphylococcus aureusten* (MRSA & MSSA) -kantajiin. Tutkimuksessa tutkittiin kahta hoitolaitosta. Tutkimuksessa selvitettiin näytteenottoaikkojen lukumäärän ja rikastusviljelyn käytön vaikutuksia MRSA:n ja MSSA:n löytymiseen. Tutkimuksen tuloksena havaittiin, että perineum-näytteiden otto sekä rikastusviljelyn käyttö yhdistettynä nenä- ja haavanäytteiden ottoon voisi korvata nielunäytteiden oton.

5 KEHITTÄMISTYÖN TARKOITUS

Tämän kehittämistyön tarkoituksena oli MRSA-laboratoriodiagnostiikan kehittäminen ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Työn tavoitteena oli selvittää tehostaako näytteiden rikastaminen MRSA:n tunnistamista.

Kehittämistyö koostui kahdesta alatavoitteesta. Ensimmäisenä alatavoitteena oli vertailla kahta laboratoriomenetelmää: yksittäisten MRSA-näytteiden rikastusviljelyä ja poolirikastamista eli useamman samasta potilaasta otetun näytteen yhdistämistä samaan rikastusviljelyyn. Näin pyrittiin selvittämään sopiiko poolirikastaminen MRSA-laboratoriodiagnostiikkaan ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Kehittämistyön toisena alatavoitteena oli selvittää MRSA:n esiintyvyyttä päivystyspoliklinikan kautta osastoille sisään otettavilla potilailla Mikkelin keskussairaalassa.

6 KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS

6.1 Kehittämistyöprosessi

Tämä opinnäytetyö toteutettiin kehittämistyönä, joka on vaihtoehto niin sanotulle tutkimukselliselle opinnäytetyölle. Kehittämistyöllä tarkoitetaan toimintaa, jonka tavoitteena on luoda uusia tai entistä parempia palveluja, tuotantovälineitä tai -menetelmiä. Kehittämistyössä hyödynnetään yleensä tutkimuksesta saatuja tuloksia, vaikka kehittäminen on mahdollista myös ilman tutkimusta. (Heikkilä, Jokinen & Nurmela 2008, 21; Vilka & Airaksinen 2004, 9–10, 51–58.)

Kehittämistyölle ominaisia piirteitä ovat tavoitteellisuus, suunnitelmallisuus, järjestelmällisyys sekä toiminnan ja menetelmien kriittinen arviointi. Laadukkaaseen tutkivaan kehittämiseen kuuluu myös aikaisemman tutkimus- ja kokemustiedon hyödyntäminen. (Heikkilä ym. 2008, 57.)

Kehittämistyötä voidaan ajatella prosessina, joka etenee vaiheittain. Tyypilliset vaiheet ovat ideointi, suunnittelu, toteutus, työn arviointi ja tulosten hyödyntäminen. (Heikkilä ym. 2008, 57–135.) Ideointi ja esisuunnittelu tähän kehittämistyöhön saatiin valmiina ISLAB:n sairaalamikrobiologilta ja Mikkelin keskussairaalan infektioylilääkäriltä maaliskuussa 2009. Kehittämistyön suunnittelu toteutettiin kevään 2009 aikana laatimalla tutkimussuunnitelma. Työn toteutus ajoittui kesäkuulle 2009, jolloin kerättiin potilasnäytteet ja analysoitiin ne kahdella eri menetelmällä. Työn toteutus on käsitelty tarkemmin tässä luvussa (ks. luvut 6.2–6.4). Kehittämistyön arviointia ja hyödyntämistä tarkastellaan puolestaan luvussa 7.

6.2 Tutkimusnäytteiden kerääminen

Varsinaiseen laboratoriotyöskentelyyn oli varattu kolme viikkoa, joista kaksi ensimmäistä oli tarkoitus käyttää tutkimusnäytteiden keräämiseen (ks. liite 3). Tutkimuksen aikana oli suunniteltu kerättäväksi noin 200 potilasnäytettä. Näytteiden tavoitemäärään

ei kuitenkaan päästy varatussa ajassa, joten näytteiden keräämisaikaa jatkettiin. Tutkimusnäytteitä saatiin 140 potilaasta. Tutkimuksen aikana potilasnäytteistä tehtiin laboratoriomäärytyksiä MRSA:n tunnistamista varten. Nämä laboratoriomäärytykset ovat esitetty liitteessä 4.

Näytteiden keräämiseen tarvittavat välineet koottiin valmiiksi pakkauksiksi Mikkelin keskussairaalan päivystyspoliklinikan hoitajia ja lääkäreitä varten. Pakkaus sisälsi kuusi bakteerinkuljetusputkea (Coban M40), jotka sisälsivät näytteenottotikut ja ohjeet näytteenottoa varten. Ohjeet ovat esitettynä liitteessä 5. Bakteerinkuljetusputkiin oli valmiiksi merkitty näytteenottokohdat nenä 1, nenä 2, nielu 1, nielu 2, iho/ihorikko/haava 1 ja iho/ihorikko/haava 2. Näytteenottopakkaukset toimitettiin päivystyspoliklinikalla niille varattuun paikkaan, josta ne olivat helposti saatavilla potilaan sisään kirjauksen yhteydessä. Päivystyspoliklinikan hoitohenkilökunta suoritti näytteenoton yleisten näytteenotto-ohjeiden ja tutkimukseen kuuluvan lisäohjeistuksen vaatimalla tavalla, kun potilaalta oli saatu suostumus tutkimukseen osallistumisesta. Potilaalle esitetty tiedote tutkimuksesta on liitteessä 6. Näytteenoton jälkeen näytepakkauksia säilytettiin jääkaapissa, josta ne noudettiin mikrobiologian laboratorioon analysointia varten kaksi kertaa päivässä.

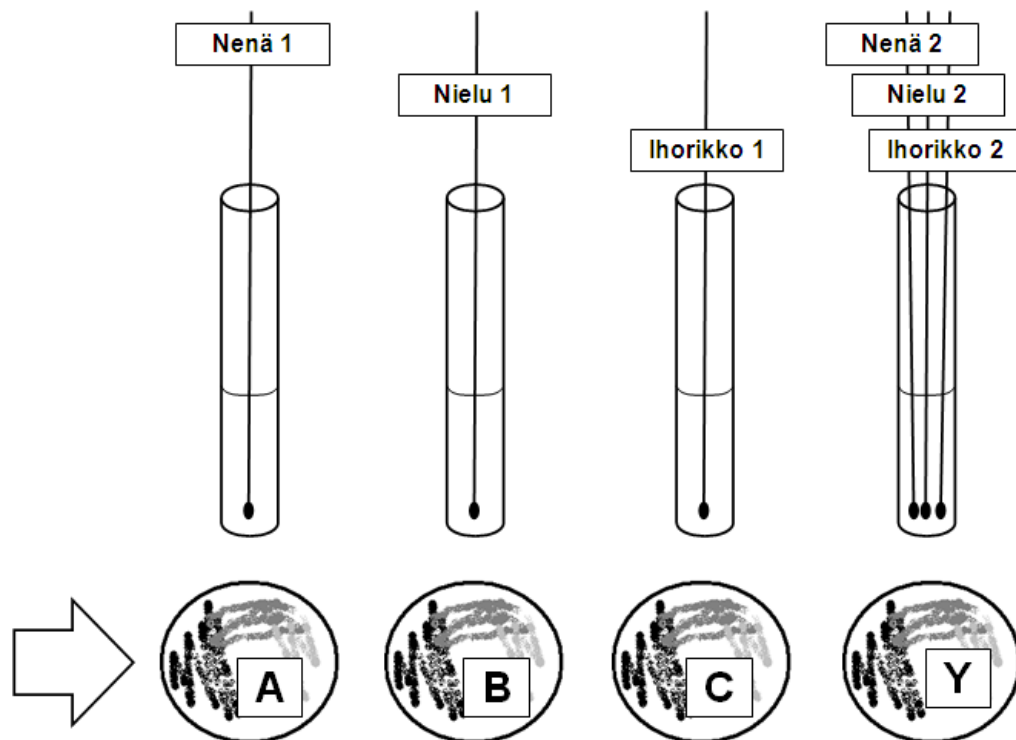
6.3 Tutkimusnäytteiden rikastaminen ja viljeleminen

Ennen näytteiden analysointia kirjattiin kaikki näytteet MRSA-työjonoon, jolloin ne saivat näytenumeron. Jokaiseen jonossa olevaan näytteeseen kuului neljästä kuuteen näytetikkoa, joita käsiteltiin samalla tutkimusnumerolla. Näytenumeron lisäksi rikastamisen yhteydessä näytteelle annettiin myös kirjaintunnus A, B, C tai Y. A tarkoitti nenä 1:stä, B nielu 1:stä, C iho/ihorikko/haava 1:stä ja Y merkitsi kakkosnäytteistä tehtyä poolia, eli kaikkien kakkostikkujen yhdistämistä poolirikastusmenetelmää varten (ks. taulukko 2).

Taulukko 2. Kirjaintunnusten selitykset.

