



ENTEROKOKKIEN TUNNISTUS JA KÄYTETTYJEN MENETELMIEN VERTAILU

Sanna Kajakoski

Katja Vehkajärvi

Opinnäytetyö

Toukokuu 2006

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Terveysala

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu/

Jyväskylän ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu/Jyväskylän ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

KAJAKOSKI, SANNA & VEKKAJÄRVI, KATJA:

Enterokokkien tunnistus ja käytettyjen menetelmien vertailu

Opinnäytetyö 45 s.
Toukokuu 2006

Enterokokit ovat yleisiä sairaalaperäisten virtsatieinfektioiden aiheuttajia. Niistä yli 95 %:ssa aiheuttajana ovat pääasiassa *Enterococcus faecalis*- ja *Enterococcus faecium* -lajit, joista arabinoosipositiivinen *Enterococcus faecium* on resistentimpi. Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorio vastaa kaikki arabinoosipositiiviset enterokokit lajinimellä *Enterococcus faecium*, koska laboratoriossa ei ole käytössä tarkempaan lajitunnistukseen kykenevää diagnostista testimenetelmää.

Käyttökelpoisen testimenetelmän puuttumisen vuoksi ryhdyttiin tutkimaan neljän eri kaupallisen testikitin toimivuutta ja luotettavuutta enterokokkilajien tunnistuksessa sekä millä edellytyksillä jokin näistä tutkituista testimenetelmistä soveltuisi diagnostiseen analytiikkaan. Käytetyt testimenetelmät olivat Api 20 Strep, Rapid ID 32 STREP, RapIDTMSTR System ja DiatabsTM -testikokonaisuus. Näytemääränä tutkimuksessa oli 46 virtsa- ja veriviljelynäytteistä eristettyä, *Enterococcus faecium* -lajiksi vastattua bakteerikantaa. Näistä kolme olivat tunnettuja kontrollikantoja, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus gallinarum*.

Varmoina *Enterococcus faecium* -lajitulkinnoiksi luokiteltiin sellaiset tapaukset, joissa Api 20 Strep -testin tunnistusprosentti oli vähintään 96 ja kun Diatabs -testikokonaisuudesta tiettyjen osioiden tulokset tukivat tätä. Tutkimuksen perusteella voidaan tehdä se johtopäätös, että Api 20 Strep -testi sekä Diatabs -testikokonaisuudesta tietyt osiot tarjoavat kätevän ja objektiivisen tavan tunnistaa *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ja jokin muu nimeämätön enterokokkilaji. Mikään tutkimuksessa käytetyistä testimenetelmistä ei pystynyt tutkimuksen perusteella luotettavasti tunnistamaan harvinaisempia enterokokkilajeja, kuten *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* tai *Enterococcus avium*.

Avainsanat: enterokokit, Api 20 Strep, Rapid ID 32 STREP, RapIDTMSTR, DiatabsTM,
menetelmävertailu

ABSTRACT

Pirkanmaa University of Applied Sciences/ Jyväskylä University of Applied Sciences
Degree Programme in bioanalytic

KAJAKOSKI, SANNA & VEHKAJÄRVI, KATJA:

The identification of enterococci and the comparison of the used methods

Bachelor's thesis 45 s.

May 2006

Enterococci bacteria is the most common cause of hospital based urinary infections. Over 95% of these have been found to have caused mainly by *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species, of which arabinose positive *Enterococcus faecium* is the most resistant. The Clinical Microbiology laboratory of the Central Hospital of Central Finland labels all arabinose positive enterococci bacteria by the name *Enterococcus faecium*, because the laboratory does not have in its use a more accurate species identification test facility.

Due to the lack of usable testing facility the testing of four separated commercial test kits was commenced for the usefulness and reliability for the identification of the enterococci and what proof was needed to decide which testing approach would fit the diagnostic analysis. The methods tested were Api 20 Strep, Rapid ID 32 Strep, Rapid™ STR system and Diatabs™ test field. The strains tested included 46 urine and blood samples selected from the identified *Enterococcus faecium* strains. Out of these three were from the recognised control group, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus gallinarum*.

The incidents which were then interpreted according to their strand as being 'certain' *Enterococcus faecium* were the cases, in which Api 20 Strep id% was at least 96% and where some Diatabs test parts confirmed these results. Based on the results of the testing it can be concluded that Api 20 Strep -test and also some of the Diatabs test parts offers useful and objective method to identify *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and some other unnamed species of enterococci. None of the test methods used in the research were able to reliably recognise more unusual enterococci species like *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* or *Enterococcus avium*.

Keywords: Enterococci, Api 20 Strep, Rapid ID 32 STREP, RapID™STR, Diatabs™, comparison of method

SISÄLLYS

JOHDANTO.....	1
2 ENTEROKOKIT	2
2.1 Enterokokkien ominaisuudet	2
2.2 Enterokokkien esiintyminen	2
2.3 Enterokokki-infektiot	3
2.4 Vankomysiinille resistentti enterokokki eli VRE	3
2.5 Enterokokkien tutkiminen mikrobiologian laboratoriossa	4
2.5.1 Katalaasitesti	5
2.5.2 Gramvärjäys	6
2.5.3 Arabinoosin fermentaatiotesti	6
2.5.4 Sappieskuliinitesti	7
2.5.5 Bakteerilääkeherkkyys.....	8
3 ENTEROKOKKIEN TUNNISTUKSESSA KÄYTETYT TESTIMENETELMÄT.....	9
4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TEHTÄVÄT	11
5 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	12
6 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	14
6.1 Tutkimusaineiston keruu, aikataulu ja toteutus	14
6.2 Käytetyt testimenetelmät	16
6.2.1 Api 20 Strep	16
6.2.2 Rapid ID 32 STREP	17
6.2.3 RapID™STR System	18
6.2.4 Diatabs™	18
7 TUTKIMUSTULOKSET.....	20
7.1 Api 20 Strep- testin tulokset	20
7.2 Muilla tunnistusmenetelmillä saadut tulokset.....	22
7.3 Eri testeillä saatujen tulosten vertailu.....	24
8 POHDINTA.....	25
LÄHTEET	30
LIITTEET.....	33

JOHDANTO

Enterokokit ovat *Escherichia colin* jälkeen yleisimpiä aerobisia suolistobakteereja ja ne kuuluvat ihmisen normaaliflooraan (Anttila & Suppola 2003, 129). Ihmisessä esiintyviä, herkimmin tautia aiheuttavia arabinoosipositiivisia enterokokkeja ovat *Enterococcus faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* sekä *E. mundtii*. Kliinisen mikrobiologian laboratorion eristämistä enterokokeista yli 95 % on *Enterococcus faecalis*- tai *Enterococcus faecium*- lajia. *E. faecalis*en normaaliflooran esiintymispaikkana on suolisto, kun taas *E. faecium* löytyy iholta. Enterokokki on niin sanottu opportunistibakteeri ja aiheuttaa infektioita vain silloin, kun ihmisen puolustuskyky on heikentynyt. (Anttila ym. 2003, 129; Hellstén, 2005, 32; Murray, Baron, Pfaller, Tenover & Tenover, 1999, 300.)

Enterokokit aiheuttavat sekä avohoito- että sairaalainfektioita ja sairaalainfektioiden aiheuttajana enterokokkien merkitys on jatkuvasti lisääntymässä (Huovinen & Kotilainen 1998, 115). Sairaalabakteeri VRE on vankomysiinille resistentti enterokokki, joka on yleistynyt vankomysiinin käytön vuoksi. Tämän vuoksi on tärkeää, että uusi VRE –kanta pystytään tunnistamaan lajitasolle saakka, jotta välttyttäisiin vääriltä VRE-löydöksiltä. Tällä hetkellä Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa vastataan kaikki arabinoosipositiiviset enterokokit lajinimellä *E. faecium*. Tämän perusteella työn hypoteesina on, että kaikki tutkittavat bakteerikannat ovat *E. faecium* -lajia.

Opinnäytetyömme tarkoituksena on selvittää, mitä muita *Enterococcus* sukuun kuuluvia lajeja potilasnäytteissä esiintyy kuin *E. faecium* sekä millä diagnostisella testillä ne saataisiin luotettavimmin tunnistettua. Näyttemateriaaleina työssä käytetään veriviljelyistä sekä virtsaviiljelyistä saatuja bakteerikantoja, jotka kerää Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorion henkilökunta. Työssä testataan neljää eri diagnostista menetelmää enterokokkien tunnistuksessa. Työn tavoitteena on nopeuttaa ja tarkentaa diagnoosin tekoa, joten päätavoitteenamme on nopeuttaa potilaan hoidon aloitusta sekä tehostaa sitä täsmällisemmin vaikuttavilla lääkkeillä. Opinnäytetyöstämme hyötyvät Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorion lisäksi myös lääkärit sekä ennen kaikkea potilaat.

2 ENTEROKOKIT

2.1 Enterokokkien ominaisuudet

Enterokokit luokiteltiin aiemmin D-ryhmän Streptokokkeihin, joista ne erotettiin omaksi suvukseen vuonna 1984. Läheisimmät sukulaislajit ovat *Lactococcus spp.* ja *Vagococcus spp.* Enterokokit ovat aerobeja, katalaasinegatiivisia, grampositiivisia ketjukokkeja, jotka voivat esiintyä myös yksin tai pareittain. Lisäksi ne ovat pyrrolidonyl- β -naftyylamidi (PYR) ja leusiini- β -naftyylamidi (LAP) positiivisia. Ne voivat kasvaa 10 - 45 °C:ssa, optimilämpötila on 35 °C. Enterokokit sietävät korkeita suolapitoisuuksia ja sappihappoja ja kasvavat siten elatusaineessa, joka sisältää 6,5 % keittosuolaa (NaCl) sekä sappi-eskuliinimaljalla, jossa ne voidaan alustavasti tunnistaa eskuliinin hydrolyysikykyänsä ansiosta. Enterokokit ovat yleensä non-hemolyyttisiä, mutta voivat olla myös alfa- tai beetahemolyyttisiä kasvaessaan verimaljalla. (Anttila ym. 2003, 129; Hellstén, 2005, 32; Murray ym. 1999, 300; University of Oklahoma Disclaimers 2006; University of Maryland 2000.)

2.2 Enterokokkien esiintyminen

Enterokokit ovat *Escherichia colin* jälkeen yleisimpiä aerobisia suolistobakteereja eli ne kuuluvat ihmisen normaaliflooraan (Anttila ym. 2003, 129). Enterokokeista virulenteimpia eli herkemmin tautia aiheuttavia lajeja ovat arabinoosipositiiviset lajit (kts. arabinoositesti s.10), joita ovat *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. gallinarum* sekä *E. columbae*. Kaikkia näitä lajeja ei kuitenkaan esiinny ihmisillä. Ihmisessä esiintyviä arabinoosipositiivisia enterokokeja ovat *E. faecium*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* sekä *E. mundtii*. Kliinisen mikrobiologian laboratorion eristämistä enterokokeista yli 95 % on joko *Enterococcus faecalis*- tai *Enterococcus faecium*-lajeja. *E. faecalis*en normaaliflooran esiintymispaikkana on suolisto, kun *E. faecium*ia löytyy iholta. (Anttila ym. 2003, 129; Hellstén, 2005, 32; Murray ym. 1999, 300.)

2.3 Enterokokki-infektiot

Enterokokit ovat opportunistipatogeenia eli aiheuttavat infektiota vain puolustuskyvyltään heikentyneille ihmisille. Ne aiheuttavat lähinnä virtsatieinfektioita, mutta niitä löydetään joskus myös selluliiteista sekä vatsan ja lantion alueen syvistä infektiosta. Enterokokkeja on eristetty veriviljelyistä yhdessä enterobakteerien ja anaerobien bakteerien kanssa sellaisilta potilailta, joilla on esimerkiksi haavainfektioita, makuuhaavoja tai diabeettisia jalkahaavaumia. Enterokokit voivat aiheuttaa myös endokardiitteja. (Anttila ym. 2003, 129-130; Huovinen ym. 1998, 115 -117.)

Enterokokki-infektiolle altistavia tekijöitä voivat olla vakava perustauti, kuten syöpä tai munuaisten vajaatoiminta, kirurgiset toimenpiteet, virtsakatetri, pitkä sairaalassaoloaika tai antibioottihoito. Enterokokki-infektiot saavat yleensä alkunsa joko potilaan omasta mikrobifloorasta tai esimerkiksi tartunnasta sairaalassa. Sairaalainfektioiden aiheuttajana enterokokkien merkitys on jatkuvasti lisääntymässä. (Anttila ym. 2003, 129-130; Huovinen ym. 1998, 115 -117.)

2.4 Vankomysiinille resistentti enterokokki eli VRE

Enterokokit ovat luonnostaan resistenttejä monille antibiooteille. *E. faecalis* on herkkä penisilliineille ja glykopeptideille (vankomysiini ja teikoplaniini) mutta *E. faecium* on yleensä penisilliineille resistentti, ollen kuitenkin herkkä glykopeptideille. Myös *E. faecalis* voivat penisilliiniä sitovat proteiinit muuntua, jolloin ne tulevat yhtä aikaa resistenteiksi kaikille penisilliineille ja jäävät herkiksi ainoastaan vankomysiinille sekä teikoplaniinille. Vuonna 1986 maailmalla löydettiin ensimmäinen vankomysiinille resistentti enterokokki eli VRE. (Anttila ym. 2003, 129 -130.) Vankomysiiniresistenssin aiheuttavasta resistenssigeenistä on olemassa kolme eri fenotyyppiä, *vanA*, *vanB* ja *vanC*. *VanA*- fenotyypin omaavat bakteerit ovat resistenttejä vankomysiinille sekä teikoplaniinille, *vanB*- tyyppin bakteerit taas ovat hyvin resistenttejä vankomysiinille, mutta herkkiä teikoplaniinille. *E. gallinarum* ja *E. casseliflavus* omaavat luonnostaan *vanC*- tyyppin resistenssin ja ovat heikosti resistenttejä vankomysiinille ja herkkiä teikoplaniinille. Vankomysiinille resistentit kannat ovat usein resistenttejä myös ampicilliinille. (Huovinen ym. 1998, 118; Public Health Agency of Canada 1998.) Kun kliinisen mikrobiologian laboratorio tunnistaa uuden VRE -kannan, on

erittäin tärkeää, että se pystyttäisiin tunnistamaan lajitasolle saakka. Ellei bakteeria pystytä tunnistamaan lajitasolle saakka, voivat *E. gallinarum* tai *E. casseliflavus* luontaisen *vanC* – tyyppin resistenttiydensä vuoksi aiheuttaa väärän VRE –löydöksen. (Nissinen, 2006.)