Kirjaintunnus	Näyte
A	nenä 1
B	nielu 1
C	iho/ihorikko/haava 1
Y	nenä 2 nielu 2 iho/ihorikko/haava 2

Jonoon kirjaamisen jälkeen näytetikut siirrettiin kirjaintunnusten mukaisesti jaoteltuihin rikastusputkiin. Rikastettuja näytteitä inkuboitiin lämpökaapissa (+35°C) vähintään 18 tuntia, jonka jälkeen ne viljeltiin MRSA spesifisille kromogeenisille maljoille. Yksittäiset A, B ja C-näytteet viljeltiin kukin omille kromogeenisille maljoille, kun taas kaikki Y-näytteet viljeltiin samalle kromogeeniselle maljalle (ks. kuva 5).



Kuva 5. MRSA-näytteiden rikastaminen ja poolirikastaminen sekä niiden viljely.

Maljoja inkuboitiin +35 °C:ssa kaksi vuorokautta ja niitä tarkasteltiin ensimmäisen ker-
ran vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Mikäli maljoissa kasvoi tällöin selkeitä vihertä-
viä pesäkkeitä, tehtiin niistä jatkotutkimuksia (ks. liite 1). Toisen vuorokauden kasva-
tuksen jälkeen tehtiin jatkotutkimuksia (ks. liite 1) myös sellaisista pesäkkeistä, jotka
eivät vastanneet ulkonäöltään täysin MRSA:n oletettua kasvua. Näin pyrittiin varmis-
tamaan, ettei yhtään MRSA-tapausta jäisi tutkimatta. Tämän lisäksi haluttiin selvittää,
minkä bakteerin kasvu muistuttaa ulkonäöltään MRSA:lle tyypillistä kasvua.

6.4 *Staphylococcus aureuksen* ja MRSA:n tunnistaminen

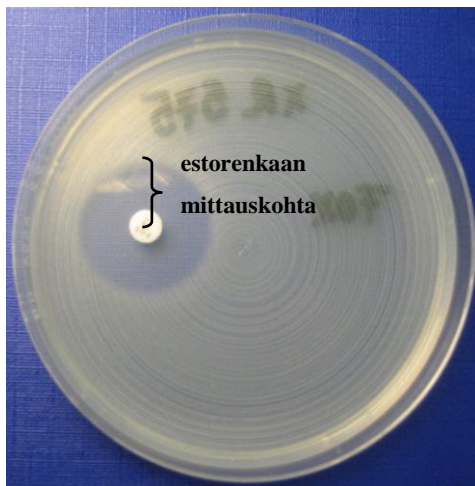
Staphylococcus aureus erotettiin muista tutkittavista bakteeripesäkkeistä Staphaurex
Plus -latex-tunnistuksen avulla. Kyseinen testi on kaupallinen pikatesti, jossa sekoitetaan
testireagenssia ja maljalta poimittua bakteerimassaa. Testin tulos on positiivinen, mikäli
reaktiossa syntyy silmin nähtävää sakkaa eli agglutinaatio. Tyypillisen näköisestä *S.*
aureus -pesäkkeestä tehtiin myös koagulaasiputkitesti, mikäli latex-testi oli antanut ne-
gatiivisen tuloksen. *S. aureukseksi* todetuista pesäkkeistä tehtiin puhtasviljelmä veri-
maljalle (ks. kuva 6). ChromID MRSA -maljoilla puhtaana kasvavista bakteeripesäk-
keistä tehtiin puolestaan suoraan mikrobilääkeherkkyysmäärittämiä.



Kuva 6. *Staphylococcus aureuksen* kasvua puhtasviljelmänä verimaljalla.

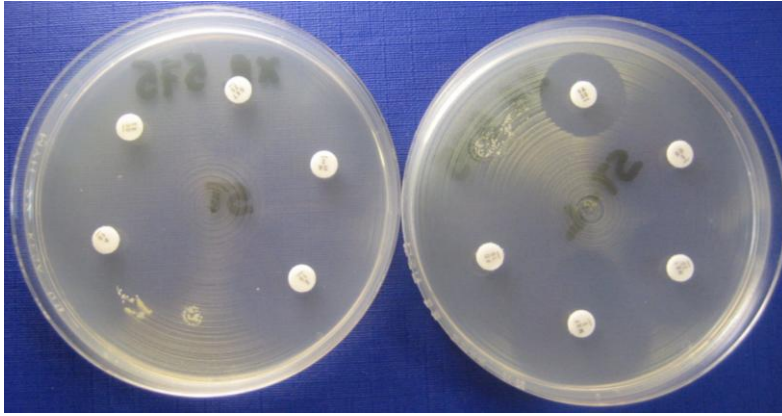
Mikrobilääkeherkkyysmäärittäykset aloitettiin tekemällä kefoksitiinitesti. Tätä määrittä-
varten bakteeripesäkkeestä valmistettiin 0,5 McFarlandin asteikon vahvuinen baktee-
risuspensio 0,9 % NaCl-liuokseen. Tähän suspensioon kostutellulla puuvartisella vanu-

tikulla levitettiin Müller-Hinton -maljalle tasainen bakteerikerros. Tasaisen bakteerikerroksen päälle asetettiin atuloilla antibioottikiekkko, joka sisälsi kefoksitiinia. Malja laitettiin lämpökaappiin (+35 °C) kasvamaan yhdeksi vuorokaudeksi. Seuraavana päivänä maljalta mitattiin kefoksitiinikiekkon ympärille muodostuneen renkaan ulkoreunan etäisyys antibioottikiekkon keskustasta (ks. kuva 7). Mikäli kyseinen etäisyys oli selvästi pienentynyt (<19 mm), tulos viittasi resistenttiin tai herkistyneeseen *Staphylococcus aureus* -bakteeriin.

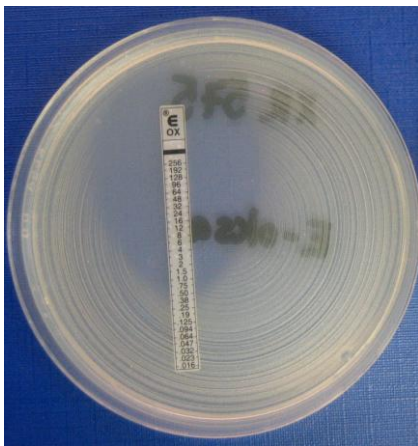


Kuva 7. Kefoksitiinin herkkyysmääritys ja estorengas.

Kefoksitiini herkkyydeltään alentuneita *Staphylococcus aureus* -kantoja löydettiin vain kahdesta potilasnäytteestä. Näistä näytteistä tehtiin uusi 0,5 McFarlandin bakteerisuspensio 0,9 % NaCl-liuokseen, josta levitettiin tasainen bakteerikerros kahdelle Müller-Hinton -maljalle. Toiselle maljalle laitettiin stafylokokkiherkkyyspaneeli STA1 ja toiselle stafylokokkilisäherkkyyspaneeli STA2 (ks. kuva 8), joiden sisältämät antibiootit on esitetty liitteessä 2. Näitä maljoja kasvatettiin jälleen yksi vuorokausi lämpökaapissa (+35 °C), jonka jälkeen mitattiin estorengaat antibioottikiekkojen ympäriltä. Mikäli tiettyjen antibioottien estorengaat olivat pienentyneet, tehtiin vielä jatkotutkimuksena E-testi (ks. kuva 9). Estorenkaiden tulkintarajat (mm) on määritelty FiRe-standardissa, mutta niissä on laboratoriokohtaisia tulkintaeroja, kuten käytössä olevissa mikrobilääkkeissä (FiRe Standardi - - 2009).



Kuva 8. Herkkyysmääritykset STA1- ja STA2-kiekkopaneeleilla.

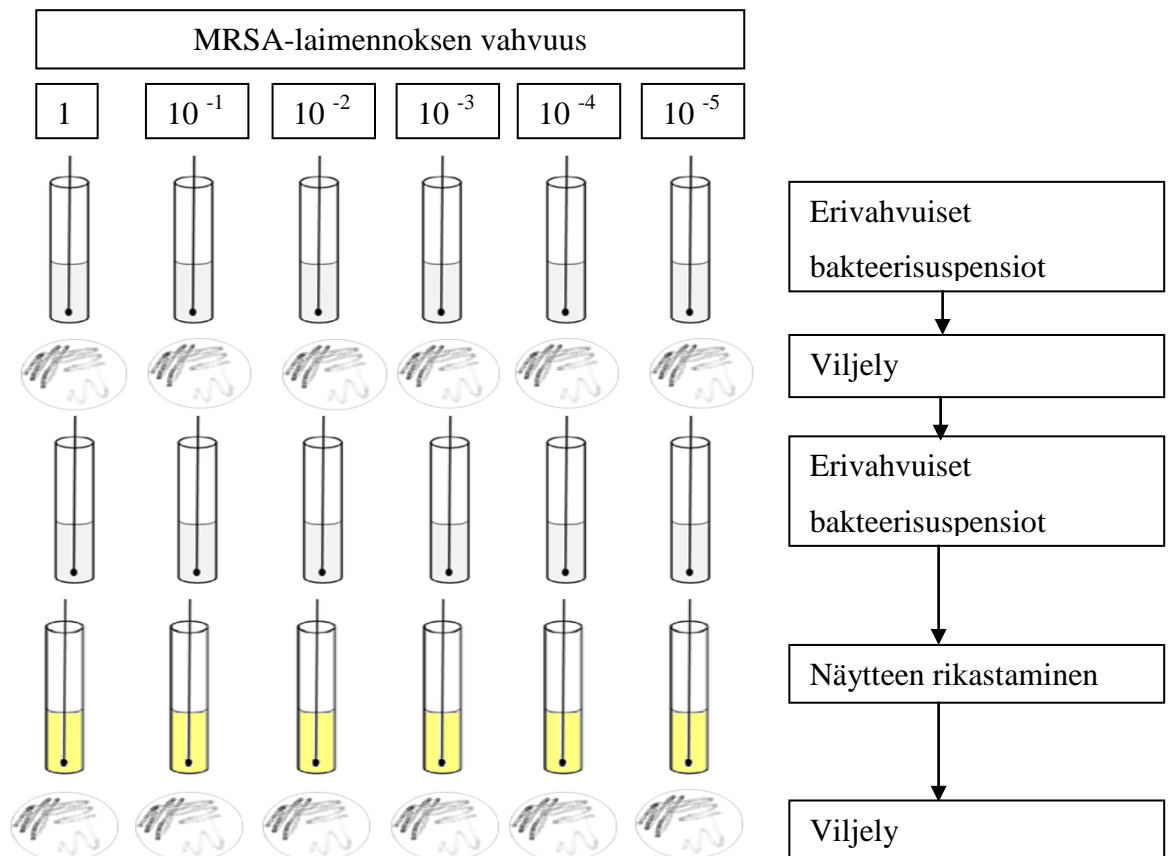


Kuva 9. Epsilon-testi.

Oksasilliini E-testejä varten valmistettiin 0,5 McFarlandin bakteerisuspensio, jota levitettiin Müller-Hinton -maljalle, johon asetettiin E-testiliuska. Tämän E-testin tuloksen perusteella yksi potilasnäytteistä oli oksasilliini herkkydeltään alentunut, joten tulos viittasi MRSA-kantaan. Positiiviseksi epäillylle näytteelle tehtiin MRSA-screen pikatesti, josta saatiin vahvistus positiiviselle tulokselle. Näin ollen näytteestä taltioitiin MRSA-kanta maitoseokseen, joka laitettiin säilytykseen laboratorion pakastimeen. Näytteestä tehtiin myös kahdet puhdasviljelmät veri- ja ChromID MRSA -maljoille. Puhdasviljelmistä toiset lähetettiin Kuopioon ISLAB:n kliinisen mikrobiologian laboratorioon *megA*-geenin määrittämiseksi ja toiset KTL:lle (nyk. THL) MRSA-kannan tyyppi-tykseen.

6.5 MRSA-rikastuksen testaus tunnetulla MRSA-bakteerikannalla

MRSA-seulonnan aikana kerättyjen potilasnäytteiden positiivisten tulosten vähäisyyden takia rikastusmenetelmiä ei pystytty vertaamaan halutulla tavalla. Tämän vuoksi tutkimusta päätettiin laajentaa tekemällä kaksi laimennossarjaa, joilla haluttiin testata rikastuksen tehoa MRSA:n tunnistamiseen. Laimennossarjat tehtiin lisäämällä bakteereita koeputkeen, jossa oli 0,9 % NaCl-liuosta. Laimennossarjan bakteeriseokset sisälsivät potilasnäytteiden normaaliflooraa johon oli lisätty tunnettua MRSA-bakteerikantaa. Näin tehtyä bakteerisuspensiota laimennettiin koeputkesta toiseen 1:10 portaittain. Ensimmäinen laimennossarja sisälsi yhteensä kuusi bakteerisuspensiota, joista vahvin oli alkuperäiseen koeputkeen tehty bakteeriseos. Heikoin bakteerisuspensio oli sarjan viimeinen laimennos, joka sisälsi vain 1:100 000 (10^{-5}) osan alkuperäisiä bakteereja (ks. kuva 10).

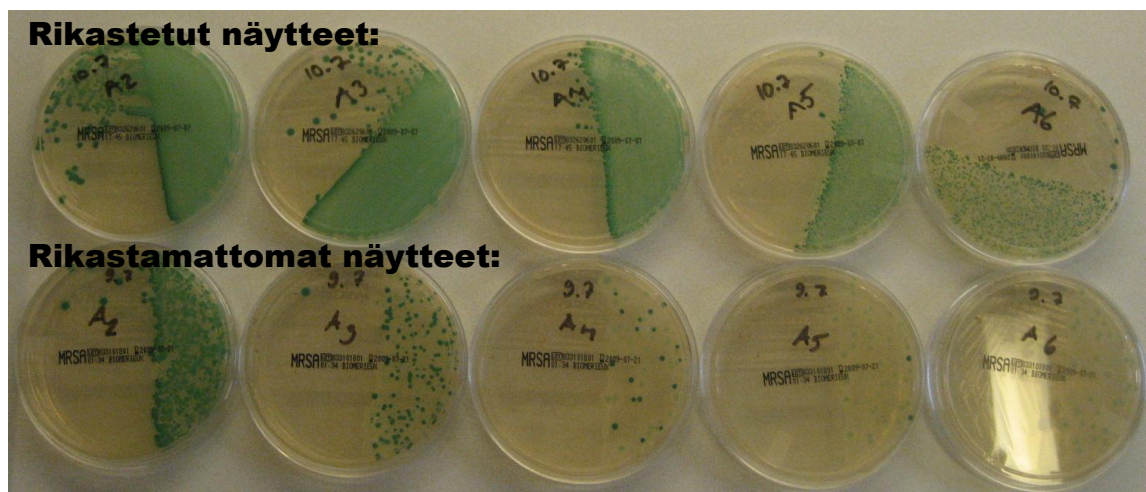


Kuva 10. MRSA-näytelaimennosten viljely ja rikastusviljely.

Tällä ensimmäisellä laimennossarjalla ei saatu selkeitä eroja rikastetun ja rikastamatto-

man näytteen välille, joten tehtiin toinen laimennossarja. Toinen laimennossarja tehtiin samalla tavalla kuin ensimmäinen, mutta laimennosta jatkettiin pidemmälle niin, että sarjan viimeinen, eli kymmenes koeputki sisälsi yhden miljardisosan (10^{-9}) alkuperäisiä bakteereja. Toisessa laimennossarjassa alkuperäisestä bakteerisuspensiosta laimennettiin edelleen yhteensä yhdeksään koeputkeen.

Molempia laimennossarjoja tehtiin samanaikaisesti neljä rinnakkain, jotta rikastettujen ja rikastamattomien näytteiden viljelytuloksia voitaisiin vertailla mahdollisimman luotettavasti. Erivahvaisista MRSA-laimennoksista tehtiin ensin suoraan viljelyt ChromID MRSA -maljoille, joita inkuboitii (+35 °C) kaksi vuorokautta. Näissä viljelyissä käytetyt viljelytikut kastettiin viljelyn jälkeen uudelleen alkuperäisiin erivahvaisiin MRSA-laimennoksiin ja siirrettiin sen jälkeen omiin MRSA-rikastusputkiin, joita inkuboitii (+35 °C) yön yli. Seuraavana aamuna inkuboiduilla viljelytikuilla tehtiin uudet viljelyt ChromID MRSA -maljoille (ks. kuva 11). Näitä maljoja inkuboitii jälleen yön yli (+35 °C). Seuraavana aamuna tarkasteltiin rikastettujen ja rikastamattomien näytteiden bakteerikasvustoa. Kuvassa 11 on esimerkkinä ensimmäisen laimennossarjan rikastettujen ja rikastamattomien näytteiden bakteerikasvustoa. Ylärivissä ovat ennen viljelyä rikastetut näytteet ja alarivissä suoraan bakteerisuspensiosta viljeltyt maljat. Kuvasta voidaan havaita rikastuksen tehostavan MRSA:n kasvua rikastamattomiin näytteisiin verrattuna. Laimennossarjojen tuloksia tarkastellaan tarkemmin pohdinnassa (ks. luku 7).



Kuva 11. Ensimmäisen laimennossarjan rikastetut ja rikastamattomat MRSA-viljelynäytteet