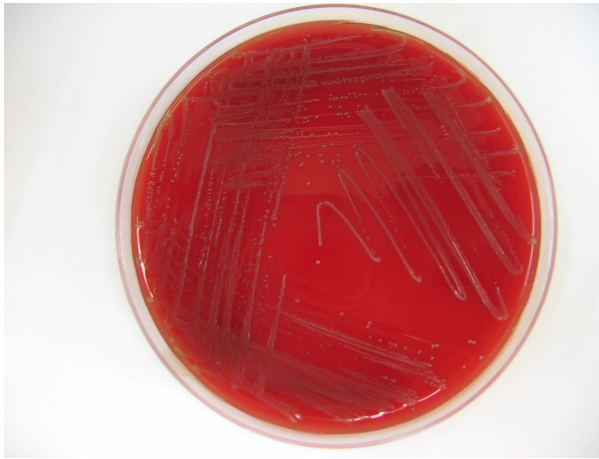
Vankomysiinille resistentin enterokokin on todettu säilyvän pitkään elossa ja tartuntakykyisenä ympäristössä ja kosketuspinoilla. Potilaan kolonisoiduttua VRE-kannalle häntä on vaikea saada siitä vapaaksi. Ainoaksi torjuntatoimeksi jääkin enterokokkien leviämisen estäminen parantamalla hygieniää ja vähentämällä vankomysiinin käyttöä. VRE:n torjunta onnistuu sitä paremmin, mitä pienempi on kolonisoituneiden potilaiden määrä. Suomessa on eniten VRE-kantoja eristetty HUS:ssa, mutta niitä on löydetty muissakin sairaaloissa. (Huovinen ym. 1998, 118-119.)

2.5 Enterokokkien tutkiminen mikrobiologian laboratoriossa

Kun näyte saapuu laboratorioon, se viljellään erilaisille elatusmaljoille, riippuen näytelaadusta. Yleisimmät maljat ovat CLED-, veri- sekä suklaamalja. Viljeltyjä maljoja inkuboidaan aerobioloissa 35 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä tarkastellaan maljalla mahdollisesti esiintyviä bakteeripesäkkeitä, ja jos maljalla ei ole kasvua, inkuboidaan sitä vielä yön yli. Maljalla olevasta bakteeripesäkkeestä arvioidaan sen kokoa, muotoa, väriä, tiheyttä (läpikuultava, läpinäkyvä, samea), pintaa (kiiltävä, sileä, himmeä) sekä olomuotoa (pehmeä, kova, tarttuva, limainen). Enterokokkipesäke on verimaljalla pieni, pyöreä ja valkoinen pesäke (kts. KUVA 1 s.5). Maljaa myös haistellaan, sillä monilla bakteerilajeilla on oma tyyppillinen tuoksunsa. Verimaljalla olevasta kasvusta voidaan arvioida bakteerin aiheuttamaa hemolyysiä. Hemolyysi voi olla joko α -, β - tai non- hemolyysityyppiä. (A. Nissinen 1997; B. Nissinen 1997.)

Bakteeripesäkkeille voidaan tehdä erilaisia pikatestejä, joilla pystytään alustavasti saamaan selville minkä suvun bakteerista voisi olla kyse. Enterokokeille tehtävä pikatesti on katalaasitesti, jolla erotetaan enterokokit ja streptokokit stafylokoikeista. Bakteeripesäke voidaan myös värjätä objektilasilla Gramvärjäyksellä, jolloin saadaan selville, onko tutkittava bakteeri grampositiivinen vai gramnegatiivinen, kokki- tai sauvabakteeri. Kun on herännyt epäily, että maljalla kasvava bakteeri voisi olla enterokokki, tehdään sille arabinoosi- ja sappieskuliinitestit sekä lääkeherkkyysmääritys hoidossa kysymykseen tuleville

bakteerilääkkeille. Sappieskuliinipositiiviset, arabinoosinegatiiviset enterokokit vastataan lajinimellä *E. faecalis*, sappieskuliinipositiiviset, arabinoosipositiiviset enterokokit lajinimellä *E. faecium*. Jos bakteerikannan vankomysiiniherkkyys on alentunut, varmistetaan bakteerin laji Api 20 Strep:lla. (A. Nissinen 1997; B. Nissinen 1997.)



KUVA 1. verimaljalla kasvava *E. faecium* (Kajakoski & Vehkajärvi, 2006).

2.5.1 Katalaasitesti

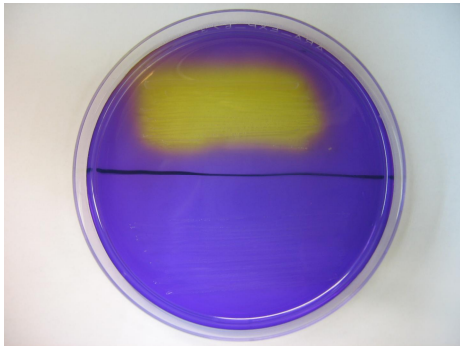
Katalaasitestin testiliuoksena on 3 % vetyperoksidi. Pisaraan vetyperoksidia siirrostetaan muutama pesäke tutkittavaa, alustavasti kokiksi epäiltyä bakteeria. Testiä ei voida tehdä verimaljalla kasvavasta bakteeripesäkkeestä, koska veri on katalaasipositiivista ja näin ollen saadaan väärä positiivinen tulos. Testi voidaan tehdä elatusmaljan kannen päällä tai objektilasilla. Jos pisarassa syntyy kuplintaa, ”kiehumista”, on kyseinen bakteeri katalaasipositiivinen eli todennäköinen stafylokokki. Katalaasipositiivinen bakteeri kykenee tuottamaan katalaasientsyymiä, joka pilkkoo vetyperoksidin vedeksi ja kaasumaiseksi hapeksi, joka ilmenee kuplintana. Jos mitään näkyvää reaktiota ei tapahdu, on bakteeri katalaasinegatiivinen ja luultavasti joko enterokokki tai jokin streptokokki. (Kouri, Anttinen, Icéń, Ikäheimo, Irjala, Kontiainen, Koskimies, Lipponen, Penttilä, Siitonen & Siukola 1999; 48.)

2.5.2 Gramvärjäys

Gramvärjäys kuuluu niin sanottuihin erotteleviin menetelmiin, jonka kehitti vuonna 1884 tanskalainen lääkäri Christian Gram (Hellstén, 2005, 33; Katila, 2004, 348). Gramvärjäyksen avulla bakteerit voidaan ryhmitellä morfologian (kokit ja sauvat) sekä värjäytyvyyden (grampositiiviset ja gramnegatiiviset) perusteella. Värjäyksessä Huckerin kristallivioletti värjää sellaiset bakteerisolut sinisiksi tai tumman sinivioleteiksi, joilla on soluseinämässä paksu peptidoglykaanikerros. Tällaiset bakteerit ovat grampositiivisia. Ohuen peptidoglykaanikerroksen omaavista bakteerisoluista kristallivioletti huuhtoutuu pois, jolloin ne saadaan näkyviksi vastavärjäämällä safraniinilla. Värjäystulos on tällöin punainen tai vaaleanpunainen, ja bakteeri on gramnegatiivinen. (Hellstén, 2005, 32-34; Kouri ym. 1999, 47; C. Nissinen 1997; Vaara, Skurnik & Sarvas 2003, 58-62.)

2.5.3 Arabinoosin fermentaatiotesti

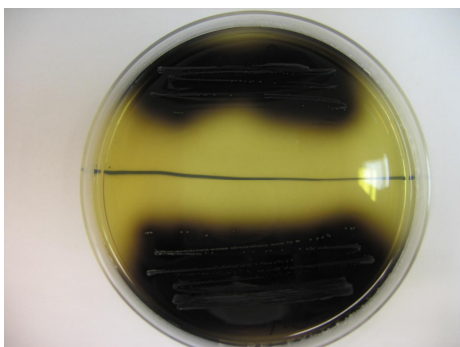
Arabinoosin fermentaatiotestillä pystytään erottamaan *E. faecalis* ja *E. faecium* toisistaan. Tutkittavaa bakteerikantaa siirrostetaan puhtasviljelmältä viivaksi arabinoosimaljalle, joka sisältää runsaasti arabinoosia sekä pH- indikaattorin, jonka avulla tulos voidaan tulkita. Maljaa inkuboidaan 35 °C:ssa yön yli, jonka jälkeen tarkastellaan maljan värinmuutosta. *E. faecalis* on arabinoosinegatiivinen eli se ei aiheuta maljalla värinmuutosta. *E. faecium* on arabinoosipositiivinen eli se pystyy fermentoimaan arabinoosia, josta syntyvät happamat fermentaatiotuotteet laskevat maljan pH:ta ja maljan väri muuttuu bakteerikasvun ympäriltä keltaiseksi (kts. KUVA 2 s. 7). (D. Nissinen 1997.)



KUVA 2. Arabinoosimaljalla kasvavat *E. faecium* (ylempi) ja *E. faecalis* (alempi) (Kajakoski & Vehkajärvi, 2006.)

2.5.4 Sappieskuliinitesti

Sappieskuliinitestiä käytetään enterokokkien ja D-ryhmän streptokokkien erottamiseen viridans-ryhmän streptokokeista. Maljalla voidaan tunnistaa myös *Listeria*. Tutkittavaa bakteerikantaa siirrostetaan viivaksi 40 % sappea sisältävälle sappieskuliinimaljalle. Maljaa inkuboidaan yön yli aerobisesti 35 °C:ssa. Sappea kestävät bakteerit kasvavat maljalla. Jos ne lisäksi pystyvät hajottamaan maljalla olevan eskuliinin eskuletiiniksi, ovat pesäkkeet ja niiden lähiympäristö mustia, koska eskuletiini muodostaa tumman sakan alustan sisältämän raudan kanssa (kts. KUVA 3). Enterokokit sekä D-ryhmän streptokokit ovat sappea sietäviä, eskuliiniposiitivisia bakteereja. (Kouri ym. 1999, 48; Pietikäinen 1998.)

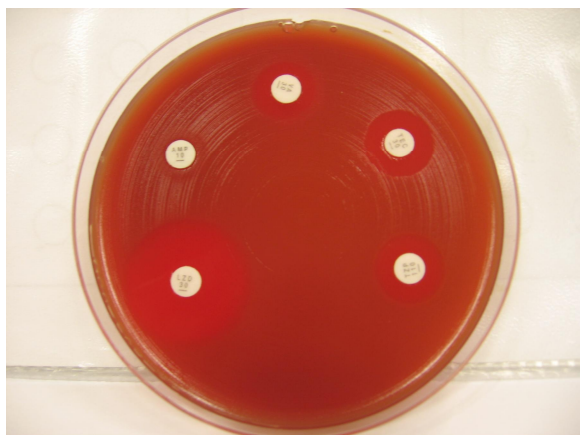


KUVA 3. Sappieskuliinimaljalla kasvavat *E. faecium* ja *E. faecalis* (Kajakoski & Vehkajärvi, 2006.)

2.5.5 Bakterilääkeherkkyys

Bakterilääkeherkkyys määritetään kiekkomenetelmällä ja sen tarkoitus on selvittää, onko bakteerilla hankittua resistenssiä sen aiheuttamien infektioiden hoidossa kysymykseen tuleville lääkkeille. Bakteerin lääkeherkkyys on suoraan verrannollinen antibioottikiekon ympärille muodostuvan estorengaan pinta-alaan. Koska pinta-ala on käytännössä vaikea mitata, mitataan estovyöhykkeen halkaisija, joka mitataan joko automaattilla tai manuaalisesti. Tutkittavasta bakteerikannasta tehdään McFarland turbiditeettistandardia no: 0,5 vastaava suspensio keittosuolaan. Suspensio levitetään tasaisesti Mueller-Hinton veriherkkyysmaljalle vanutikulla dreijaamalla. Ampisilliini (AMP), vankomysiini (VA), teikoplaniini (TEC) sekä virtsaviijelyissä nitrofurantoiini (F) antibiootteja sisältävät imupaperiekot laitetaan maljalle kiekkoannostelijan avulla. Maljaa inkuboidaan yön yli 35 °C:ssa aerobioloissa. (Nissinen, 2005.)

Tulokset luetaan mittaamalla estorengaan halkaisija (kts. KUVA 4). Jos bakteeripesäkkeet kasvavat kiinni kiekkoon, on kyseinen bakteeri resistentti eli vastustuskykyinen (R) kiekosta maljalle imeytyneelle antibiootille. Estorengas kiekon ja bakteeripesäkkeiden välillä on merkki bakteerin sensitiivisyydestä eli herkkyudesta kyseiselle antibiootille (S). Estorengaan halkaisijalle on määritetty SIR- rajat, joiden perusteella saadaan selville onko kyseinen kanta resistentti vai herkkä. Ampisilliinin SIR- rajat ovat $R \leq 16 \text{ mm}$ $S \geq 17 \text{ mm}$, vankomysiinin $R \leq 14 \text{ mm}$ $S \geq 17 \text{ mm}$, teikoplaniinin $R \leq 10 \text{ mm}$ $S \geq 14 \text{ mm}$ ja nitrofurantoiinin $R \leq 14 \text{ mm}$ $S \geq 17 \text{ mm}$. Rajojen väliin jäävät tapaukset tulkitaan I:ksi, jolloin kyseisen bakteerin lääkeherkkyys on hieman alentunut tälle antibiootille, eikä lääkettä kannata käyttää potilaan hoitamiseen. (Nissinen, 2005.)



KUVA 4. Enterokokkilääkeherkkyyskiekot Mueller-Hinton veriherkkyysmaljalla (Kajakoski & Vehkajärvi, 2006.)