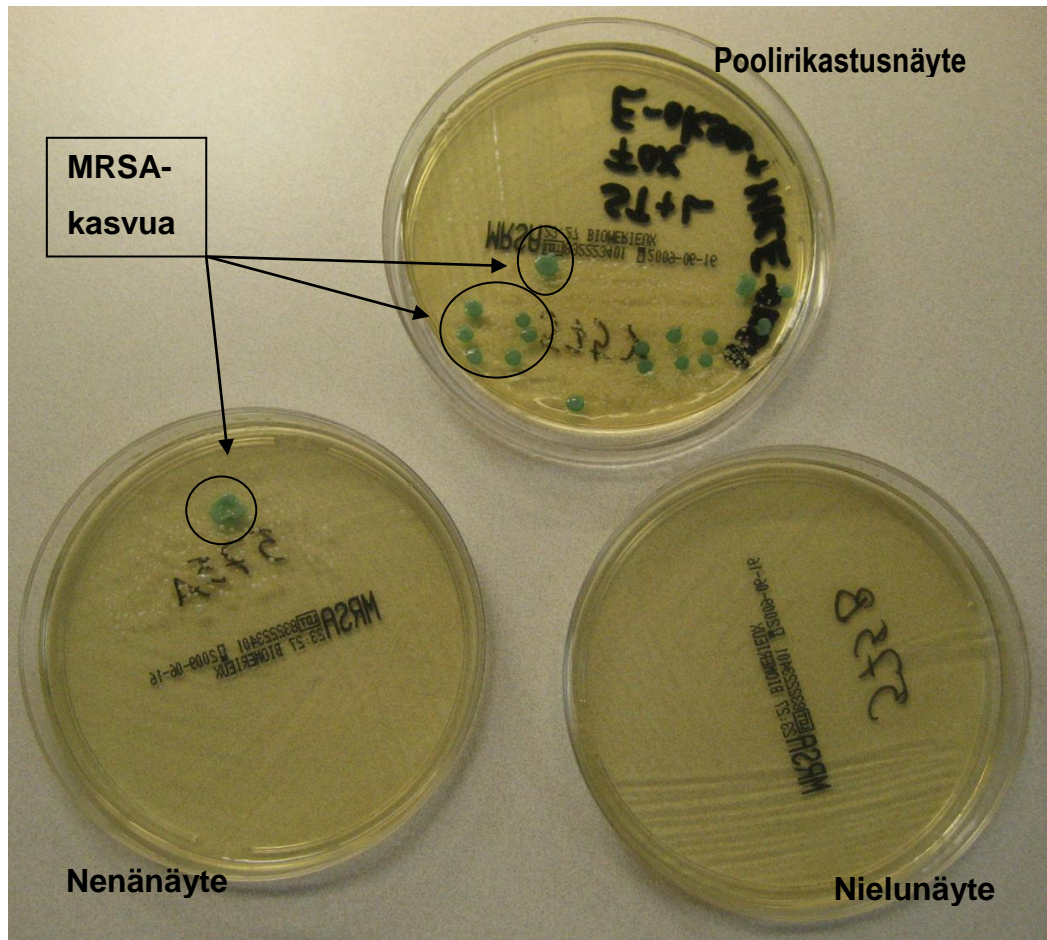
7 KEHITTÄMISTYÖN TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

7.1 Kehittämistyön tulosten ja toteutuksen tarkastelu

Tämän kehittämistyön tarkoituksena oli MRSA-laboratoriodiagnostiikan kehittäminen ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Työn tavoitteena oli selvittää tehostaako näytteiden rikastaminen MRSA:n tunnistamista. Rikastamisen tehoa selvitettiin kahdella tavalla. Ensimmäiseksi vertailtiin kahta eri rikastusmenetelmää, yksittäisrikastamista ja poolirikastamista, keskenään. Tältä osin tavoitteena oli myös selvittää sopiiko poolirikastaminen MRSA-laboratoriodiagnostiikkaan ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Toiseksi rikastamisen tehoa selvitettiin tunnettua MRSA-kantaa sisältävien laimennossarjojen avulla vertaamalla rikastettujen ja rikastamattomien näytteiden bakteerikasvua. Laboratoriodiagnostiikan kehittämisen ohella kehittämistyön tutkimusnäytteiden avulla oli tavoitteena myös selvittää MRSA:n esiintyvyyttä päivystyspoliklinikan kautta osastoille sisään otettavilla potilailla Mikkelin keskussairaalassa. Seuraavaksi kehittämistyölle asetettujen tavoitteiden saavuttamista tarkastellaan ja arvioidaan yksi kerrallaan.

Yksittäisrikastamisen ja poolirikastamisen vertailu. MRSA-näytteiden rikastamista ja poolirikastamista vertailtiin potilailta otettujen tutkimusnäytteiden perusteella. Laboratoriotutkimuksissa analysoitavaksi saatiin yhteensä 140 potilaan näytteet, jotka tutkittiin samanaikaisesti molempia rikastusmenetelmiä käyttäen.

Näytteiden analysoinnin jälkeen vain yhden potilaan näyte osoittautui positiiviseksi MRSA-löydökseksi. Kyseisen potilaan nenä 1 ja nielu 1 -näytteiden viljelyt sekä nenä 2 ja nielu 2 -näytteistä yhdistetyn poolirikastusnäytteen viljely on esitetty kuvassa 12. Kuvasta ilmenee, että nielunäytteen viljelyssä ei kasvanut bakteeripesäkkeitä. Nenä-näytteen viljelyssä kasvoi yksi bakteeripesäke ja poolirikastusnäytteen viljelyssä oli selkeää bakteerikasvua. Tämä tulos tukee osaltaan poolirikastamista hyödyllisenä menetelmänä MRSA:n tunnistamiseen.



Kuva 12. Positiivinen MRSA-löydös.

Maljoilla havaittavat erot bakteerikasvussa voivat selittyä sillä, että kyseinen potilas kantaa MRSA:ta nenässään, jolloin nielunäyte voi olla puhdas, kuten kuvassa 12. Bakteerikasvun erot maljoilla voivat tosin johtua osin rikastusmenetelmästä riippumattomista tekijöistä. Esimerkiksi poolinäytteen parempi bakteerikasvu voi johtua ensimmäistä näytettä paremmasta nenä 2 -näytteestä. On myös mahdollista, että nielu 1 -näyte on epäonnistunut, eikä bakteerikasvua sen vuoksi ole lainkaan nielunäytemaljalla.

Menetelmävertailun kannalta oli valitettavaa, että MRSA-positiivisia löydöksiä ei ollut muissa tutkimusnäytteissä. Varsin yksipuoliseksi osoittautuneen aineiston perusteella ei voitu arvioida luotettavasti kummankaan rikastusmenetelmän toimivuutta. MRSA-positiivisten löydösten vähäisyydestä huolimatta kehittämistyön avulla saatiin kuitenkin arvokasta kokemusta molempien rikastusmenetelmien käytöstä MRSA-diagnostiikassa ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa.

Menetelmänä MRSA-näytteiden poolirikastamisen etu on laboriodiagnostiikkaan

kuuluvien tarvikkeiden ja työn tekemiseen kuluvan ajan suhteellinen säästö yksittäisrikastamiseen verrattuna. Tarvikekustannuksissa säästetään esimerkiksi kun kolme näytettä analysoidaan yhtenä näytteenä, jolloin tarvitaan kaksi rikastusputkea ja kromogeenista maljaa vähemmän kuin ilman näytteiden yhdistämistä. Näin vuositasolla säästettyjen tarvikkeiden määrä on huomattava. Poolirikastusmenetelmän käyttö edistääkin osaltaan kestäväää kehitystä. Tämän kehittämistyön perusteella ei kuitenkaan voida arvioida poolirikastusmenetelmän sopivuutta MRSA-laboriodiagnostiikkaan ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa. Kehittämistyön toteutuksen jälkeen poolirikastusmenetelmän testausta on kuitenkin jatkettu toisessa ISLAB:n aluelaboratoriossa.

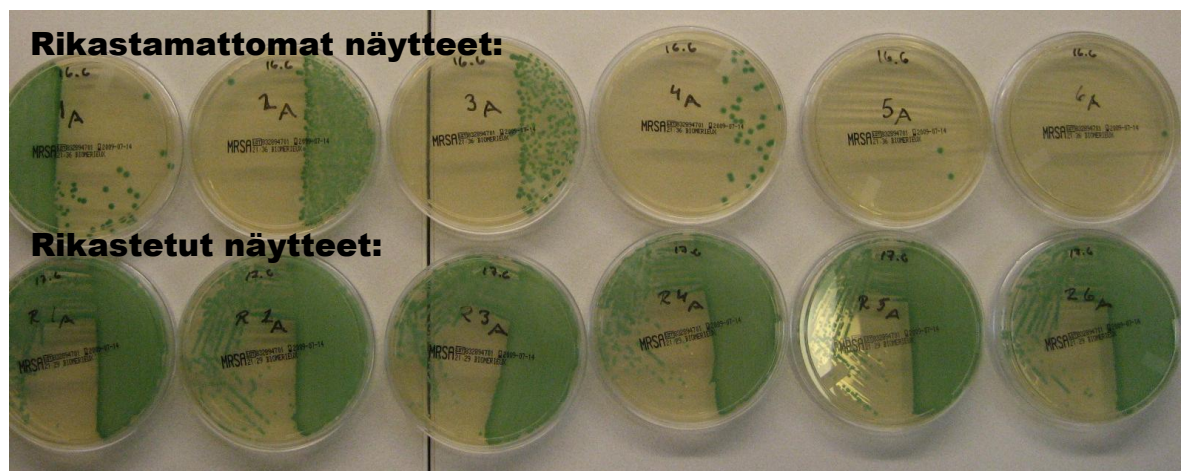
MRSA-rikastuksen testaus tunnetulla MRSA-bakteerikannalla. MRSA-laimennossarjojen avulla pyrittiin selvittämään rikastuksen tehoa MRSA:n tunnistamiseen, sillä pelkän menetelmävertailun avulla tähän ei saatu luotettavaa tulosta. Laimennossarjoissa MRSA-näytteestä ja potilasnäyteperäisistä normaaliflooran bakteereista tehtyä bakteerisuspensiota laimennettiin koeputkesta toiseen 1:10 portaittain. Ensimmäisen laimennossarjan tulokset on esitetty taulukossa 3. Tulokset kuvaavat rikastuksen tehoa MRSA:n tunnistamisessa suoraan viljelyyn verrattuna.

Taulukko 3. Ensimmäisen laimennossarjan viljelytulokset.

Laimennossarja 1		Laimennos					
		1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Sarja 1	Rikastamaton	+++	++	++	+	2	1
	Rikastettu	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sarja 2	Rikastamaton	+++	++	++	+	7	2
	Rikastettu	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sarja 3	Rikastamaton	+++	++	++	+	7	1
	Rikastettu	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sarja 4	Rikastamaton	+++	++	++	+	2	1
	Rikastettu	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Taulukon 1 selite:
 +++ = erittäin runsasta bakteerikasvustoa (pesäkkeitä mahdoton laskea)
 ++ = runsasta bakteerikasvustoa (pesäkkeitä vaikea laskea)
 + = selkeää bakteerikasvustoa (vähintään 20 pesäkettä)
 n = n määrä bakteeripesäkkeitä

Taulukosta 3 voidaan havaita rikastamisen tehostavan MRSA:n kasvua niin voimakkaasti, että kaikki rikastuksen jälkeen viljeltyt maljan ovat runsaan bakteerimassan peitossa. Tämä näkyy myös ensimmäisen laimennossarjan ensimmäisen testisarjan kuvassa (ks. kuva 13). Kaikki ensimmäisen laimennossarjan testisarjat osoittavat rikastuksen tehostavan MRSA:n kasvua.



Kuva 13. Ensimmäisen laimennossarjan ensimmäinen testisarja.

Toisen laimennossarjan testaus toteutettiin ensimmäistä laajempaan, koska laimennossarjatestauksen yleisenä tavoitteena oli päästä tilanteeseen, jossa vain rikastettu näyte kasvaisi ChromID MRSA -maljalla. Toisen laimennossarjan avulla päästiin haluttuun tavoitteeseen, koska laimennusta jatkettiin ensimmäistä sarjaa pidemmälle. Laimennossarjoja tehtiin tässäkin tapauksessa neljä samanlaista rinnakkain, jotta saataisiin mahdollisimman luotettavat tulokset rikastuksen tehosta MRSA:n tunnistamiseen. Taulukossa 4 esitetyistä tuloksista voidaan havaita, että viimeisen laimennoksen kohdalla kaikki rikastuksen jälkeen viljeltyt näytteet kasvoivat, mutta rikastamattomat eli suoraan laimennoksesta viljeltyt näytteet eivät enää laimennoksen loppupäässä kasvaneet lainkaan. Selkeät erot MRSA:n kasvun määrässä voidaan havaita jo neljännen laimennoksen kohdalla, koska tässä vaiheessa kaikissa rinnakkaissarjoissa rikastetuissa näytteissä oli runsasta bakteerikasvua, mutta rikastamattomissa näytteissä kasvu oli niin vähäistä, että yksittäiset pesäkkeet oli helppo laskea.

Taulukko 4. Toisen laimennossarjan viljelytulokset.

Laimennossarja 2		Laimennos									
		1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Sarja 1	rikastamaton	+++	+++	++	+	2	-	1	-	1	-
	rikastettu	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
Sarja 2	rikastamaton	+++	+++	++	+	2	-	-	-	-	-
	rikastettu	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
Sarja 3	rikastamaton	+++	+++	++	+	5	2	-	1	-	-
	rikastettu	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
Sarja 4	rikastamaton	+++	+++	++	+	2	2	2	2	1	-
	rikastettu	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+

Taulukon 2 selite:

+++	= erittäin runsasta bakteerikasvustoa (pesäkkeitä mahdoton laskea)
++	= runsasta bakteerikasvustoa (pesäkkeitä vaikea laskea)
+	= selkeää bakteerikasvustoa (vähintään 20 pesäkettä)
n	= n määrä bakteeripesäkkeitä
-	= ei bakteerikasvua

Laimennossarjojen avulla voidaan todeta MRSA-näytteiden rikastamisen tehostavan MRSA:n kasvua. Tätä havaintoa tukee myös Laineen ja Laaksonen-Heikkilän tekemä tutkimus (2008, 13–14), jossa löydettiin rikastamisen avulla yksi MRSA-kanta, jota ei

löydetty tutkimuksen muilla menetelmillä. Kehittämistyön toteutuksen jälkeen yksittäisten näytteiden rikastaminen otettiin käyttöön ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa.

MRSA:n esiintyvyys. Kehittämistyön tavoitteena oli myös selvittää MRSA:n esiintyvyyttä päivystyspoliklinikan kautta osastoille sisään otettavilla potilailla Mikkelin keskussairaalassa. Kehittämistyön aikana tutkimusnäytteitä kerättiin yhteensä 140, joista yksi oli positiivinen MRSA-löydös. Havaittu MRSA-esiintyvyys on kutakuinkin samaa luokkaa viime vuosiin nähden. Aiemmin luvussa 2.2 esitetyistä tilastoista saatu MRSA-tapausten laskennallinen keskiarvo kahta viikkoa kohden on vaihdellut yhden ja kahden MRSA-löydöksen välillä. Esiintyvyyttä arvioidessa tulee kuitenkin huomioida, että tilastot ovat koko Etelä-Savon sairaanhoitopiiriä koskevia, eikä tätä tutkimusta koskevaa kohderyhmää ole aiemmin tilastoitu omana ryhmänään. (THL 2010.)

7.2 Kehittämistyön luotettavuus ja eettisyys

Luotettavuus. Vaikka yleisesti tutkimustyössä pyritään välttämään virheiden syntymistä, tutkimustulosten luotettavuus vaihtelee. Tutkimustulosten luotettavuutta onkin tärkeä arvioida kriittisesti. Tähän voidaan käyttää erilaisia tapoja. (Hirsjärvi, Remes & Sajaavaara 2009, 231–233.) Tämän kehittämistyön luotettavuutta voidaan arvioida muun muassa työn toteutuksessa käytettyjen menetelmien, tutkimusprosessin kuvauksen ja käytetyn lähdeaineiston kannalta.

Kehittämistyön toteutusvaiheessa käytetyt mikrobiologian laboriodiagnostiikan menetelmät ja välineet, testattavia rikastusmenetelmiä lukuun ottamatta, ovat käytössä ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa, joten ne on aikaisemmin todettu luotettaviksi ja toimiviksi. Tämän takia niiden luotettavuutta ei erikseen käsitellä tämän kehittämistyön yhteydessä. Kehittämistyössä käytettyjä ChromID MRSA -maljoja voidaan pitää luotettavina MRSA:n tunnistamisessa, koska maljoja on aiemmissa vertailututkimuksissa pidetty käyttötarkoitukseen sopivimpina (Laine & Laaksonen-Heikkilä 2008, 13–14; van Hal ym. 2007, 2486–2490). On tosin huomioitava, että yhdessä tutkimuksessa on todettu ChromID MRSA -maljojen antaneen myös vääriä positiivisia MRSA-tuloksia (Malhotra-Kumarin ym. 2010, 1040–1045).

Tutkimusprosessin kulkua pyrittiin kuvaamaan mahdollisimman tarkasti ja todenmukaisesti, joka lisää kehittämistyön raportin luotettavuutta. Lähdemateriaalina käytettiin mahdollisimman uutta, kansainvälistä, ajantasaista ja asiantuntevista lähteistä peräisin olevaa tietoa. MRSA:han liittyviä tutkimuksia ja tietoa on saatavilla runsaasti, joten lähdekritiikki on tässä työssä ollut merkittävässä roolissa.

Yksittäisrikastamisen ja poolirikastamisen vertailu. Kehittämistyön luotettavuuden edistämiseksi kahden rikastamismenetelmän vertailuun käytettiin potilasnäytteitä, koska ne ovat menetelmien todenmukaista käyttöaineistoa. Tutkimusnäytteitä kerättiin menetelmävertailua varten kaksinkertaisesti, eli jokaisesta potilaasta otettiin kahdet rinnakkaiset näytteet. Näytteet analysoitiin samanaikaisesti molemmilla rikastusmenetelmillä, mikä puolestaan lisäsi menetelmävertailun luotettavuutta.

Menetelmävertailun avulla pyrittiin validoimaan uudet rikastusmenetelmät. Validoinnilla tarkoitetaan tutkimusmenetelmän kelpoisuuden osoittamista. Sen avulla varmistetaan, että käyttöönotettava menetelmä tuottaa toistettavia ja luotettavia tuloksia. (Liimatainen 2002, 12.) Kehittämistyön yhden positiivisen MRSA-näytteen perusteella ei voida vertailla rikastusmenetelmiä luotettavasti, koska yksittäistuloksella ei saavuteta toistettavuutta. Lisäksi yksittäiseen tulokseen voi vaikuttaa monta eri tekijää.

MRSA-rikastuksen testaus tunnetulla MRSA-bakteerikannalla. Kahden rikastusmenetelmän vertailulla ei saavutettu luotettavaa tulosta rikastamisen tehosta MRSA:n tunnistamiseen, joten rikastusmenetelmää päätettiin testata laimennossarjojen avulla. Kliinisessä mikrobiologiassa menetelmien validoinnissa voidaan käyttää itsevalmistettuja positiivisia näytteitä, jos niitä ei muuten saada tarpeeksi (Liimatainen 2002, 12). Rikastusmenetelmien vertailuun kerätyissä näytteissä ei ollut tarpeeksi positiivisia, joten MRSA-rikastuksen tehon selvittämiseksi oli valmistettava testinäyte. MRSA-rikastustestausta varten tehty testinäyte eli bakteerisuspensio sisälsi MRSA:n lisäksi myös normaaliflooran bakteereja, jotta tulos olisi vastannut paremmin potilasperäistä näytettä. Luotettavuutta haluttiin parantaa tekemällä samanaikaisesti neljä laimennossarjaa ja toistamalla ensimmäinen laimennostestaus pidennettynä versiona.