3 ENTEROKOKKIEN TUNNISTUKSESSA KÄYTETYT TESTIMENETELMÄT

Ranskalaisen BioMérieux:n valmistamaa Api 20 Strep testiä käytetään streptokokkien, enterokokkien sekä niiden sukulaislajien tunnistukseen ja nimeämiseen. Testiliuska koostuu 20:stä biokemiallisesta testikaivosta, joiden sisältämien dehydroitujen substraattien avulla osoitetaan bakteerien entsyymaattista aktiivisuutta tai sokereiden fermentaatiota eli käymistä. Inkubaation aikana bakteerien tuottamat entsyymit tai happamat aineenvaihdunnan tuotteet muuttavat kaivoissa olevien reagenssien värin. Värimuutos voi olla joko välitön tai se tapahtuu vasta reagenssin lisäyksen jälkeen. Testissä käytettäviä reagensseja ovat VP 1-, VP 2-, ZYM A-, ZYM B- sekä NIN –reagenssit. Reagensseista VP 1 ja ZYM A säilytetään huoneenlämmössä. ZYM B- ja NIN –reagenssit säilytetään jääkaappilämpötilassa hyvin valolta suojattuina foliokääreessä. Reagenssit säilyvät yhden kuukauden avaamisen jälkeen. (BioMérieux Api 20 Strep -käyttöohje, 2004.)

Saman ranskalaisen BioMérieux:n valmistamaa Rapid ID 32 STREP testiä käytetään streptokokkien ja niiden sukuisten bakteereiden tunnistamiseen. Rapid ID 32 STREP testiliuska sisältää 32 näytekaivoa, joissa seitsemässä näytekaivoissa mitataan oksidaatioreaktiota, 17:sta hiilihydraattien fermentaatiota, kolmessa arylamidaasireaktiota ja yhdessä alkalista fosfataasia. Lisäksi Rapid ID 32 STREP testi sisältää neljä biokemiallista testiä. (Freney, Bland, Etienne, Desmonceaux, Boeufgras & Fleurette 1992, 2657.) Neljän tunnin inkubaation aikana bakteerien tuottamat entsyymit tai happamat aineenvaihdunnan tuotteet muuttavat kaivoissa olevien reagenssien värin. Värimuutos voi olla joko välitön tai se tapahtuu vasta reagenssin lisäyksen jälkeen. Testissä käytettäviä reagensseja ovat VP A-, VP B-, FB- ja NIN-reagenssit. Näistä VP A säilytetään huoneenlämmössä ja VP B-, FB- ja NIN -reagenssit säilytetään jääkaappilämpötilassa. Reagensseista FB- ja NIN tulee säilyttää lisäksi folioon käärittynä. Tulokset tulkitaan ATB Expression -lukulaitteella tai visuaalisesti. Positiivisten ja negatiivisten reaktioiden perusteella saadaan numerokoodi, jolla saadaan lajintunnistus Apiweb -tietokoneohjelman avulla. (BioMérieux Rapid ID 32 STREP - käyttöohje, 2004.)

Amerikkalaisen Remelin valmistama RapID™ STR testi on kvalitatiivinen menetelmä, jossa käytetään kromogeenisia substraatteja kliinisesti tärkeimpien streptokokkien sekä niille läheistä sukua olevien muiden bakteerien tunnistukseen. RapID™ STR menetelmällä voidaan tunnistaa mm. A, B, C, D ja G- ryhmän streptokokit, viridans streptokokit, *Streptococcus pneumoniae*, *Weisella confusus*, *Listeria monocytogenes*, yleisimmät *Enterococcus*-, *Aerococcus*-, *Gemella*-, *Leuconostoc*- sekä *Pediococcus* -lajit. RapID™ STR testi koostuu RapID™ STR paneelista sekä RapID™ STR reagenssista. Reagenssi säilytetään jääkaappilämpötilassa. Paneelissa on useita reaktiokaivoja, jotka sisältävät dehydroituja reagensseja. Neljän tunnin inkuboinnin ja tarvittavan reagenssilisäyksen jälkeen jokaisen testikaivon tulos luetaan tarkastelemalla värin muodostusta. Tulosliuskalle merkitään positiivisten ja negatiivisten testitulosten pistemäärät, joista saatavalla numerosarjalla saadaan bakteerin laji ERIC™ Electronic RapID Compendium -tietokoneohjelmalla (vrt. Api 20 Strep). (Remel, 2004.)

Tanskalaisen Rosco diagnostican Diatabs™ –tuotteista löytyy erityisesti yleisimpien enterokokkien tunnistukseen ja diagnosointiin kehitetty sarja tablettimuotoon puristettuja reagensseja. Testisarja sisältää kaksi antibioottiherkkyyskiekkoa, joista toinen sisältää 50 µg furatsolidonia (Furaz) ja toinen 10 µg mupirosiinia (Mupir). Lisäksi testiin kuuluu kaksi sokereiden fermentaatiota ilmentävää kiekkoa. Sokereiden fermentaatiota ilmentävä kiekko sisältää d-ksyloosia (XYL), laimeaa puskuria sekä fenolinpunaindikaattorin, jolla saadaan aikaiseksi sokerin fermentaatiosta kertova värinmuutos. Toinen, glykosidaasia ilmentävän alfa-galaktosidaasikiekon (α-GAL) toiminta perustuu entsyymaattisesti keltaisen nitrofenolin vapautukseen kiekossa olevasta substraatista. Testiin kuuluvat myös motiliteetti- eli liikkuvuusputki, joka sisältää agarilla hyydytettyä elatusainetta sekä pigmentin eli pesäkkeen värin tarkastelun puhdasviljelymaljalta. (Rosco Diagnostica, 2005.)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TEHTÄVÄT

Opinnäytetyön aihe saatiin Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorion sairaalamikrobiologi Antti Nissiseltä. Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorio vastaa tällä hetkellä kaikki arabinoosipositiiviset enterokokit lajinimellä *Enterococcus faecium*. Hypoteesina työssä oli, että kaikki tutkittavat bakteerikannat ovat *E. faecium*-lajeja. Vaikka *E. faecium* on arabinoosipositiivisista lajeista yleisin, voi kliinisissä näytteissä esiintyä myös muita arabinoosipositiivisiä enterokokeja. Työn tarkoituksena oli kuvata erilaisten diagnostisten testien avulla millaisia arabinoosipositiivisiä enterokokeja potilasnäytteistä löytyy ja miten ne voidaan luotettavasti tunnistaa. Tavoitteena oli löytää testi, joka nopeuttaa ja tarkentaa diagnoosin tekoa sekä soveltuu diagnostiseen analytiikkaan enterokokkien tunnistuksessa. Tällaiselta testiltä vaadittavia ominaisuuksia ovat bakteerilajin luotettava tunnistus, käyttäjäystävällisyys sekä mahdollisimman yksiselitteinen tulkinta. Työssä vertailtiin lisäksi valituilla testeillä saatuja tuloksia keskenään tunnettujen kontrollikantojen avulla.

Mikäli jokin käytetyistä testeistä osoittautuu hyväksi, tarkentaen diagnoosin tekoa, Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorio saattaa ottaa sen rutiinikäyttöön enterokokkien tunnistamisessa.

Tutkimusongelmat:

- Kuinka luotettavasti enterokokit pystytään tunnistamaan Api 20 Strep-, Rapid ID 32 STREP-, RapIDTMSTR System- ja Diatabs –testeillä?
- Millä edellytyksillä jokin tutkituista testeistä soveltuu diagnostiseen analytiikkaan?

5 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tämä tutkimus on semikvantitatiivinen tutkimus, jossa ilmenee myös kvalitatiivisen tutkimuksen piirteitä. Tutkimus on lisäksi empiirinen, kuvailevaan eli deskriptiiviseen tyyppiin kuuluva. (Koivula, Suihko & Tyrväinen 2003, 17, 37.)

Opinnäytetyössä aineiston kerääminen, käsittely ja analysointi tapahtui toisistaan erottuvina vaiheina, joka on yksi kvantitatiivisen tutkimuksen piirteitä. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tulosten arviointi tapahtuu mittauksen validiteetin ja reliabiliteetin perusteella. Validiteetilla tarkoitetaan mittarin kykyä mitata sitä, mitä on tarkoitus. Reliabiliteetilla tarkoitetaan puolestaan mittauksen luotettavuutta. (Koivula ym. 2003, 37). Työssä aineiston analysointi ja arviointi tapahtui valittujen testien avulla, soveltaen validiteetin ja reliabiliteetin käsitteitä. Validiteettina eli mittarina työssä oli testit, joiden kykyä tunnistaa eri enterokokkilajit mitattiin. Reliabiliteettina työssä taas oli se, kuinka luotettavasti testit pystyivät eri enterokokkilajit tunnistamaan.

Kvantitatiivisen tutkimuksen tuloksena syntyy lukuarvoja sisältävä havaintoaineisto, jota voidaan käsitellä tilastollisesti. Päätelmien teko perustuu havaintoaineiston tilastolliseen analysointiin perustuen. Muita keskeisiä piirteitä kvantitatiivisessa tutkimuksessa ovat hypoteesien esittäminen sekä aineiston keruun suunnitteleminen. (Koivula ym. 2003, 37; Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2000, 129.) Opinnäytetyön hypoteesina oli, että kaikki tutkittavat bakteerikannat olivat *E. faecium* -lajia. Tutkimusaineiston keräämistä suunniteltiin etukäteen ennen testauksen aloitusta. Työ sisältää itse tuotettua tutkimusaineistoa, josta saatiin tilastollisesti käsiteltäviä tuloksia. Tulosten avulla voitiin vertailla käytettyjen testien toimintaa sekä luotettavuutta tunnistaa eri bakteerilajeja. Saadut tulokset taulukoitiin Microsoft® Excel- taulukkolaskentaohjelmalla.

Kvalitatiivisen tutkimuksen tehtävänä on ymmärtää sekä tulkita tuloksia, joiden arviointi tapahtuu päättelyprosessin perusteella. Tällainen tutkimus vaatii lisäksi vahvan teoreettisen pohjan (Koivula ym. 2003, 31, 37). Opinnäytetyössä lähdettiin liikkeelle teoriasta ja tulosten arviointi tapahtui päättelyn ja pohdinnan perusteella.

Kuvailevassa eli deskriptiivisessä tutkimuksessa on tarkoitus kuvata muun muassa jonkin ilmiön tunnuspiirteitä ja havaintojen luotettavuutta ja tarkkuutta (Koivula ym. 2003, 17). Työssä kuvailtiin testien käyttö ja toimivuus sekä se, kuinka testit tunnistivat enterokokkien lajeja. Lisäksi työssä kuvailtiin kuinka luotettavina tuloksia voidaan pitää.

6 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

6.1 Tutkimusaineiston keruu, aikataulu ja toteutus

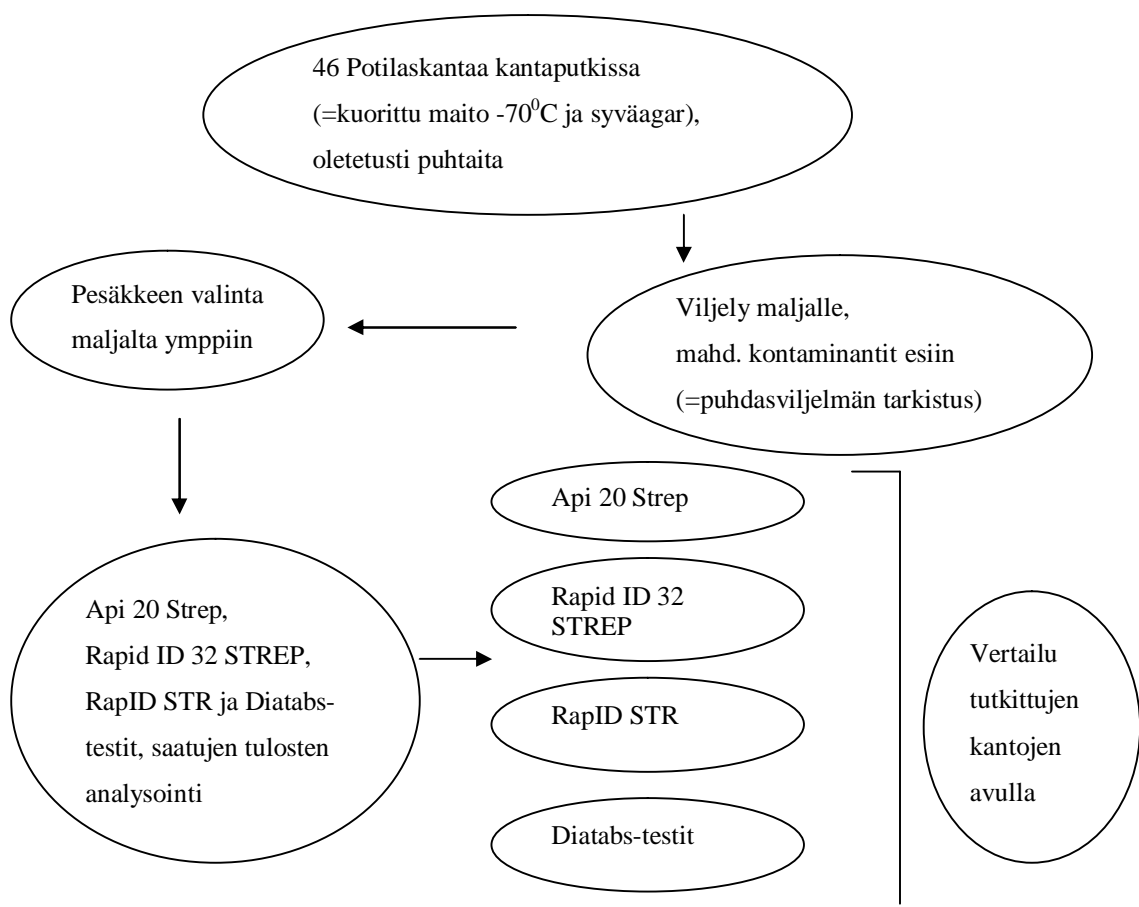
Tutkimusaineiston keräsi Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorion henkilökunta. Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat olivat potilasnäytteistä eristettyjä. Mukana oli myös kolme kontrollikantaa, jotka olivat *E. faecium* (UKNEQAS 7218), *E. faecalis* (ATCC 29212) ja *E. gallinarum* (WHO 27). Kontrollikantojen avulla testattiin käytettyjen tunnistusmenetelmien toimivuus, luotettavuus sekä bakteerilajin tunnistuskyky. Veriviljelyistä eristetyt *Enterococcus faecium*- lajiksi vastatut kannat olivat kolmen vuoden ajalta kerättyjä syväjäädetyttyjä kantoja. Virtsaviljelyistä *Enterococcus faecium*- lajiksi vastattuja kantoja kerättiin kevään 2005 aikana. Koska kannat oli identifioitu näyttenumeroilla eikä näytteissä ollut potilastietoja näkyvissä, työssä ei ilmennyt eettisiä ongelmia.