MRSA:n esiintyvyys. Yksi positiivinen MRSA-löydös ei välttämättä anna luotettavaa kuvaa MRSA:n esiintyvyydestä Mikkelin keskussairaalaan päivystyspoliklinikan kautta

sisään otettavien potilaiden keskuudessa. Kyseisen tutkimustuloksen luotettavuus on syytä kyseenalaistaa, koska MRSA-näytteitä ei annetuista ohjeista huolimatta otettu kaikista tutkimusryhmään kuuluvista potilaista. Osa päivystyspoliklinikan hoitajista ilmoitti, että oli unohtanut ottaa kyseiset näytteet. On myös mahdollista, että tieto tutkimukseen tarvittavista näytteistä ei inhimillisistä tekijöistä johtuen saavuttanut kaikkia työntekijöitä.

Tutkimusnäytteiden keräämisen luotettavuuteen vaikuttavat useat tekijät. Luotettavuutta edesauttaa hoitohenkilökunnalle laaditut selkeät tutkimukseen ja näytteenottoon liittyvät ohjeet. Lisäksi hoitohenkilökunnalle pidettiin tiedotustilaisuus tutkimuksen sisällöstä. Näytteenottoon saattaa kuitenkin liittyä virhelähteitä, jotka liittyvät esimerkiksi aseptiseen omatuntoon, näytteenottotekniikkaan tai muihin näytteenlaatuun vaikuttaviin tekijöihin. Virhelähteet eivät tule esille tässä tutkimuksessa, sillä näytteet on kerätty päivystyspoliklinikan henkilökunnan toimesta. Tutkimuksessa voidaan vain olettaa henkilökunnan toimineen annettujen ohjeiden mukaisesti.

Eettisyys. Tämä kehittämistyö toteutettiin kliinisen laboratoriotyön eettisiä periaatteita noudattaen. Työskentelyn eri vaiheissa kunnioitettiin potilaan hyvinvointia ja hänen oikeuksiaan (Bioanalytikkoliitto 2006.) Jokaiselle tutkimukseen osallistuneelle henkilölle esitettiin kuvaus tutkimuksen tarkoituksesta (ks. liite 6), jonka jälkeen heillä oli oikeus tehdä päätös tutkimukseen osallistumisesta. Eettisiä periaatteita noudattaen tutkimukseen osallistuminen oli täysin vapaaehtoista eikä osallistujia painostettu päätöksen teossa (Hirsjärvi ym. 2009, 24–25).

Kliinisten laboratoriotyön eettisten periaatteiden mukaan terveydenhuollon ammattihenkilönä bioanalytikolla on velvollisuus kehittää ammattitoimintansa edellyttämää osaamista ja omaksua uusia menetelmiä ja toimintatapoja. Bioanalytikon tulee noudattaa ammattitoimintaansa koskevia säädöksiä, määräyksiä, standardeja ja suosituksia. (Bioanalytikkoliitto 2006.) Tämän kehittämistyön toteutusvaiheessa on huomioitu edellä mainitut asiat. Tutkimukselle on myönnetty tutkimuslupa ISLAB:n puolesta. Eettisen lautakunnan lupaa ei tutkimukseen tarvittu, koska tutkimuksessa ei käsitelty potilastietoja. Tutkimusnäytteitä käsiteltiin niille annetuilla näytenumeroilla. Näin taattiin potilaiden anonymiteetti.

Tämän kehittämistyön tarkoituksella voidaan todeta olevan laajoja positiivisia eettisiä vaikutuksia. MRSA-laboratoriodiagnostiikan kehittäminen muun muassa edesauttaa potilaiden hyvinvointia, tehostaa sairaanhoitopiirin toimintaan, luo merkittäviä taloudellisia säästöjä ja edistää kestävästä kehityksestä

7.3 Ammatillinen kehittyminen

Tämän opinnäytetyön tekeminen ja raportin kirjoittaminen on ollut pitkä ja monella tapaa opettavainen prosessi. Opinnäytetyöprosessin kaikki vaiheet ovat tukeneet omalla tavallaan ammatillista kehittymistä. Käytännön taidoissa ammatillinen kehittyminen korostui etenkin työn toteutusvaiheessa. Opinnäytetyön kirjoittaminen puolestaan on kehittänyt tutkimuksen raportointiin tarvittavia taitoja

Aloitimme opinnäytetyöprosessin opintojemme puolivälissä, jolloin meillä ei vielä ollut kokemusta työskentelystä kliinisen mikrobiologian laboratoriossa emmekä olleet vielä suorittaneet pitkää keskussairaala harjoittelua. Koska kehittämistyön toteutusvaihe ISLAB:n Mikkelin aluelaboratoriossa suoritettiin toisen lukuvuoden päätyttyä vähäisellä kokemuksella käytännön toiminnasta, oli kehittämistyön varsinainen toteutusvaihe haastava ja opettavainen prosessi. Toteutusvaiheen aikana kliinisen mikrobiologian laboratoriotyöhön liittyvät käytännön taitomme kehittyivät huomattavasti erityisesti MRSA-diagnostiikan osalta. Samalla opimme soveltamaan teoretista tietoa käytäntöön sekä arvioimaan käytettyjä analysointimenetelmiä ja niiden tuloksia kriittisesti. Kehittämistyöprosessin aikana saimme toimia moniammatillisessa työyhteisössä, joka vahvisti ammatti-identiteettiämme ja kehitti vuorovaikutustaitojamme.

Opinnäytetyön teoreettisen osan tekeminen harjaannutti tieteellisen tiedon käyttöön ja kriittiseen arviointiin sekä oman työskentelyn eri vaiheiden kirjalliseen esittämiseen. Myös opinnäytetyöprosessiin kuuluva kirjallisten töiden suullinen esittäminen ja toisten töiden arvioiminen on myös lisännyt tieteellisen tiedon merkityksen ymmärtämistä. Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi on vahvistanut merkittävästi ammatillista osaamistamme tulevia bioanalyytikon työtehtäviä ajatellen.

LÄHTEET

Bioanalytikkoliitto. 2006. Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Päivitetty 18.11.2006. Viitattu 29.10.2010.
http://www.bioanalytikkoliitto.fi/bioanalyytikon_ammatti/

Boyce, J. M. & Havill, N. L. 2008. Comparison of BD GeneOhm Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) PCR versus the CHROMagar MRSA Assay for Screening Patients for the Presence of MRSA Strains. Journal of Clinical Microbiology 46 (1), 350–351.

Carlson, P. & Koskela, M. 2005. Bakteriologinen diagnostiikka. Teoksessa P. Huovinen, S. Meri, H. Peltola, M. Vaara, A. Vaheri & V. Valtonen (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja II. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 20–38.

Denka-Seiken. 2009. Staphylococcus Aureus. Viitattu 3.8.2009.
<http://www.denka-seiken.co.jp/english/products/bacteriology/staphylococcusAureus.html>

Duodecim. 2010 Kolonisaatio. Viitattu 28.10.2010.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01696

Esko, E. 1995. Koagulaasi putkitesti. Moodi. Erillisjulkaisu (4) 36.

FiRe Standardi - Bakterilääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. 2009. THL. Päivitetty 7.7.2009. Viitattu 9.7.2009. <http://www.ktl.fi/portal/10905>

Foster, T.J. 2004. MRSA. Viitattu 3.10.2010.
<http://www.nll.se/upload/IB/dk/labsy/bilder/MRSA.jpg>

Hardy diagnostics 2010. MRSA Latex Test for PBP2' by Denka Seiken. Päivitetty 13.6.2010. Viitattu 20.10.2010.
<http://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/MRSALatexTest.htm>

Heikkilä, A., Jokinen, P. & Nurmela, T. 2008. Tutkiva kehittäminen. Helsinki: WSOY.

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2005. Bakteriologia. Teoksessa S. Hellstén (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Helsinki: Suomen kunta-
liitto, 31–52.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Huovinen, P. 2005. MRSA: haasteita riittää. Kansanterveyslaitoksen tiedotuslehti. Tu-
lostettu 1.10.2010. Päivitetty 6.10.2005.
http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2005/7_2005/

Huovinen, P. & Vaara, M. 2005. Bakterilääkehoidon perusteet. Teoksessa P. Huovi-
nen, S. Meri, H. Peltola, M. Vaara, A. Vaheri & V. Valtonen (toim.) Mikrobiologia ja
infektiosairaudet. Kirja II. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 81–109.

Huupponen, R. 2003. Mikrobilääkkeet. Teoksessa O. Pelkonen & H. Ruskoaho (toim.)
Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. 3., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus
Oy Duodecim, 794–844.

Jawetz, E., Melnick, J. & Adelberg E. 1995. Medical Microbiology. 20th Edition.
London: Prentice Hall International Inc., 186–191.

Karhumäki, E., Jonsson, A. & Saros, M. 2009. Mikrobit hoitotyön haasteena. Helsin-
ki: Edita Prima Oy.

Katila, M.-R. 2003. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian ja parasito-
logian tutkimuksissa. Teoksessa T. Halonen, A. Hänninen, M. Katila, A. Laatikainen,
M. Laitinen, E. Länsimies, E. Mahlamäki, I. Penttilä, H. Tapola & E. Vanninen (toim.)
Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY, 351–357.