Kaikki tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat olivat arabinoosiposiitivisia, *E. faeciumiksi* vastattuja. Tutkimuksen kokonaisnäyttemäärä oli 46 bakteerikantaa, sisältäen kontrollikannat. Työn diagnostisten testien valinta tapahtui Keski-Suomen keskussairaalan sairaalamikrobiologi Antti Nissisen kanssa yhteistyössä. Testikittien valintaperusteena oli, että ne ovat Suomessa kaupallisesti saatavia ja niitä käytetään kliinisissä laboratorioissa. Yleisimmin Suomessa käytössä olevan testikitin Api 20 Strep:n lisäksi muiden testikittien toimivuutta ei vielä kovin hyvin tunneta kliinisessä laboratoriotyössä. Työhön valittiin neljä eri testiä mahdollisimman monipuolisten tulosten saamiseksi.

Bakteerikantojen testaus aloitettiin 17.5.2005 ja tutkimukset saatiin päätökseen 9.6.2005. Testejä tehtiin 3-5 päivänä viikossa yhdessä parin kanssa. Ennen laboratoriotyöskentelyn aloittamista testikittien ohjeisiin tutustuttiin huolellisesti ohjaajan kanssa ja laadittiin suomenkieliset työohjeet niiden pohjalta. Käyttöohjeissa selvitettiin testien toimintaperiaatteet, reagenssien käyttö ja säilytys, työturvallisuusasiat, näytteiden esikäsittely sekä tulosten tulkinta. Myös työn käytännön toteutusta suunniteltiin etukäteen.

Testejä tehtiin aluksi vain muutamalla kannalla kokemuksen ja varmuuden saamiseksi testin suorittamiseen. Samalla pystyttiin kiinnittämään huomiota testaukseen kuluvaan aikaan ja siihen kuinka monta kantaa olisi sopiva määrä testattavaksi yhden illan aikana. Jos tulokset tulleiden värireaktioiden tulkinnassa ilmeni epävarmuutta, yritettiin asiaa ratkaista ensin parin kanssa. Tarvittaessa käännyttiin henkilökunnan tai sairaalamikrobiologi Antti Nissisen puoleen. Ennen testausta tuli testipakkaukset, tutkittavat kannat sekä tarvittaessa maljat ottaa huoneenlämpöön lämpenemään ja testit tuli identifioida kantanumeroilla ennen testin tekoa. Työn edetessä ja taitojen karttuessa testattavien kantojen määrä oli noin viisi- kahdeksan kantaa päivässä.

Osassa laboratorion työhön keräämissä virtsakantaputkissa kasvoi limaista kontaminanttibakteeria. Tämä hankaloitti tutkittavan bakteerikannan ulosviljelyä ja aiheutti kontaminaatiota puhdasviljelmiin (pv). Kontaminaation vuoksi osasta puhdasviljelmiä jouduttiin tekemään uudet pv:t, jotta tutkittava kanta saatiin puhtaana testattavaksi. Osa virtsakantaputkista jouduttiin jättämään kokonaan pois tutkimuksesta kontaminaation vuoksi.



KAAVIO 1. Tutkimusprosessi

6.2 Käytetyt testimenetelmät

6.2.1 Api 20 Strep

Tutkittavista puhtasviljelmällä kasvavista bakteeripesäkkeistä tehtiin steriilillä vanutikulla Api Suspension Mediumiin (aqua) maitomainen, McFarland turbiditeettistandardia no: 4 vastaava suspensio (16×10^8 bakteeria/ ml). Steriilillä pasteuripipetillä täytettiin Api-liuskan testikaivot liuskan puoleen väliin saakka ohjeen mukaan, osa kaivoista täyteen ja osa puoleen väliin. Jäljelle jäänyt bakteerisuspensio lisättiin API GP Mediumiin ja sekoitettiin hyvin. Loput API liuskan testikaivoista täytettiin tällä laimennetulla bakteerisuspensiolla puoleen väliin saakka. Liuskalla alleviivatut testikaivot täytettiin paraffiiniöljyllä, jotta saatiin aikaiseksi anaerobit kasvuolosuhteet. Tippa jäljelle jäänyttä bakteerisuspensiota viljeltiin lopuksi verimaljalle eli tehtiin niin sanottu perämalja, jotta nähtiin sisälsikö valmistettu bakteerisuspensio ainoastaan yhtä bakteerilajia. Perämaljalta pystyttiin myös arvioimaan bakteerin aiheuttama mahdollinen hemolyysi. Testiliuskaa inkuboitiin 4 tuntia 35 °C:ssa ohjeen mukaan, jonka jälkeen suoritettiin ensimmäinen luku. Ensimmäisen lukukerran jälkeen testiä inkuboitiin vielä 20 tuntia (yht. 24 h) ja luettiin tulokset uudelleen. Perämaljaa inkuboitiin 24 tuntia 35°C:ssa aerobeissa oloissa. (BioMeriëux Api 20 Strep -käyttöohje, 2004.)

Neljän tunnin inkuboinnin jälkeen VP-kaivoon tiputettiin 1 tippa VP1- ja 1 tippa VP2-reagenssia, HIP-kaivoon tiputettiin 2 tippaa NIN-reagenssia, PYR A, α -GAL, β -GUR, β -GAL, PAL, sekä LAP kaivoihin tiputettiin 1 tippa ZYM A- ja 1 tippa ZYM B- reagensseja. Reagenssien tiputuksen jälkeen odotettiin 10 minuuttia, jonka jälkeen tulokset olivat luettavissa vertaamalla syntynyttä väriä testin mukana tulleeseen lukutaulukkoon (liite 1) ja merkittiin tulokset tulosliuskaan (liite 2). Lukemisen jälkeen testi laitettiin takaisin inkuboitumaan. 24 tunnin inkuboinnin jälkeen luettiin uudelleen kaivojen ESC, ADH, RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD sekä GLYG reaktiotulokset. (BioMeriëux Api 20 Strep -käyttöohje, 2004.)

Lukutaulukon avulla, positiivisten ja negatiivisten reaktioiden perusteella saatiin numerokoodi. Tulosluskalla testikaivot oli jaettu kolmen ryhmiin ja pisteytetty joko 1:llä, 2:lla tai 4:llä pisteellä. Positiivinen reaktio antoi kyseisen kaivon kohdalla olevan pistemäärän. Hemolyysistä saatiin liuskan 21. tulos, jossa beetahemolyysi oli positiivinen reaktio ja muut hemolyysit negatiivisia. Kolme kaivoa sisältävän ryhmän pisteet laskettiin yhteen, jolloin saatiin seitsennumeroinen koodi. Numerokoodia verrattiin testin mukana tulleeseen luetteloon (Analytical Profile Index) tai käyttämällä tarkoitukseen olevaa Apiweb-tietokoneohjelmaa saatiin tutkitulle bakteerille nimi (liite 3). (BioMérieux Api 20 Strep -käyttöohje, 2004 & Kelder, 2003.)

6.2.2 Rapid ID 32 STREP

Tutkittavista, puhdasviljelmällä kasvavista bakteeripesäkkeistä tehtiin API Suspension mediumiin (aqua) McFarland turbiditeettistandardia no: 4 vastaava (16×10^8 bakteeria/ml) maitomainen suspensio steriilillä vanutikulla. Jokaiseen testiliuskan kaivon tiputettiin 55 μ l eli 1 pasteurpipetin tippa bakteerisuspensiota. Jäljelle jääneestä suspensiosta tehtiin perämalja kuten edellä API 20 Strep testissä. Testiä inkuboitiin neljä tuntia ja perämaljaa yön yli 35°C:ssa. Neljän tunnin kuluttua VP testikaivon lisättiin 1 tippa VP A- sekä 1 tippa VP B-reagensseja, APPA, β -GAL, PyrA, β -NAG, sekä GTA kaivoihin lisättiin kuhunkin 1 tippa FB-reagenssia ja HIP kaivon lisättiin 1 tippa NIN-reagenssia. Kaikkien reagenssien lisäyksen jälkeen odotettiin viisi minuuttia, jonka jälkeen tulokset olivat luettavissa. Kaikki muut testin kaivojen tulokset voitiin lukea heti, ilman reagenssilisäyksiä. Tulokset luettiin vertaamalla syntyneitä värejä testin mukana tulleeseen lukutauluun (liite 4) ja tulokset merkittiin tulosluskalle (liite 5). Testikaivot oli jaettu kolmen ryhmiin, joista jokainen testi oli pisteytetty joko 1:llä, 2:lla tai 4:llä pisteellä. Positiivinen reaktio antoi kyseisen kaivon kohdalla olevan pistemäärän. Kolmen kaivon ryhmän pisteet laskettiin yhteen, jolloin syntyi 11- numeroinen koodi. Numerokoodi syötettiin ohjeen mukaan Apiweb -tietokoneohjelmaan, joka antoi sen perusteella bakteerille lajin (liite 6). (BioMérieux Rapid ID 32 STREP -käyttöohje, 2004.)

6.2.3 RapID™STR System

Tutkittavista, puhdasviljelmällä kasvavista bakteeripesäkkeistä tehtiin McFarland-turbiditeettistandardia no: 1 vastaava suspensio (2×10^8 bakteeria/ ml) RapID Inoculation Fluid:iin. Testin päällä olevan muovikalvon kulma repäistiin auki ja bakteerisuspensio pipetoitiin testikammioon. Testiä käännettiin varovasti, jotta kaikkiin kaivoihin tulisi saman verran suspensiota. Testikammioista, kittiä varovasti kallistamalla, suspensio valutettiin kaivoihin. Tipasta suspensiota tehtiin perämalja verimaljalle, jota inkuboitiin yön yli 35°C :ssa. Testiä inkuboitiin neljä tuntia 35°C :ssa. Inkuboinnin jälkeen kaivojen 1-10 reaktiot luettiin testiin kuuluvan reaktiotulkintataulukon (liite 7) avulla ja merkittiin tulokset ylös. Luvun jälkeen kaivoihin 7-10 tiputettiin 2 tippaa RapID STR reagenssia, odotettiin vähintään 30 s, enintään kolme minuuttia ja luettiin tulokset. Hemolyysin arvioinnista saatiin testin 15. tulos, jossa beetahemolyysi oli positiivinen testitulos ja muut hemolyysit negatiivisia. Testitulokset tulkittiin numerokoodiksi (vrt. Api 20 Strep) ja sen mukainen tunnistus haettiin ERIC™ Electronic RapID Compendium -tietokoneohjelmalla (liite 8). (Remel, 2004.)

6.2.4 Diatabs™

Antibioottiherkkyydestin suorittamiseksi tutkittavista bakteeripesäkkeistä tehtiin lasi- tai muoviputkeen McFarland turbiditeettistandardia no: 0.5 vastaava bakteerisuspensio (10^8 bakteeria/ ml) keittosuolaan (NaCl). Suspensio levitettiin tasaisesti Mueller-Hinton herkkyysmaljalle vanutikulla dreijaamalla. Antibioottikiekot (Furaz, Mupir) painettiin varovasti maljalle ja maljaa inkuboitiin yön yli 35°C :ssa. Tulos luettiin mittaamalla estorengaan halkaisija tai toteamalla onko antibioottikiekon ympärillä estorengas, eli kasvoiko bakteeripesäkkeet kiinni kiekkoon vai jäikö väliin alue, jossa bakteeripesäkkeitä ei kasvanut (vrt. bakteerilääkeherkkyys, s. 9). Jos bakteeripesäkkeet kasvoivat kiinni kiekkoon, oli kyseinen bakteeri resistentti eli vastustuskykyinen (R) kiekosta maljalle imeytyneelle antibiootille. Estorengas kiekon ja bakteeripesäkkeiden välillä oli merkki bakteerin sensitiivisyydestä eli herkkydestä kyseiselle antibiootille (S). (Rosco Diagnostica, 2005.)

Sokereiden fermentaatiota ilmentävän testin suorittamiseksi tutkittavista bakteeripesäkkeistä tehtiin lasi- tai muoviputkeen McFarland turbiditeettistandardia no: 4 vastaava bakteerisuspensio 0,5 ml:aan keittosuolaa. Suspension sekaan tiputettiin XYL- tai α -Gal - kiekko ja putki suljettiin korkilla. Putkea inkuboitiin 35°C:ssa. Tulokset luettiin neljän tunnin inkuboinnin sekä Antti Nissisen toiveesta myös yön yli inkuboinnin jälkeen. XYL-kiekkolla tulos oli positiivinen jos suspension väri oli keltainen tai kelta-oranssi ja negatiivinen jos väri oli punainen tai oranssi-punainen. α -Gal -kiekkolla tulos oli positiivinen jos väri oli keltainen ja negatiivinen jos liuos oli väritön. (Rosco Diagnostica, 2005.)

Liikkuvuusputki sisälsi elatusainetta, joka oli hyydytetty pienellä pitoisuudella agaria. Tähän ns. pehmytagariin pistettiin viljelysauhalla bakteeripesäkkeitä puhdasviljelymaljalta ns. pistoviljelmäksi. Putkea inkuboitiin yön yli 35°C:ssa. Jos tutkittava bakteeri kykeni liikkumaan kasvualustassa, levisi bakteerikasvu piston ympärille ja agar muuttui sameaksi. Liikkumaton bakteerikasvu rajoittui ainoastaan pistokohtaan ja ympäröivä elatusaine pysyi kirkkaana. (Rosco Diagnostica, 2005.)

Bakteeripesäkkeiden pigmenttiä eli väriä tarkasteltiin puhdasviljelmältä, jossa kasvoi ainoastaan tutkittavaa bakteeria. Pesäkkeet olivat joko valkoisia (0), kellertäviä tai keltaisia (+). (Rosco Diagnostica, 2005.)

7 TUTKIMUSTULOKSET

7.1 Api 20 Strep- testin tulokset

Api 20 Strep -testillä saadut tutkimustulokset koottiin taulukoksi 1 (liite 9). Taulukosta 1 nähdään neljän sekä 24 tunnin inkuboinnin jälkeen bakteereille saadut nimet (web- tulos), id- eli tunnistusprosentti kyseiselle lajille (id-%), vaihtoehtojen määrä lajeista samalla numerosarjalla (VI kpl) sekä numerosarjavaihtoehtojen määrä (Ns kpl). Lisäksi taulukossa on maininta perämaljan puhtaudesta ja kommentit, jos testin suorituksessa ilmeni jotain mainittavaa.

Tulokseksi tulleen numerosarjan perusteella saatu lajin nimi katsottiin vuoden 1992 Analytical Profile Index –kirjasta sekä Apiweb –tietokoneohjelman avulla (versio 1.1.0, 2003). Kirjasta katsotut tulokset jätettiin kokonaan pois tulostaulukosta (liite 9 ja 10), koska kirjan ja Apiweb:in tulkinnoissa ilmeni useita ristiriitaisuuksia ja Apiweb antaa päivitetymmät tulokset. Testi antoi neljän tunnin inkuboinnin jälkeen useimmiten 1-3 numerosarjavaihtoehtoa, kuten myös 24 h kohdalla.

Taulukko 2. Api 20 Strep-testillä saadut numerosarjavaihtoehdot

	Numerosarjavaihtoehdot	ka
4h	1-3	2
24h	1-3	2

Testi antoi kaikilla numerosarjoilla vähintään kaksi lajivaihtoehtoa eri id-%:lla. Neljän tunnin kohdalla lajivaihtoehtoja oli hieman enemmän kuin 24 tunnin inkuboinnin jälkeen.

Taulukko 3. Api 20 Strep- testillä saadut vaihtoehdot lajeista

	min	max	ka
4h	2	5	3,5
24h	2	4	3

Tulostaulukkoon 1 (liite 9) on otettu tulokset, joilla on suurin id-% eli tulos on todennäköisin laji tutkitulle kannalle. Suurin osa tulokseksi tulleista lajinimistä oli *E. faecium*, 42/46, useimmiten toisena lajinimivaihtoehtona esiintyi *E. avium* (17/46). Neljän tunnin inkuboinnin jälkeen testi antoi kaksi (15 kpl) tai neljä (13 kpl) nimivaihtoehtoa, kun taas 24 tunnin jälkeen nimivaihtoehtoja oli enintään kaksi. Taulukosta neljä nähdään mitä eri lajinimiä bakteerikannoille saatiin tulkinnoiksi neljän ja 24 tunnin inkubointien jälkeen sekä millä välillä niiden id%:t vaihtelivat.

Taulukko 4. Saadut lajinimet Api 20 Strep- testillä

Lajinimi	4h, kpl	Id-% vaihteluväli	ka id-%:sta	24h, kpl	Id-% vaihteluväli	ka id-%:sta
<i>E. faecalis</i>	1	99,3	99,3	1	99,7	99,7
<i>E. faecium</i>	33	55,9 - 98,9	80,2	42	80,3 - 99,9	94,86
<i>E. durans</i>	3	47,5 - 94,8	67,4	1	68,2	68,2
<i>E. avium</i>	3	49,6 - 93,7	74,8	1	93,7	93,7
<i>E. gallinarum</i>	0			1	68,3	68,3
<i>Leuconostoc</i>	4	41,9 - 96,8	72,6	0		
<i>Aeroc. viridans</i>	1	59,9	59,9	0		
Ei tulosta	1			0		

Sekä kirja että tietokoneohjelma antoivat id-%:n lisäksi myös lausunnon tuloksen luotettavuudesta. Nämä lausunnot jätettiin pois tulostaulukosta 1, koska niille ei keksitty mitään pätevää logiikkaa ja ne olivat useimmiten ristiriidassa id-%:n kanssa.

Kontaminoituneita perämaljoja oli viisi 46:sta. Kontaminaatioaste oli niin matala (1-6 pesäkettä/ malja), että sen katsottiin olevan merkityksetön.

Api 20 Strep- testillä tutkittiin 46 kantaa, joista kolme olivat tunnettuja kontrollikantoja. Yhtenä tutkimuspäivänä testissä käytetty ZYM B- reagenssiliuos oli päässyt pilaantumaan väärän säilytyksen vuoksi. Uutta liuosta lisättiin normaalista neljästä tunnista poiketen 24 h inkuboinnin jälkeen, jonka johdosta kaikille 46 kannalle saadut tulokset olivat hyväksyttäviä. Testillä saatiin 42 kannalle tulkinnaiksi *E. faecium*. Kolme muuta saatua lajia olivat *E. avium*, *E. durans* ja *E. gallinarum*, yksi tapaus kutakin. Kontrollikannoista testi kykeni erottamaan *E. faeciumin* ja *E. faecaliksen*, mutta ei kyennyt tunnistamaan *E. gallinarum* kontrollikantaa.

7.2 Muilla tunnistusmenetelmillä saadut tulokset

RapID STR- testillä tutkittiin 46 kantaa, joista kolme olivat tunnettuja kontrollikantoja. Kolmelle kannalle testi ei antanut tulkintaa, jolloin hyväksyttävien tulosten lukumääräksi saatiin 43. Tunnetut *E. faecium*- ja *E. faecalis*- kontrollikannat (UKNEQAS 7218, ATCC 29212) testi tulkitsi oikein, mutta *E. gallinarum* kontrollikannalle (WHO 27) ei saatu lainkaan tulkintaa. Testi antoi 28/43 kannalle lajiksi *E. faecium*. Testi pystyi varsin heikosti tunnistamaan *E. faeciumin*; ”varmoista” (taulukko 8) *E. faecium* -kannoista vain vajaa 2/3 (23/36) tunnistettiin oikein sen avulla. Muita lajinimiä olivat *E. casseliflavus/mundtii* (7), *E. gallinarum* (3), *E. durans/hirae* (3) sekä *E. faecalis* (1). Testi antoi yleensä (42/43) yhden lajinimivaihtoehdon, jonka id-% vaihteli välillä 99.69 – 100. Yhdessä tapauksessa lajinimivaihtoehdot oli kaksi. Toinen lajinimivaihtoehdot tässä tapauksessa oli *E. avium* id-%:lla <0,1.

Rapid ID 32 STREP- testillä tutkittiin 41 kantaa, koska testissä käytetty FB- reagenssiliuos loppui kesken eikä testausta voitu jatkaa. Näistä 41:stä testistä yksi epäonnistui väärän reagenssin lisäyksen vuoksi, jolloin kokonaismääräksi saatiin 40 hyväksyttävää tulkintaa. Kontrollikannoista *E. faecalis* (ATCC 29212) ja *E. gallinarum* (WHO 27) testi tunnisti oikein, mutta *E. faecium* (UKNEQAS 7218) kontrollia testi ei kyennyt tunnistamaan oikein. Saaduista lajinimistä 19 oli *E. faecium*, joista seitsemän id % oli yli 96 ja neljässä tapauksessa id-% jäi alle 96. Lopuissa kahdeksassa tapauksessa ei id-% saatu lainkaan. *E. gallinarum* – lajin testi tulkitsi 15 kannalle, joista seitsemällä id-% oli yli 96 ja kahdeksalla id-% jäi alle 96. Muita lajinimiä olivat *E. avium* (1) sekä *E. durans* (1). Osalle kannoista testi ei antanut lainkaan id –prosenttia.

Sekä *E. faecium*- että *E. gallinarum* -kontrollikantojen tulokseksi testi ehdotti *E. gallinarum*. ”Varmoista” (taulukko 8) *E. faecium* –kannoista vain puolet (15/31) tunnistettiin oikein ja lähes kaikki loput (15/31) väärin *E. gallinarum*- lajiksi. Testillä tunnistetuista *E. faecium* – lajista 8/19 kohdalla jäi id-% saamatta. Niiden *E. faecium* –lajien kohdalla, joille id-% saatiin, vaihteli se välillä 63.7 - 99.9. Kahden *E. gallinarum* tunnistuksen kohdalla testi ei antanut id-%:a. Loppujen *E. gallinarum* –tulkintojen id-% oli välillä 74.7 – 99.9. Id-% -rajan 96 käyttökään ei parantaisi kuin hiukan testin spesifisyyttä. Tällöin 11/15 *E. faecium* –lajia tunnistuisi oikein mutta 6/15 vääristä *E. gallinarum* –tulkinnoista muuttuisi ”varmoiksi” *E. gallinarum* –kannoiksi. Testin herkkyyks puolestaan heikkenisi, koska 17 kantaa jäisi ilman

nimeä. Viiden kannan kohdalla ei tunnistukseen päästy reagenssin loppumisen tai testin epäonnistumisen vuoksi ja yhden ”varman” *E. faecium*:n testi tulkitsi lajinimellä *E. casseliflavus*. Taulukosta viisi nähdään mitä eri lajinimiä bakteerikannoille saatiin tulkinnoiksi neljän tunnin inkuboinnin jälkeen sekä millä välillä niiden id%:t vaihtelivat.

Taulukko 5. Saadut lajinimet Rapid ID 32 STREP- testillä

Lajinimi	4 h, kpl	Id-% vaihteluväli	KA id-%:sta	Ei id%
<i>E. gallinarum</i>	15	60,7 - 99,9	91,3	2
<i>E. faecium</i>	11	63,7 - 99,9	92,6	8
<i>E. durans</i>	1	99,5	99,5	
<i>E. avium</i>	1	99,9	99,9	
<i>E. faecalis</i>	1	99,9	99,9	
<i>E. casseliflavus</i>	1	54,4	54,4	
Ei tulosta	6			

Diatabs -testisarjalla saatiin 46 hyväksyttävää tulosta. Testi antoi *E. faecium* kontrollikannalle tuloksiksi pigmentti (Pigm) 0, furazolidoni (Furaz) R, mupirosiini (Mupir) S ja liikkuvuus (Mot) 0. *E. faecalis* kontrollikannalle tuloksiksi tuli Pigm 0, Furaz S, Mupir R ja Mot 0. *E. gallinarum* kontrollin tulokset olivat Pigm 0, Furaz S, Mupir S ja Mot +. Edellä mainitut tulokset tukevat kontrollikantojen lajeja (kts. liite 10 ja taulukko 6) eli testisarjalla pystytään tunnistamaan *E. faecium*-, *E. faecalis*- ja *E. gallinarum* lajit. Yksi kanta oli Diatabs- tulosten perusteella jokin muu laji kuin *E. faecium*, *E. faecalis* tai *E. gallinarum*. Api 20 Strep ja Rapid ID 32 STREP tulosten perusteella se oli lajinimeltään *E. avium* (liite 10).

Taulukko 6. Diatabs -tulosten tulkinta taulukko

	FURAZ	MUPIR	MOT	PIGM	XYL	α-GAL
<i>E. faecalis</i>	S	R	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	R	S	0	0	0	V
<i>E. gallinarum</i>	S	S	+	0	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	S	S	+	+	V	+
<i>E. durans</i>	S	S	0	0	0	0

S= Herkkä

+= Positiivinen

R= Resistentti

0= Negatiivinen

V= Vaihteleva tulos

7.3 Eri testeillä saatujen tulosten vertailu

Taulukkoon 7 (liite 10) on koottu kaikilla testeillä saadut lajinimet. Taulukosta nähdään Api 20 Strep- testillä 24 tunnin inkuboinnin jälkeen todennäköisin laji sekä sen saama id-%. RapID STR- sekä Rapid ID 32 STREP- testeistä taulukossa on todennäköisin bakteerilaji ja Rapid ID 32 STREP- testin kohdalla on näkyvissä lisäksi kunkin lajin saama id-%. Diatabs- testin tuloksista taulukossa nähdään pesäkkeen värin muodostus (Pigm), antibioottilääkeherkkyydet (Furaz , Mupir) ja bakteerin liikkuvuus elatusaineessa (Mot). Lisäksi taulukosta nähdään bakteerien lajinimet, jotka on saatu kaikilla testeillä saaduista tulkinnoista. Kommentit sarakkeessa on maininta jos testin kohdalla ilmeni jotain poikkeavaa. Taulukosta jätettiin pois Diatabs –testikokonaisuuden XYL- ja α -Gal –kiekkotulokset, koska niillä ei ollut niin suurta diagnostista merkitystä bakteerilajien nimeämisessä.

Taulukosta 8 on nähtävissä Api 20 Strep- testillä saatujen *E. faecium* löydösten lukumäärä luokiteltuina id-%-ryhmiin: >98, 96- 98, 94- 96 ja <94. Taulukossa on myös vastaavat Diatabsin Furaz-, Mupir- ja liikkuvuustesteillä saatujen *E. faeciumien* lukumäärät. Taulukosta nähdään, että id-%n ollessa 96 tai sitä suurempi, ovat Api 20 Strep:llä ja Diatabs'eilla saadut lajinimet yhtenevät. Tällä perusteella nämä kannat luokiteltiin ”varmoiksi” *E. faecium* – kannoiksi. Api 20 Strep -testin id %:n jäädessä alle 96, esiintyy näiden kahden testikokonaisuuden tulkinnoissa eroavaisuuksia.

Taulukko 8. Api 20 Strep vs Furaz Mupir ja mot

Id %	kpl	Api:lla saadut Efm:t	Furaz, Mupir ja mot saadut Efm:t	"Varmat" Efm:t
> 98	25	25	25	25
96-98	11	11	11	11
94-96	3	3	2	
< 94	6	3	5	
				Yht. 36

Efm= *E. Faecium*

8 POHDINTA

Työskentely K-S:n keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa tapahtui iltapäivisin kliinisen kemian laboratoriossa tapahtuvien työharjoittelupäivien jälkeen ja myöhemmin varsinaisten työpäivien jälkeen. Siirtyminen laboratorion toiseen tapahtui kätevästi, sillä keskussairaalan kliinisen kemian laboratorio sijaitsee lähellä mikrobiologian laboratorion. Laboratoriossa oli paikalla mikrobiologian laboratorion henkilökuntaa arkisin klo 16 saakka. Sairaalamikrobiologi Antti Nissinen oli paikalla vaihtelevammin, mutta puhelimella aina tavoitettavissa. Apua työn tekemiseen oli saatavilla melko hyvin, mutta oli myös paljon iltoja jolloin teimme parin kanssa työtä kahden. Se kehitti ongelmanratkaisutaitojamme, päätöksentekokykyämme, yhteistyötaitojamme sekä kärsivällisyyttä parin kanssa.