Katila, M.-L. & Laatikainen, A. 2003. Kliininen mikrobiologia. Teoksessa T. Halonen, A. Hänninen, M. Katila, A. Laatikainen, M. Laitinen, E. Länsimies, E. Mahlamäki, I. Penttilä, H. Tapola & E. Vanninen (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 338–339.

Kerttula, A.-M. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland: recent changes in the epidemiology, long-term facility aspects, and phenotypic and molecular detection of isolates. University of Helsinki. Faculty of Biosciences. Academic Dissertation. Publications of the National Public Health Institute 16.

Kimari, P. 2008. Käsihygieniä ja MRSA – teoriaa ja toimintaa. *Suomen sairaalahygienialehti*. 26 (6), 298–301.

KTL = Kansanterveyslaitos. 2007. Veriviljelypositiiviset sairaalainfektiot vuosina 1999–2006. Viitattu 28.10.2010.
http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_b/2007/2007b20.pdf

KTL = Kansanterveyslaitos. 2005. Kansallinen sairaalainfektioiden prevalenssitutkimus. Viitattu 28.10.2010.
http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_b/2005/2005b24.pdf

Kärpänoja, P. 2007. Kromogeeniset maljat. Periaate ja tausta. *Moodi* 31 (1), 39–40.

Laine, H. & Laaksonen-Heikkilä, R. 2008. Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA) -diagnostiikan kehittäminen Kanta-Hämeen keskussairaalassa. *Bioanalyttikko* 4, 13–14.

Liimatainen, O. 2000. Gramvärjäys. *Moodi* 24 (4-5), 126–128.

Liimatainen, O. 2002. Menetelmien validointi ja verifiointi klinisen mikrobiologian laboratoriossa: yleisiä periaatteita. *Moodi* 26 (1), 12–13.

Lyytikäinen, O. & Vuopio-Varkila, J. 2005. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit. Teoksessa P. Huovinen, S. Meri, H. Peltola, M. Vaara, A. Vaheri & V. Valtonen (toim.)

Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 107–110.

Malhotra-Kumar, S., Abrahantes, J. C., Sabiiti, W., Lammens, C., Vercauteren, G., Ieven, M., Molenberghs, G., Aerts, M. & Goossens, H. 2010. Evaluation of Chromogenic Media for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of clinical microbiology 48 (4) 1040-1046.

Matikainen, A-M., Miettinen, M. & Wasström, K. 2010. Näytteenottajan kasikirja. Helsinki: Edita Prima Oy.

Meurman, O. & Nissinen, A. 2006. Bakteerilääkeherkkyyskierrojen säilyminen ja säilyttäminen. Moodi 30 (6), 205–206.

Mustala, S. 2010. MRSA-kantanimistö. Viitattu 21.10.2010. Päivitetty 15.2.2010. http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/bato/yksikot/sairaalabakteerilaboratorio_saba/mrsa_a__metisilliiniresistentti_staphylococcus_aureus_/mrsa-kantanimisto

Nissinen, A. 2002. Bakteerin lääkeaineherkkyuden määrittäminen. Teoksessa M. Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, 532–533.

Nissinen, A. 2006. Bakteerin lääkeaineherkkyuden määrittäminen. Moodi 30 (6), 202–204.

Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. 1999. Microbiology. 4. painos. New York: McGraw-Hill Companies, 782–786.

Puhakka, J. & Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobisolujen rakenne. Bakteerin solu-kuori. Teoksessa M. Salkinoja-Salonen (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, 98–111.

Reygaert, W. 2009a. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and Epidemiology Issues. Clinical Laboratory Science 22 (2), 111–114.

Reygaert, W. 2009b. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Identification and Susceptibility Testing Techniques. *Clinical Laboratory Science* 22 (2), 120–123.

Salkinoja-Salonen, M. 2002a. Rikastaminen. Teoksessa M. Salkinoja-Salonen (toim.) *Mikrobiologian perusteita*. Helsinki: Helsingin yliopisto, 58–60.

Salkinoja-Salonen, M. 2002b. Mikrobipuhdasviljelmä. Teoksessa M. Salkinoja-Salonen (toim.) *Mikrobiologian perusteita*. Helsinki: Helsingin yliopisto, 80–91.

Salmenlinna, S., Lyytikäinen, O., Kanerva, M. & Vuopio-Varkila, J. 2008. MRSA:n epidemiologia Suomessa. *Moodi* 29 (5), 190–193.

Salmenlinna, S., Lyytikäinen, O., Kanerva, M. & Vuopio-Varkila, J. 2004. MRSA:n seuranta ja molekyyli-epidemiologia Suomessa. Viitattu 21.10.2010. Päivitetty 10.1.2004.

http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2001/10_2001/mrsa:n_seuranta_ja_molekyyli-epidemiologia_suomessa/

SataDiag. 2010. MRSA häättöhoito. Viitattu 28.10.2010. <http://www.satshp.fi/pls/wportal/docs/PAGE/TIETOPANKKI/TARTUNTATIEDOT/OHJEET/VASTUSTUSKYKYISETMIB/MRSA/MRSA-H%C4%C4T%D6HOITO.PDF>

Solunetti. 2006. Solubiologia. Gram-värjäys. Viitattu 22.9.2010. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/>

Stegemann, M. & Beckmann, G.T. 1994. In-vitro Susceptibility testin in Veterinary Practice. Viitattu 3.10.2010. Päivitetty 2002. http://www.poultry.baytril.com/119/Susceptibility_Testing.htm

Suomala, P. 2009. Poolirikastusmenetelmän esittely. Ohjauskeskustelu sairaalamikrobiologin kanssa 1.6.2009.

Thermo Fisher Scientific. 2010. Bacterial identification - Test kits, toxin detection/test

strips. Viitattu 27.10.2010. <https://extranet.fisher.co.uk/webfiles/uk/web-docs/LSUK0465.pdf>

THL = Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2010. Tilastotietokanta. Resistentit bakteerit: *S. aureus*, MRSA (-2003) ja MRSA-kantajuus (2004-). Päivitetty 21.10.2010. Viitattu 29.10.2010. <http://www3.ktl.fi/stat/>

THL = Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2009. MRSA. Päivitetty 2.1.2009. Viitattu 4.5.2009.

www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa_terveydesta/terveys_ja_sairaudet/infektiotaudit/sairaalainfektiot/mrsa/

Tuokko, S., Rautajoki, A. ja Lehto, L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Helsinki: Tammi

TYKSLAB. 2010. Mikrobiologisten näytteiden ottaminen. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 20.9.2010. Viitattu 13.10.2010. <http://ohjekirja.tykslab.fi/liitteet/MikrobiolNaytteet.html>

Vaara, M. & Huovinen, P. 1997. Yleistä bakteerilääkkeistä. Teoksessa A. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 8 uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 336–353.

Vaara, M., Skurnik, M. & Sarvas, M. 2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri & M. Vaara (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 14–40.

van Hal, S. J., Stark, D., Lockwood, B., Marriott, D. & Harkness, J. 2007. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detection: Comparison of Two Molecular Methods (IDI-MRSA PCR Assay and GenoType MRSA Direct PCR Assay) with Three Selective MRSA Agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for Use with Infection-Control Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (8), 2486–2490.

Vilka, H. & Airaksinen, T. 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Tammi.

Virolainen-Julkunen, A. 2005. MRSA:n tunnistus. Kansanterveyslaitoksen tiedotuslehti. Tulostettu 1.10.2010. Päivitetty 6.10.2005.
http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2005/7_2005/

Vuento, R. 2005. Mikrobiologinen diagnostiikka. Teoksessa P. Kujala, E. Kolho, A. Rantala, M. Ratia, R. Vuento & S. Hellstén (toim.) Infektioiden torjunta sairaalassa. 5., uudistettu painos. Helsinki: Kuntaliitto, 63–68.

Vuopio-Varkila, J. 2005a. MRSA-kantojen nimeäminen. Moodi 29 (5), 180–183.

Vuopio-Varkila, J. 2005b. MRSA-kantojen nimet uudistuivat. Kansanterveyslaitoksen tiedotuslehti. Tulostettu 1.10.2010. Päivitetty 6.10.2005.
http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2005/7_2005/

Vuopio-Varkila, J., Kuusela, P. & Kotilainen, P. 2010. Staphylococcus aureus. Teoksessa K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri & M. Vaara (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 83–97.

Vuopio-Varkila, J., Kuusela, P. & Kotilainen P. 2005. Staphylococcus aureus. Teoksessa P. Huovinen, S. Meri, H. Peltola, M. Vaara, A. Vaheeri & V. Valtonen (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 98–106.