Tähän työhön käytettyjen bakteeriviljelmien laatuun emme voineet vaikuttaa, sillä kannat oli ottanut talteen jo aiemmin K-S:n keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorion henkilökunta. Käytännön suorituksen aikana työssä pyrimme mahdollisimman huolelliseen ja tarkkaan työskentelyyn, niin näytteiden kuin testienkin kanssa parhaan mahdollisen laadun takaamiseksi. Saatujen testitulosten oikeellisuuden sekä käytettyjen testien toimivuuden varmistamiseksi käytimme työssä kolmea tunnettua kontrollikantaa. Näin lisättiin tutkimuksen luotettavuutta sekä laatua.

Osassa bakteerisuspensioista tehdyissä perämaljoissa kasvoi kontaminantteja. Tämä tarkoitti sitä, että bakteerisuspensiossa oli ollut mukana jokin muukin kuin tutkittu bakteeri. Kontaminanttibakteeri on voinut vääristää testikaivoissa tapahtuvia reaktioita ja siten aiheuttaa vääriä tuloksia. Mikäli perämaljalla havaittiin kontaminantteja, arvioitiin niiden lukumäärää sekä mahdollista vaikutusta testituloksiin. Jos tulos tuli hyvällä id %-lla, voitiin se hyväksyä. Jos perämalja olisi ollut pahoin kontaminoitunut, testitulos olisi tässä tapauksessa hylätty. Työssä ei kuitenkaan näin tapahtunut. Testit perustuvat lisäksi niin vahvaan ympyyn, että muutaman kontaminanttibakteerin vaikutus jää näkemättä. Kontaminoituneiden perämaljojen määrä oli viisi 46:sta tutkitusta kannasta.

Osassa virtsakantaputkissa kasvanut limainen kontaminanttibakteeri vaikeutti tutkittavan kannan ulosviljelyä. Lima kasvoi elatusaineputken pinnalla, jolloin viljelysauva kosketti sitä väistämättä ja aiheutti puhtasviljelmän kontaminoitumisen. Asiasta keskusteltiin sairaalamikrobiologi Antti Nissisen kanssa ja päätimme yhdessä, ettei pahiten kontaminoituneita putkia käytetä työssä lainkaan. Kontaminoituneista puhtasviljelmistä jouduimme tekemään uudet puhtasviljelmät seuraavaksi päiväksi. Tämä lisäsi hieman materiaalikustannuksia sekä hidasti luonnollisesti tutkimuksen etenemistä.

Taulukkoon 8 (s.24) kokosimme Api 20 Strep ja Diatabsin Furaz-, Mupir- ja liikkuvuustesteillä saatujen *E. faeciumien* lukumäärät jaettuina id %-ryhmiin. Siitä voidaan päätellä, mitä matalamman id %:n Api 20 Strep-testi antoi, sitä enemmän ilmeni ristiriitaisuuksia testien välisissä tuloksissa. Ensimmäiset ristiriitaisuudet ilmenevät id %-välillä 94-96 ja siitä alaspäin. Tulosten perusteella Api 20 Strep ja Diatabs -testikokonaisuus vaikuttivat käyttökelpoisimmilta testeiltä. Niiden tulkinnat olivat identtiset tapauksissa, joissa Api 20 Strep -testin id-% oli vähintään 96. Tähän vertailuun perustuen ”varmoiksi” *E. faecium* -tulkinnoiksi luokiteltiin ne tapaukset, joissa Api 20 Strep -id% oli vähintään 96 (36 kantaa).

Testeistä RapID STR oli mielestämme lukijaystävällisin ja helppokäyttöisin. Testissä tehtiin ainoastaan yksi bakteerisuspensio, joka pipetoitiin kerralla testikasettiin ja josta se testikasettia kallistelemalla jaettiin kaikkiin reaktiokuoppiin. Myös lyhyen, neljän tunnin inkubointiajan koimme testissä hyväksi. Inkuboinnin jälkeen testistä luettiin ensin kaikkien reaktiokaivojen antamat värireaktiot, jotka olivat selkeästi luettavissa. Luvun jälkeen neljään viimeiseen testikaivoon lisättiin samaa reagenssia. Tämän koimme hyväksi, koska sekaantumisen vaaraa eri reagenssien välillä ei voinut tulla. Reagenssiluon oli valoa läpäisemättömässä tippapullossa, joten sitä ei tarvinnut erikseen suojata foliolla, kuten esimerkiksi Api 20 Strep -testin ZYM B-reagenssi. Reagenssin lisäyksen jälkeen tulokset olivat luettavissa 30 sekunnin kuluttua. Lyhyt odotusaika lisäsi testin käyttömukavuutta, eikä rutiinityöskentelyssäkään näin lyhyessä ajassa synny houkutus tulosten ennenaikaiseen lukemiseen. Tulokset merkattiin selkeälle ja helposti ymmärrettävälle tulosliuskalle, josta tulokseksi tuleva numerosarja oli vaivattomasti laskettavissa. Myös ERICTM Electronic RapID Compendium -tietokoneohjelma oli melko helppokäyttöinen. Ohjelman antama lajitunnistus ja vaihtoehdot sarakkeessa oleva ensimmäinen lajivaihtoehto poikkesivat hyvin usein toisistaan. Poikkeamia lajitunnistuksessa oli 21/43. Esimerkiksi kannan no: 6028 lajitulkinta

oli *E. faecium*, mutta vaihtoehtosarakkeessa ensimmäisenä tulkintana oli *E. casseliflavus/mundtii* id%:lla 99,99.

Koimme Rapid ID 32 STREP –testin työläimmäksi sekä tehdä että lukea. Testi koostui 32:sta todella pienestä testikaivosta, joihin oli hankala annostella bakteerisuspensiota ja reagensseja. Tulosten luku visuaalisesti oli työlästä, koska testikaivorivejä oli kaksi ja ne tuli lukea mielestämme epäloogisessa järjestyksessä. Testikaivojen pienuuden vuoksi värejä oli hankala tulkita visuaalisesti. Hyväksi koimme testin neljän tunnin inkubointiajan. Testillä pystytään tunnistamaan luotettavasti ainoastaan *E. faecalis*.

Api 20 Strep- testi oli helppokäyttöinen, mutta monivaiheisen suoritustapansa vuoksi melko paljon aikaa vievä testi. Testikaivot olivat suurikokoisia ja näin ollen helppo täyttää, lukuun ottamatta muutamaa kaivoa, joihin tahtoi jäädä pohjalle helposti ilmaa. Ilmaa meinasi jäädä sellaisten kaivojen pohjalle, joissa olisi pitänyt olla anaerobiset olot. Ilman sai kuitenkin poistettua testikuoppaa varovasti sormella painelemalla. Jos ilma olisi jäänyt kuoppaan, ei reaktiotulokseen olisi voitu luottaa. Neljän tunnin inkuboinnin jälkeen ei saatu tuloksia kovin korkeilla id %:lla. Tulokset vahvistuivat vasta 24 h luvun jälkeen, kuten testin valmistajakin ilmoittaa (BioMérieux Api 20 Strep -käyttöohje, 2004). Tämän perusteella neljän tunnin jälkeiset tulokset ovat ainoastaan suuntaa antavia, eikä niihin pitäisi täysin luottaa. Testin tulokset (seitsennumeroinen koodi) tulkittiin sekä Analytical Profile Index –kirjan sekä Apiweb –tietokoneohjelman avulla. Kirjan ja web:n lajitulkinnoissa oli välillä suuriakin eroavaisuuksia, mutta pääosin ne vastasivat toisiaan. Joillekin kannoille kirja ja web antoivat jopa eri lajinimen. Joissakin tapauksissa kirja ei antanut neljän tunnin tulosta ollenkaan, mutta web- ohjelma sen kuitenkin antoi. Tietokoneohjelma oli uudempi (2003) kuin kirjan versio (1992), jolloin sen antamiin tuloksiin voitiin paremmin luottaa. Tulokseksi tullut numerosarja saatiin värien visuaalisen tulkinnan perusteella, joka ei kaikissa tapauksissa ollut selvä. Epäselvissä tapauksissa katsottiin tulos todennäköisimmän värireaktion antaman numerosarjan perusteella. Tämän vuoksi numerosarjavaihtoehtoja tuli useita. Käytetyistä kontrollikannoista testi kykeni erottamaan hyvin *E. faeciumin* ja *E. faecalisen*. *E. gallinarumin* testi tulkitsi *E. faecium* –lajiksi, joskin tässä tapauksessa id-% jäi alle 96.

Diatabs -testikokonaisuuteen kuului kuusi erilaista testiä. Tämän vuoksi testin suorittaminen oli mielestämme melko hajanaista. Testikokonaisuudessa tehtiin kolme eri bakteerisuspensiota, joka lisäsi kontaminaatiovaaraa. Liikkuvuusputkeen bakteeripesäkkeet poimittiin puhdasviljelmältä, joten se ei vaatinut erillisiä työvaiheita. Samalla pystyttiin myös tarkastelemaan pesäkkeen väriä. Kokonaisuudessaan eri testit oli helppo ja nopea suorittaa. Inkubointiajat vaihtelivat neljästä tunnista aina vuorokauteen. Ohjeen mukaan XYL- ja α -Gal -testeille neljän tunnin inkubointi olisi riittänyt, mutta Antti Nissisen ehdotuksesta tarkistimme tulokset vielä 24h inkuboinnin jälkeen. Tulokset eivät juurikaan muuttuneet lisäinkuboinnin jälkeen. Näiden testien tulokset jätimme pois taulukosta 7, koska niiden tulosten perusteella ei pystytä erottamaan bakteerilajeja. Esimerkiksi *E. faecalis* ja *E. faecium* erottaminen toisistaan on mahdotonta, koska lajit reagoivat lähes samalla tavalla tässä testissä (taulukko 6). Furaz-, Mupir- ja liikkuvuustestien sekä pigmentin muodostuksen avulla pystyttiin erottamaan *E. faecium* ja *E. faecalis* toisistaan hyvin. *E. gallinarum* -kontrollikanta käyttäytyi myös odotusten mukaisesti. Tuloksista pystytään näkemään jos tutkittava enterokokki on jokin muu kuin *E. faecium*, *E. faecalis* tai *E. gallinarum*, mutta bakteeria ei pystytä tarkemmin nimeämään.

Api 20 Strep-, Rapid ID 32 STREP-, RapID STR- sekä Diatabs-testikokonaisuudesta XYL ja α -Gal -testien luku tapahtui visuaalisesti eli näköaistin avulla. Testitulosten tulkinta suoritettiin parin kanssa puoliksi. Koska jokainen meistä näkee värien eri vivahteet yksilöllisesti, saattoi se myös vaikuttaa tulosten tulkintaan. Värinäön merkitys korostui työtä tehdessä. Esimerkiksi oranssin ja punaisen värin näkemisessä oli jonkin verran eroja parin kanssa. Hankalissa tapauksissa väriä pohdittiin yhdessä.

Johtopäätökseksi opinnäytetyömme tutkimuksella saatiin, että Api 20 Strep -testi sekä Diatabs -testikokonaisuudesta tietyt osiot tarjoavat kätevän ja objektiivisen tavan tunnistaa *E. faecium*, *E. faecalis* ja jokin muu nimeämätön enterokokkilaji. Api 20 Strep -testi on käyttökelpoinen 24 h inkuboinnin jälkeen ja silloin kun id-% on yli 96. Diatabs -testikokonaisuudesta käyttökelpoisimmat osiot ovat pigmentin huomioiminen, furatsolidoni- ja mupirosiiniherkkyysmääritys sekä liikkuvuustesti.

Diatabs –testikokonaisuudella pystytään tunnistamaan varmasti *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* ja todennäköisesti *E. casseliflavus*. Työssämme *E. gallinarum* -lajin tunnistus perustui vain yhdellä kannalla saatuihin tuloksiin, eikä *E. casseliflavus* –lajista ollut käytettävissä kontrollikantaa. Tämän perusteella näiden lajien tunnistus Diatabs –testikokonaisuudella olisi hyvä varmistaa jatkotutkimuksella.

Haluamme kiittää Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorion henkilökuntaa saamastamme avusta opinnäytetyömme teossa. Erityiskiitos sairaalamikrobiologi Antti Nissiselle hyvästä yhteistyöstä ja suuresta työpanoksesta työmme onnistumiseksi.

LÄHTEET

Anttila, V-P. & Suppola, J. 2003. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisia kokkeja. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A., Valtonen, V., toim. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Duodecim. Jyväskylä: Kirjapaino Oy, 127–131.

BioMérieux. 2004. Api 20 Strep –käyttöohje. Ranska.

BioMérieux. 2004. Rapid ID 32 STREP –käyttöohje. Ranska.

Freney, J., Bland, J., Etienne, M., Desmonceaux, J., Boeufgras, J. M. & Fleurette, J. 1992. Description and Evaluation of the Semiautomated 4-Hour Rapid ID 32 Strep Method for Identification of Streptococci and Members of Related Genera. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (10) 2657-2660.

Hellstén, S. (toim.) 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Suomen Kuntaliitto. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Hirsijärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2000. Tutki ja kirjoita. 6. painos. Vantaa: Tummavuoren kirjapaino Oy.

Huovinen, P. & Kotilainen, P. 1998. Enterokokit. Teoksessa Eskola, J., Huovinen, P. & Valtonen, V., toim. Infektiosairaudet. Duodecim. Jyväskylä: Kirjapaino Oy, 114-119.

Katila, M-L. 2004. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian ja parasitologian tutkimuksissa. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WSOY. 346- 358.

Kelander, M. 2003. Kliininen mikrobiologia, laboraatiot. Syksy 2003. Luentomateriaali. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. Jyväskylä.

Koivula, U-M., Suihko, K., Tyrväinen, J. 2003. Mission: Possible. Opas opinnäytteen tekijälle. Pirkanmaan ammattikorkeakoulun julkaisusarja C. Oppimateriaalit. Nro 1. 2.uudistetun painoksen lisäpainos. Tampere.

Kouri, T., Anttinen, J., Icen, A., Ikäheimo, R., Irjala, K., Kontiainen, S., Koskimies, O., Lipponen, P., Penttilä, I., Siitonen, A. & Siukola, A. (toim.) 1999. Suositus virtsan perustutkimuksia ja bakteeriviljelyä varten. Moodi, erillisjulkaisu 7, 44 - 49.

Murray P., Baron E., Pfaller M., Tenover F. & Tenover H. 1999. Manual of clinical microbiology. 7th edition. Washington D.C: ASM Press.

A. Nissinen, A. 1997. Keski- Suomen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio, bakteriologia. Työnkulkukaavio. Aerobibakteerien tunnistaminen.

B. Nissinen, A. 1997. Keski- Suomen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio, bakteriologia. Työnkulkukaavio. Stafylokokkien ja enterokokkien tunnistaminen.

C. Nissinen, A. 1997. Keski- Suomen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio, bakteriologia. Työohje. Gramvärjäys.

D. Nissinen, A. 1997. Keski- Suomen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio, bakteriologia. Työohje. Arabinoositesti.

Nissinen, A. 2005. Keski- Suomen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio, bakteriologia. Työohje. Bakteerilääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä.

Nissinen, A. Sairalamikrobiologi, FT. Keskustelu 10.4.2006. Keski-Suomen keskussairaala, kliinisen mikrobiologian laboratorio. Jyväskylä.

Pietikäinen, J. 1998. Keski- Suomen keskussairaala. Mikrobiologian laboratorio, bakteriologia. Työohje. Sappieskuliinitesti.

Public Health Agency of Canada. 1998. Guidelines for the Testing and Reporting of Antimicrobial Susceptibilities of Vancomycin Resistant Enterococci. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa): URL: http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/vre98_e.html. Luettu 8.2.2006.

Remel. 2004. RapID STR System –käyttöohje. USA.

Rosco Diagnostica. 2005. Diatabs diagnostic tablets for bacterial identification. User's Guide. 6th edition. Denmark.

University of Maryland. 2000. Enterococcus summary. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa): URL:<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Enterococcus.htm>. Luettu 8.2.2006.

University of Oklahoma Disclaimers. 2006. Standard Laboratory Methods for Identifying and Growing Enterococci. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa): URL: http://www.enterococcus.ouhsc.edu/lab_methods.asp. Luettu 8.2.2006.

Vaara, M., Skurnik, M., Sarvas, M. 2003. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A., Valtonen, V., toim. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Duodecim. Jyväskylä: Kirjapaino Oy. 51 - 75.

LIITTEET

- Liite 1 Api 20 Strep käyttöohjeen lukutaulukko
- Liite 2 Api 20 Strep -testin mukana tullut tulosliuska
- Liite 3 Api 20 Strep tulkintatuloste Apiweb:stä
- Liite 4 Rapid ID 32 STREP käyttöohjeen lukutaulukko
- Liite 5 Rapid ID 32 STREP -testin mukana tullut tulosliuska
- Liite 6 Rapid ID 32 STREP tulkintatuloste Apiweb:stä
- Liite 7 RapID STR käyttöohjeen reaktiotulkintataulukko
- Liite 8 RapID STR tulkintatuloste ERIC-tietokoneohjelmasta
- Liite 9 Api 20 Strep-testillä saadut tulokset
- Liite 10 Kaikilla testeillä saadut tulokset

LIITE 1

api® 20 Strep

07625F - GB - 2004/08

READING TABLE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS			
				NEGATIVE		POSITIVE	
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / wait 10 min (3)			
				Colorless		Pink-Red	
HIP	hippuric acid	0.4	hydrolysis (HIPpuric acid)	NIN / wait 10 min			
				Colorless/Pale blue		Dark blue/Violet	
				4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
ESC	esculin ferric citrate	1.16 0.152	β -glucosidase hydrolysis (ESCullin)	Colorless Pale yellow	Colorless Pale yellow Light grey	Black Grey	Black
PYRA	pyroglutamic acid- β -naphthylamide	0.0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA to LAP) (1) if necessary, decolorize with intense light			
				Colorless or very pale orange		Orange	
α GAL	6-bromo-2-naphthyl- α D-galactopyranoside	0.0376	α -GALactosidase	Colorless		Violet	
β GUR	naphthol ASBI- glucuronic acid	0.0537	β -GIUcuRonidase	Colorless		Blue	
β GAL	2-naphthyl- β D-galactopyranoside	0.0306	β -GALactosidase	Colorless or Very pale violet		Violet	
PAL	2-naphthyl phosphate	0.0244	ALkaline Phosphatase	Colorless or Very pale violet		Violet	
LAP	L-leucine- β -naphthylamide	0.0256	Leucine AminoPeptidase	Colorless		Orange	
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Yellow			
				4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
RIB	D-ribose	1.4	acidification (RIBose)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
ARA	L-arabinose	1.4	acidification (ARAbinose)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
MAN	D-mannitol	1.36	acidification (MANnitol)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
SOR	D-sorbitol	1.36	acidification (SORbitol)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
LAC	D-lactose (bovine origin)	1.4	acidification (LACTose)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
TRE	D-trehalose	1.32	acidification (TREhalose)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
INU	inulin	5.12	acidification (INUlin)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
RAF	D-raffinose	3.12	acidification (RAFFinose)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
AMD	starch (2)	2.56	acidification (AmiDon)	Red	Orange/ Red	Orange/ Yellow	Yellow
GLYG	glycogen	1.28	acidification (GLYcoGen)	Red or Orange		Bright yellow	


(1) During a second reading after 24 hours of incubation, a deposit may be noticed in the tubes where the ZYM A and ZYM B reagents have been added. This phenomenon is normal and should not be taken into consideration.

(2) The acidification of starch is frequently weaker than that of other sugars.

(3) A pale pink color obtained after 10 minutes should be considered negative.

- The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.
- Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.


LIITE 2



CE 07226

REF : _____ / _____ / _____ / _____

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



	4 h	24 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
			VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	βHEM						
	4 h	24 h	○			○			○			○			○			○			○			○			○		
	4 h	24 h	○			○			○			○			○			○			○			○			○		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

LIITE 3

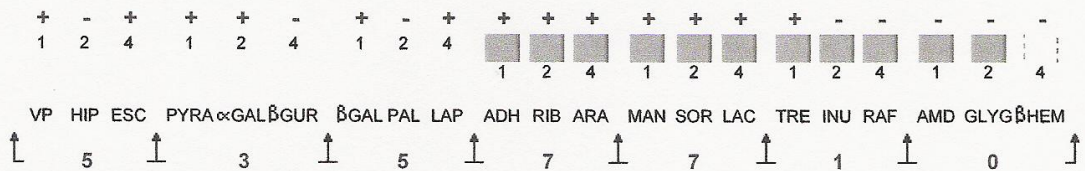
apiweb - Identification result

Sivu 1/1

Central Hospital of Central Finland - Jyväskylä



API 20 STREP V6.0



REFERENCE 272VV DATE 27.5.05

COMMENT
24 h inkuboinnin jälkeen
Perämalja ok

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip API 20 STREP V6.0
Profile 5 3 5 7 7 1 0
Note POSSIBILITY OF *Enterococcus casseliflavus*

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Enterococcus faecium</i>	99.8	0.8	SOR 18%
Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Enterococcus avium</i>	0.1	0.24	αGAL 15% βGAL 24% ADH 0%
Complementary test(s)	YELLOW	45°C	GLYCEROLac
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	+

Close

Print

LIITE 4

rapid ID 32 STREP

07024G - GB - 2004/09

READING TABLE

CUPULE	TEST	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULT	
					NEGATIVE	POSITIVE
1.0	ADH	L-arginine	0.76	Arginine DiHydrolase	yellow	red orange-red
1.1	βGLU	resorufin-βD-glucopyranoside	0.0032	β GLUCosidase	pale orange	fluorescent pink red-orange
1.2	βGAR	resorufin-βD-galactopyranoside	0.0032	β GALactosidase	orange	fluorescent pink red-orange
1.3	βGUR	resorufin-βD-glucuronide	0.0032	β GLUCURonidase		
1.4	αGAL	4-nitrophenyl-αD-galactopyranoside	0.096	α GALactosidase	colorless	yellow
1.5	PAL	4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside-2-CHA	0.084	Alkaline Phosphatase	colorless very pale yellow	yellow
1.6	RIB	D-ribose	0.55	RIBose (Acidification)	red red-orange	yellow orange
1.7	MAN	D-mannitol	0.55	MANnitol (Acidification)		
1.8	SOR	D-sorbitol	0.55	SORbitol (Acidification)		
1.9	LAC	D-lactose (bovine origin)	0.55	LACTose (Acidification)		
1.A	TRE	D-trehalose	0.55	TREhalose (Acidification)		
1.B	RAF	D-raffinose	0.55	RAFFinose (Acidification)		
1.C	SAC	D-saccharose (sucrose)	0.55	SACcharose (Acidification)		
1.D	LARA	L-arabinose	0.55	L-ARAbinose (Acidification)		
1.E	DARL	D-arabitol	0.55	D-ARAbitol (Acidification)		
1.F	CDEX	αcyclodextrin	0.275	CycloDEXtrin (Acidification)		
0.0	VP	sodium pyruvate	0.19	Acetoin production (Voges Proskauer)	VP A + VP B / 5 min < 10 min colorless pink	
0.1	APPA	L-alanyl-L-phenylalanyl-L-proline-β-naphthylamide	0.049	Alanyl-Phenylalanyl-Proline Arylamidase	FB / 5 min < 10 min (APPA → GTA) colorless orange pale orange	
0.2	βGAL	2-naphthyl-βD-galactopyranoside	0.038	β GALactosidase	colorless pale orange pale purple	purple
0.3	PyrA	pyroglutamic acid-β-naphthylamide	0.0254	Pyroglutamic acid Arylamidase	colorless pale orange	orange
0.4	βNAG	6-bromo-2-naphthyl-N-acetyl-βD-glucosaminide	0.043	N-Acetyl-β-Glucosaminidase	colorless pale orange	purple
0.5	GTA	L-glycyl-L-tryptophan-β-naphthylamide	0.05	Glycyl-Tryptophan Arylamidase	colorless pale orange	orange
0.6	HIP	sodium hippurate	1.5	Hydrolysis of HIPpurate	NIN / 5 min < 10 min colorless blue	
0.7	GLYG	glycogen	0.55	GLYcoGen (Acidification)	red red-orange	yellow orange
0.8	PUL	pullulan	0.55	PULlulane (Acidification)		
0.9	MAL	D-maltose	0.55	MALtose (Acidification)		
0.A	MEL	D-melibiose	0.55	MELibiose (Acidification)		
0.B	MLZ	D-melezitose	0.55	MeLeZitose (Acidification)		
0.C	MBDG	methyl-βD-glucopyranoside	0.55	Methyl-βD Gluco- pyranoside (Acidification)		
0.D	TAG	D-tagatose	0.55	TAGatose (Acidification)		
0.E	βMAN	4-nitrophenyl-βD-mannopyranoside	0.03	β MANnosidase		
0.F	URE	urea	0.448	UREase	yellow beige-pink	pink red-violet

- The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.
- Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

LIITE 5

apid ID 32 STREP

07924G - XL - 2004/09

FICHE DE RESULTATS / RESULT SHEET / ERGEBNISBLATT / HOJA DE RESULTADOS / SCHEDA PER LA REGISTRAZIONE DEI RISULTATI / FICHA DE RESULTADOS / ΦΥΛΛΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / RAPPORTBLAD / RESULTATARK / KARTA WYNIKÓW

rapid ID 32 STREP

REF 32 600

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie

<table border="1"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>A</td><td>B</td></tr> <tr><td>ADH</td><td>BGLU</td><td>BGAR</td><td>BGUR</td><td>αGAL</td><td>PAL</td><td>RIB</td><td>MAN</td><td>SOR</td><td>LAC</td><td>TRE</td><td>RAF</td></tr> <tr><td>VP</td><td>APPA</td><td>BGAL</td><td>PyTA</td><td>BNAG</td><td>GTA</td><td>HIP</td><td>GLYG</td><td>PUL</td><td>MAL</td><td>MEL</td><td>MLZ</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td></tr> </table>												0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	ADH	BGLU	BGAR	BGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF	VP	APPA	BGAL	PyTA	BNAG	GTA	HIP	GLYG	PUL	MAL	MEL	MLZ	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	<table border="1"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>A</td><td>B</td></tr> <tr><td>ADH</td><td>BGLU</td><td>BGAR</td><td>BGUR</td><td>αGAL</td><td>PAL</td><td>RIB</td><td>MAN</td><td>SOR</td><td>LAC</td><td>TRE</td><td>RAF</td></tr> <tr><td>VP</td><td>APPA</td><td>BGAL</td><td>PyTA</td><td>BNAG</td><td>GTA</td><td>HIP</td><td>GLYG</td><td>PUL</td><td>MAL</td><td>MEL</td><td>MLZ</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td></tr> </table>												0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	ADH	BGLU	BGAR	BGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF	VP	APPA	BGAL	PyTA	BNAG	GTA	HIP	GLYG	PUL	MAL	MEL	MLZ	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	<table border="1"> <tr><td>C</td><td>D</td><td>E</td></tr> <tr><td>SAC</td><td>LARA</td><td>DARL</td></tr> <tr><td>MJDG</td><td>TAG</td><td>BMAN</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>4</td></tr> </table>			C	D	E	SAC	LARA	DARL	MJDG	TAG	BMAN	1	2	4	<table border="1"> <tr><td>C</td><td>D</td><td>E</td></tr> <tr><td>SAC</td><td>LARA</td><td>DARL</td></tr> <tr><td>MJDG</td><td>TAG</td><td>BMAN</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>4</td></tr> </table>			C	D	E	SAC	LARA	DARL	MJDG	TAG	BMAN	1	2	4	<table border="1"> <tr><td>F</td><td>F</td></tr> <tr><td>CDEX</td><td>CDEX</td></tr> <tr><td>URE</td><td>URE</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td></tr> </table>		F	F	CDEX	CDEX	URE	URE	1	2
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B																																																																																																																																																				
ADH	BGLU	BGAR	BGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF																																																																																																																																																				
VP	APPA	BGAL	PyTA	BNAG	GTA	HIP	GLYG	PUL	MAL	MEL	MLZ																																																																																																																																																				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																																																																																																																																				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B																																																																																																																																																				
ADH	BGLU	BGAR	BGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF																																																																																																																																																				
VP	APPA	BGAL	PyTA	BNAG	GTA	HIP	GLYG	PUL	MAL	MEL	MLZ																																																																																																																																																				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																																																																																																																																				
C	D	E																																																																																																																																																													
SAC	LARA	DARL																																																																																																																																																													
MJDG	TAG	BMAN																																																																																																																																																													
1	2	4																																																																																																																																																													
C	D	E																																																																																																																																																													
SAC	LARA	DARL																																																																																																																																																													
MJDG	TAG	BMAN																																																																																																																																																													
1	2	4																																																																																																																																																													
F	F																																																																																																																																																														
CDEX	CDEX																																																																																																																																																														
URE	URE																																																																																																																																																														
1	2																																																																																																																																																														