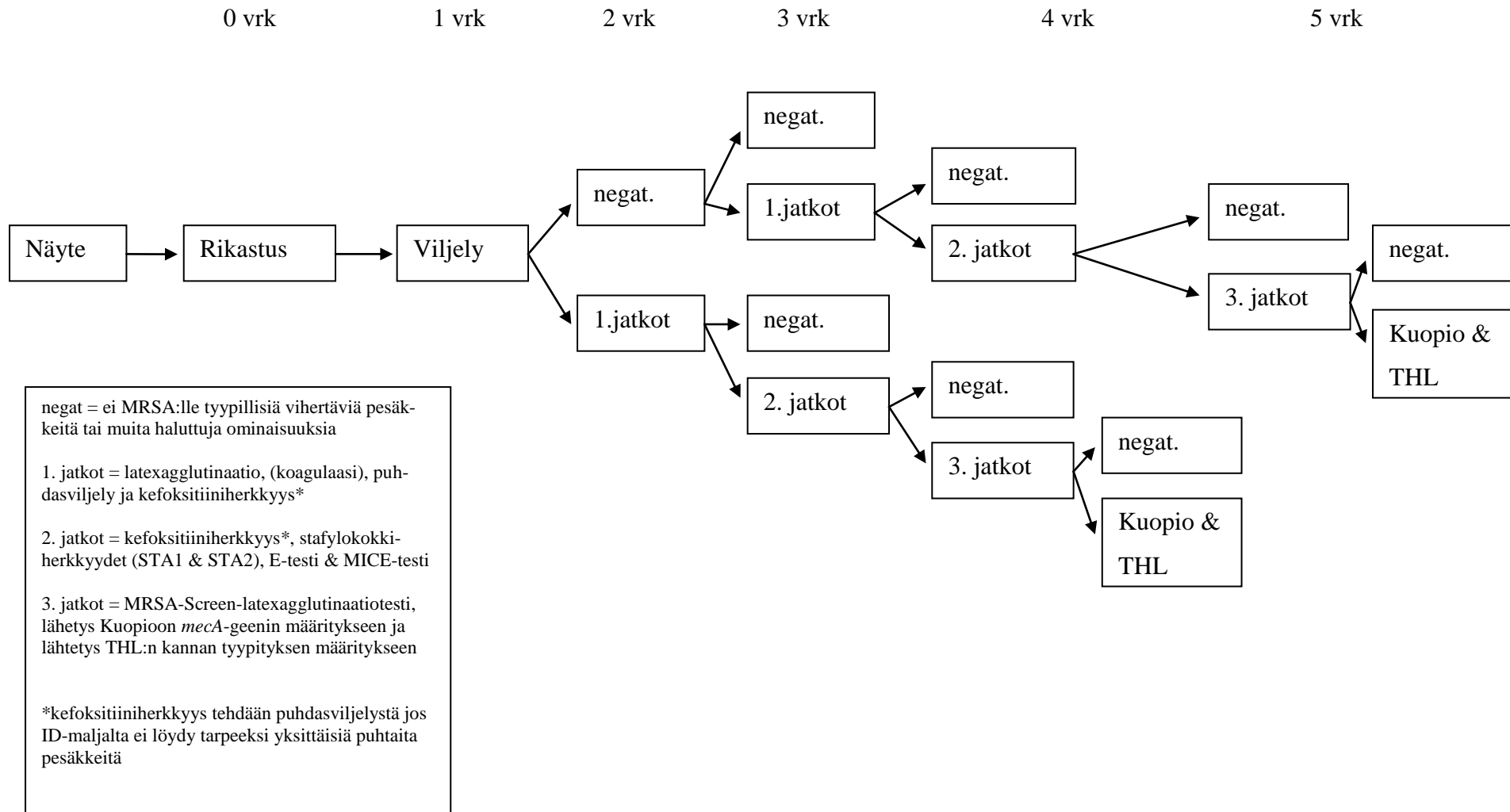
Vuopio-Varkila, J. & Sivonen, A. 1997. Stafylokokit ja mikrokokit. Teoksessa A. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheeri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 412–417.

Ylönen, H. 2005. Mikrobiologisten näytteiden ottaminen. Teoksessa S. Hellstén (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen kuntaliitto, 99–115.

LIITTEET

Liite 1. Näytteen kulku laboratoriossa.	53
Liite 2. Herkkyysmäärityksessä käytetyt antibiootit.	54
Liite 3. Ilmoitus Mikkelin keskussairaalassa MRSA-seulonnoista.	55
Liite 4. Tutkimuksessa tehdyt mikrobiologiset laboratoriomääritykset.	56
Liite 5. Ohje MRSA-tutkimuksen näytteenottoon.	57
Liite 6. Potilaalle annettu tiedote MRSA-seulonnasta.	58

Liite 1. Näytteen kulku laboratoriossa.



Liite 2. Herkkyysmäärityksessä käytetyt antibiootit.

Kiekkomenetelmällä tehtäviin herkkyysmäärityksiin käytettiin tässä tutkimuksessa kahta valmista paneelia, jotka sisälsivät yhteensä kymmenen erilaista antibioottia.

STA1 paneeli sisältää antibioottikieikkoja seuraavasti:

- erythromycin 15 µg
- clindamycin 2 µg
- sulphamethoxazole 25 µg
- tetracycline 30 µg
- penicillin G 10 units

STA2 paneeli puolestaan sisältää seuraavat antibiootit:

- fusidiini 10 µg
- maxifloxacin 5 µg
- netilmycin 30 µg
- rifampicin 5 µg
- vancomycin 30 µg

Liite 3. Ilmoitus Mikkelin keskussairaalassa MRSA-seulonnoista.

MKS:n potilasliikenteen MRSA-seulonta viikoilla 23. ja 24. (1.6.-12.6.2009)

Päivystyspoliklinikka tutkii = ottaa MRSA-seulontanäytteet tarkoitukseen varattuja ohjeita ja tutkimussettejä käyttäen yllä olevalla ajanjaksolla kaikilta niiltä päivystyspoliklinikan potilailta, jotka otetaan päivystyksestä osastohoittoon lähetteen tekijästä riippumatta. Tutkimus ei koske äitiyspolin (synnyttäjät) toimintaa eikä päiväpoliklinikoilta suoraan osastoille jääviä potilaita.

Tutkimuksen tarkoituksena on kehittää ja nopeuttaa laboratorioprotokollaa sekä selvittää MRSA-bakteerikantajuuden todellinen esiintyvyys kyseisessä potilasryhmässä.

Lisätietoja asiasta tarvittaessa antavat ylil. Afra Prokki, infektio lääkäri Sakari Vuorinen tai sairaalamikrobiologi Päivi Suomala.

Sakari Vuorinen, infektioylikirurgi

Muokkaaja: [Tuija Sainpalo](#) / Etelä-Savon sairaanhoitopiirin ky. Lisätty 22.05.2009

Liite 4. Tutkimuksessa tehdyt mikrobiologiset laboratoriomääritykset.

Laboratoriomääritys	Näyttemäärä (kpl)
MRSA-rikastus ja poolirikastus	
- nenä (A)	- 140
- nielu (B)	- 140
- iho/ihorikko (C)	- 27
- pooli (Y)	- 140
Viljely ChromID MRSA -maljalle (bioMérieux)	447
Puhdasviljelmä verimaljalle	37
Slidex Staph Plus Kit -latexagglutinaatiotesti (bioMérieux) (pos/neg)	25 (19/6)
Koagulaasi	2
Kefoksitiiniherkkyys	26
Stafylokokkiherkkyys (STA1)	2
Stafylokokkiherkkyys (STA2)	2
Oksasilliini E-testi (Biodisc)	2
MRSA-Screen (Denka Seiken Co)	1
Näytteen lähetys puhdasviljelmänä Kuopioon <i>mecA</i> - geenin määrittämiseen ja THL:n kannan tyypitykseen	1

Liite 5. Ohje MRSA-tutkimuksen näytteenottoon.

OHJE MRSA-TUTKIMUKSEEN

MRSA-tutkimus

1.6.-12.6.2009

Osastoille jäävät potilaat:

Otetaan rinnakkaiset näytteet:

- nenästä molemmista sieraimista (aina)
- nielu (aina)
- ihorikot / haava / ihottuma (jos on)

Kaikki tikut samaan pussiin.

Pussin päälle potilastarra.

Pussi MRSA-koriin jääkaappiin.

Tutkimuspyynnön Efficaan tekee labra.

Liite 6. Potilaalle annettu tiedote MRSA-seulonnasta.

ETELÄ-SAVON
SAIRAAHOITOPIIRI
Infektiosairaudet ja sairaalahygienia MKS

Potilaalle

SELVITYS PÄIVYSTYKSESTÄ HOITONOTETTAVIEN MRSA- PREVALENSSISTA– Mikkelin Keskussairaala 1.6. – 12.6.2009

MRSA on maailmanlaajuisesti tavallisin sairaalahoitoon liittyvä monelle lääkkeelle vastustuskykyinen bakteeri.

MRSA on vaara potilaalle, jonka yleistila on sairauksien tai lääkitysten heikentämä.

MRSA ei ole yleensä vaara terveelle aikuiselle tai lapselle.

MRSA:n leviämistä halutaan estää, rajoittaa. MRSA:n esiintyminen on ollut sairaanhoitopiirissämme kurissa, jopa merkittävästi vähentynyt.

Kyseisen tutkimuksen tarkoituksena on kartoittaa onko sairaalaan hoitoon otettavassa väestössä oireetonta MRSA-kantajuutta ja selvittää ovatko suojautumistoimemme riittävät. Tutkimus on kivuton ja maksuton.

Tutkimus ei vaikuta tutkimustenne tai saamanne hoidon laatuun millään tavalla. Viljelyn tulos ilmoitetaan vain siinä tapauksessa, että se on poikkeava.

Mikkelissä 29. toukokuuta 2009

Sakari Vuorinen
Infektioylilääkäri
Mikkelin keskussairaala
Etelä-Savon sairaanhoitopiiri