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση :

bioMérieux® SA
 au capital de 11 879 045 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Étoile / France
 Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tel. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux SA ou de l'une de ses filiales / The logo is a registered and protected trademark of bioMérieux SA or one of its subsidiaries
 Das Logo ist eine eingetragene und geschützte Marke von bioMérieux SA oder einer ihrer Filialen / El logo es una marca registrada y protegida, propiedad exclusiva de bioMérieux SA o de cada una de sus filiales
 Il logo è un marchio depositato e protetto di proprietà esclusiva di bioMérieux SA o di una delle sue filiali / O logotipo é uma marca registrada e protegida, propriedade exclusiva da bioMérieux SA ou de uma das suas filiais
 Το λογότυπο αποτελεί κατοχυρωμένο και κατοχυρωμένο εμπνευστικό σήμα της bioMérieux SA ή μιας εκ των θυγατρικών της / Logotypen är ett registrerat och skyddat varumärke för bioMérieux SA eller ett av dess dotterbolag
 Logoet er et registreret og beskyttet varemærke tilhørende bioMérieux SA eller et af dets datterselskaber / Logo jest znakiem towarowym zastrzeżonym dla bioMérieux SA lub jednego z przedstawicieli



LIITE 6

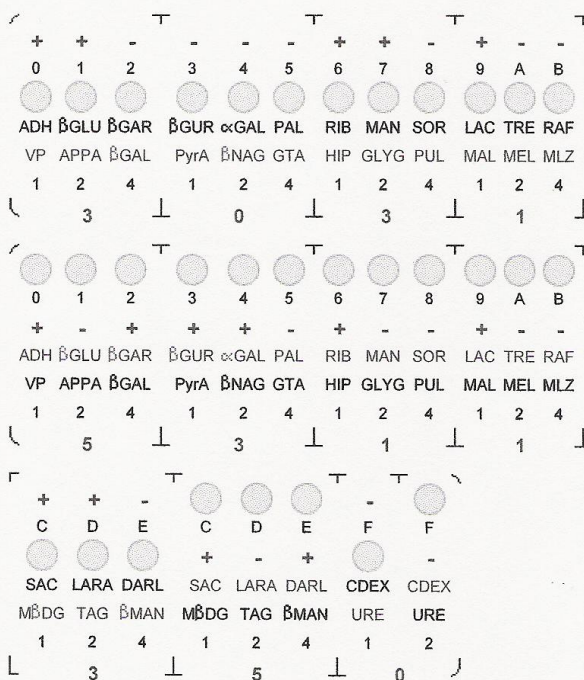
apiweb - Identification result

Sivu 1/1

Central Hospital of Central Finland - Jyvaskyla



rapid ID 32 STREP V2.0



REFERENCE

MA701

DATE

24.5.05

COMMENT

Perämaalja ok

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip rapid ID 32 STREP V2.0
 Profile 3 0 3 1 5 3 1 1 3 5 0
 Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Enterococcus faecium 1	99.6	0.61	TRE 95% βMAN 15% CDEX 90%

Next taxon	% ID	T	Tests against
Enterococcus durans	0.2	0.36	MAN 0% HIP 15% LARA 15%

Close

Print

Table 2. Interpretation of Rapid™ STR System Tests*

Cavity #	Test Code	Reagent	Reaction		Comments
			Positive	Negative	
Before Reagent Addition					
1	ARG	None	Red or dark orange	Yellow or yellow-orange	Only a red or dark orange color should be scored as positive.
2	ESC	None	Black	Clear, tan, or light brown deposit	Any development of a dark black color should be scored as positive.
3	MNL				
4	SBL	None	Yellow or yellow-orange	Red or orange	Any significant yellow or yellow-orange color should be scored as positive.
5	RAF				
6	INU	None	Yellow, yellow-orange, or orange	Red	Any significant change from red should be scored as positive.
7	GAL				
8	GLU	None	Yellow	Clear, tan, or very pale yellow	Only the development of a significant yellow color should be scored as positive. Very pale or questionable colors should be scored as negative.
9	NAG				
10	PO ₄				
After Reagent Addition					
7	TYR	Rapid™ STR Reagent	Light purple or purple	Clear, tan, or yellow	Any shade of purple should be scored as positive.
8	HPR				
9	LYS	Rapid™ STR Reagent	Very dark purple	Clear, tan, or light to medium purple	Only the development of a distinct, very dark purple color should be scored as positive. Very pale or questionable colors should be scored as negative.
10	PYR				

*NOTE: Panels should be read by looking down through the reaction cavities against a white background.

LIITE 8

Remel**ERIC™ Electronic RapID Compendium**

Laboratory: My Laboratory
User: MyLogin

Ref No: 06.0000032
Report Date: 7.3.2006

RapID STR**Identification Report****Microcode: 70502**

+ ARG	- SBL	+ GAL	- PO4	- LYS
+ ESC	- RAF	- GLU	- TYR	+ PYR
+ MNL	- INU	+ NAG	- HPR	- HEM

IDENTIFICATION = E. faecium

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
E. faecium	99,99%	1/33	LYS [90]
Probability Level: Satisfactory		BioFrequency: Acceptable	

Group D Enterococcus. CDC group II. Normal inhabitant of the skin and gastrointestinal tract. May cause a variety of infections. Vancomycin resistant strains have been encountered.

Api 20 Strep

	Web tulos										Perämalja	Kommentit
	4 h	Id %	VI kpl	Ns kpl	24 h	Id %	VI kpl	Ns kpl	Id %	VI kpl		
UKNEQAS72.18	Efm	55,9	3	1	Efm			90	2	1	Ok	
ATCC 29212	E.faecalis	99,3	2	1	E.faecalis			99,7	2	1	Ok	pv kontaminoitunut
WHO27 Gallin.	Efm	98,3	2	2	Efm			94,9	3	2	Ok	
UB 8138	Efm	81,9	4	3	Efm			99,8	2	2	Ok	
US 3908	E.durans	59,9	3	1	Efm			99,8	2	2	Ok	
UB 1678	Efm	65,9	5	1	Efm			99,3	2	2	Ok	
UB 6472	Efm	81,9	4	1	Efm			99,8	2	1	Ok	
UB 2218	Efm	88,2	3	2	Efm			99,8	2	2	Kontam.	
MA 701	Ei tulosta				Efm			80,3	4	1	Ok	
UB 2746	Efm	98,9	2	1	Efm			99,8	2	1	Ok	
UB 4798	Efm	96	2	1	Efm			99,8	2	1	Ok	
UB 4774	Efm	90,3	2	1	Efm			99,3	2	1	Ok	
1526	Efm	65,9	5	1	Efm			99,3	2	1	Ok	
US 1155	Efm	98,9	2	1	Efm			99,2	2	1	Kontam.	
UB 3777	Efm	78,9	4	1	Efm			96,9	2	1	Ok	4h ZYM A+B pilalla, 24 h Ok
MA 521	Leuonostoc spp	41,9	5	1	Efm			96,9	2	1	Ok	4h ZYM A+B pilalla, 24 h Ok
OSMB1345	Efm	65,9	5	1	Efm			96,9	2	1	Ok	4h ZYM A+B pilalla, 24 h Ok
UB 3859	Efm	98,9	2	1	Efm			99,9	2	1	Ok	4h ZYM A+B pilalla, 24 h Ok
MA 246	E.avium	93,7	2	1	E.avium			93,7	2	1	Kontam.	2 erill. pesäketä
UB 7926	Efm	81,9	4	3	Efm			99,8	2	2	Ok	
272 W	Efm	81,9	4	2	Efm			99,8	2	2	Ok	
US 3322	Efm	96,9	2	2	Efm			96,9	2	1	Ok	
UB 7385	Efm	94,1	2	2	Efm			98,9	2	1	Ok	
US	Efm	55,9	3	2	Efm			96,9	2	1	Ok	
2485	E.durans	94,8	3	2	Efm			98,9	2	1	Ok	
1682	Efm	65,9	5	1	E.durans			68,2	4	1	Ok	
6695	Efm	96,8	2	1	Efm			99	2	1	Ok	
6750	Leuonostoc spp	96,8	2	2	Efm			96,8	2	2	Kontam.	1erill. pesäke
6406	Efm	81,9	4	2	Efm			98,9	2	2	Ok	
6459	Efm	94,1	2	2	Efm			94,1	2	3	Ok	
6130	Efm	68,4	3	2	Efm			98,9	2	2	Ok	
6774	Efm	68,4	3	2	Efm			98,9	2	2	Ok	
6225	Efm	81,9	4	1	Efm			96,8	2	2	Ok	
6243	Efm	55,9	3	1	Efm			96,9	2	1	Ok	
6346	Efm	65,9	5	1	Efm			99,3	2	1	Ok	

6145	Leuconostoc spp	65,2	3	2	Efm	99	2	2	Ok
6355	Leuconostoc spp	86,6	4	2	Efm	96,8	2	1	Ok
6073	E.durans	47,5	4	1	Efm	96,9	2	2	Ok
6028	Aeroc. viridans	59,9	4	2	Efm	94,1	2	2	Ok
6086	E.avium	49,6	4	1	Efm	99	2	1	Ok
6004	Efm	65,9	5	1	Efm	99,3	2	1	Kontam.
6083	Efm	96	2	2	E.gallinarum	68,3	3	1	Ok
5752	Efm	82	2	1	Efm	81,1	2	1	Ok
5758	Efm	65,9	5	1	Efm	96,9	2	1	Ok
5736	E.avium	81,2	4	2	Efm	99,6	2	2	Ok
5717	Efm	81,9	4	3	Efm	99	2	2	Ok

Efm= *E. faecium*

VI kpl= Vaihtoehdot lajeista kpl

Ns kpl= numerosarja vaihtoehdot kpl

6 erill. pesäkettä

LIITE 10

Kaikilla testeillä saadut tulokset

Kanta	Api 20 Strep	Id %	Rapid STR	Id %	Rapid ID 32 STREP	Id %	DIATABS				Lajinimi	Kommentti
							Pigm	Furaz	Mupir	Mot		
UKNEQAS 7218	Efm	90.0	Efm		E.gallinarum		0	R	S	0	Efm	
ATCC 29212	E.faecalis	99.7	E.faecalis	99.99	E.faecalis	99.99	0	S	R	0	E.faecalis	
WHO27 Gallin.	Efm	94.9	Ei tulosta		E.gallinarum		0	S	S	+	E.gallinarum	
UB 8138	Efm	99.8	E.casseliflavus/mundtii	99.99	E.gallinarum	99.99	0	R	S	0	Efm	
US 3908	Efm	99.8	E.gallinarum	99.98	E.gallinarum	99.98	0	R	S	0	Efm	
UB 1678	Efm	99.3	E.casseliflavus/mundtii	99.99	E.gallinarum	99.99	0	R	S	0	Efm	
UB 6472	Efm	99.8	Efm	99.99	E.gallinarum	99.99	0	R	S	0	Efm	
UB 2218	Efm	99.8	Efm	99.99	Efm	99.99	0	R	S	0	Efm	PV kont.
MA 701	Efm	80.3	E.gallinarum	99.98	Efm	99.98	0	R	S	0	Efm	
UB 2746	Efm	99.8	E.casseliflavus/mundtii	99.99	Efm	99.99	0	R	S	0	Efm	
UB 4798	Efm	99.8	E.casseliflavus/mundtii	99.99	Efm	99.99	0	R	S	0	Efm	
UB 4774	Efm	99.3	E.gallinarum	99.98	E.gallinarum	99.98	0	R	S	0	Efm	
1526	Efm	99.3	Efm	99.99	Epaonnistui	99.99	0	R	S	0	Efm	
US 1155	Efm	99.2	Efm	100	Efm	100	0	R	S	0	Efm	
UB 3777	Efm	96.9	E.casseliflavus/mundtii	99.99	Efm	99.99	0	R	S	0	Efm	
MA 521	Efm	96.9	Efm	99.99	FB-juos loppui	99.99	0	R	S	0	Efm	
OSMB1345	Efm	96.9	Efm	99.99	E.gallinarum	99.99	0	R	S	0	Efm	
UB 3859	Efm	99.8	E.casseliflavus/mundtii	99.99	Efm	99.99	0	R	S	0	Efm	
MA 246	E.avium	93.7	Ei tulosta		E.avium	99.9	0	S	S	0	E.avium	
UB 7926	Efm	99.8	Efm	99.99	E.gallinarum	92.0	0	R	S	0	Efm	
272 W	Efm	99.8	Ei tulosta		Efm		0	R	S	0	Efm	
US 3322	Efm	96.9	Efm	100	E.gallinarum	88.7	0	R	S	0	Efm	
UB 7385	Efm	98.9	Efm	99.99	E.gallinarum	74.7	0	R	S	0	Efm	
US	Efm	96.9	Efm	99.99	Efm	99.9	0	R	S	0	Efm	
2485	Efm	98.9	Efm	99.99	E.gallinarum	98.0	0	R	S	0	Efm	
1682	E.durans	68.2	E.durans/hirae		E.durans	99.5	0	R	S	0	E.sp	
6695	Efm	99.0	Efm		E.gallinarum		0	R	S	0	Efm	
6750	Efm	96.8	E.durans/hirae		Efm	99.7	0	R	S	0	Efm	
6406	Efm	98.9	Efm		Efm	63.7	0	R	S	0	Efm	
6459	Efm	94.1	Efm		E.gallinarum	60.7	0	R	S	0	Efm	
6130	Efm	98.9	Efm		Efm	99.9	0	R	S	0	Efm	
6774	Efm	98.9	Efm		Efm		0	R	S	0	Efm	
6225	Efm	96.8	Efm		Efm	99.9	0	R	S	0	Efm	
6243	Efm	96.9	Efm		Efm		0	R	S	0	Efm	
6346	Efm	99.3	E.casseliflavus/mundtii	99.99	E.gallinarum	86.5	0	R	S	0	Efm	

