PRO GRADU

JANNI KUJALA

Staphylococcus aureus taudinaiheuttajana ja yhteisviljelmämenetelmän käyttö antimikrobiseulonnassa

Janni Kujala
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmaseuttisen biologian osasto

Toukokuu 2010

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta – Fakultet – Faculty	Osasto – Sektion – Department
Farmasian tiedekunta	Farmaseuttisen biologian osasto

Tekijä – Författare – Author
Janni Kujala

Työn nimi – Arbetets titel – Title
Staphylococcus aureus taudinaiheuttajana ja yhteisviljelmämenetelmän käyttö antimikrobiseulonnassa

Oppiaine – Läroämne – Subject
Farmakognosia

Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages
Kokeellinen pro gradu-tutkielma	toukokuu 2010	89 s + liitteet

Tiivistelmä – Referat – Abstract

Staphylococcus aureus on yleinen kommensaali ja merkittävä opportunistinen patogeeni. Sen aiheuttamien infektioiden kirjo on laaja pinnallisista ihoinfektioista aina vakaviin invasiivisiin infektioihin. *S. aureuksen* taudinaiheuttamiskykyyn vaikuttavat monet tekijät, kuten erilaiset pintaproteiinit sekä sen erittämät toksiinit ja solunulkoiset entsyymit. Sillä on monia keinoja puolustautua isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä, kuten kapselin ja pienipesäkkeisten muunnosten muodostaminen sekä solunsisäinen piileskely. *S. aureuksen* aiheuttamien infektioiden hoitoa vaikeuttaa sen kyky muodostaa resistenssiä lähes kaikille käytössä oleville antimikrobiaineille. Toistaiseksi sitä vastaan ei ole onnistuttu kehittämään toimivaa ja tehokasta rokotetta. Uusien bakteerilääkkeiden kehittäminen on ainoa keino taistella resistenttejä bakteerikantoja vastaan. Tämä on kuitenkin osoittautunut vaikeaksi. Seulontamenetelmien kehittäminen on tärkeää, jotta uusia lääkkeitä saataisiin markkinoille entistä tehokkaammin ja jotta uudet johdokset olisivat entistä tehokkaampia ja turvallisempia.

Kokeellisen työn tarkoituksena oli perustaa patogeenin ja isäntäsolun yhteisviljelmä-menetelmä sekä tutkia primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneiden yhdisteiden antimikrobista aktiivisuutta perustetulla menetelmällä (Kleymann ja Werling 2004). Isäntäsoluna yhteisviljelmässä oli HL (Human Lung)-solulinja ja patogeeninä *S. aureus* (ATCC 25923). Kokeellinen työ aloitettiin bakteerin pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (PMY) määrän ja absorbanssin välisen korrelaation selvittämisellä. PMY-määritysten perusteella saatiin standardisuoran yhtälö, jonka avulla laskettiin bakteerikonsentraatio kasvatusliuoksessa absorbanssin perusteella. Seuraavaksi suoritettiin yhteisviljelmämenetelmän optimointi ja validointi. Optimoinnin apuna käytettiin tilastollisia parametrejä S/B-, S/N-arvoja ja Z´-tekijää. Menetelmässä optimoitiin kuoppalevylle istutettavien solujen määrä, infektoinnissa käytettävä bakteerimäärä ja inkubointiaika. Menetelmä validoitiin tunnettujen antimikrobiaineiden avulla. Tutkittavien yhdisteiden seulonta suoritettiin kaksivaiheisesti. Ensin kaikille tutkittaville yhdisteille tehtiin perusantibakteerimääritys turbidimetrisellä menetelmällä. Primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet jatkotestattiin annosvastemäärityksenä yhteisviljelmämenetelmällä, mutta millään tutkituista yhdisteistä ei havaittu antimikrobista aktiivisuutta *S. aureusta* vastaan. Tämän vuoksi haluttiin testata vielä yhteisviljelmämenetelmässä käytetyn RN-mediumin vaikutus tutkittavien yhdisteiden aktiivisuuteen ja havaittiin, että käytetty medium. heikensi aktiivisuutta merkittävästi. Yhteisviljelmämenetelmällä saadaan paljon informaatiota tutkittavan yhdisteen antimikrobi- ja sytoksisuusominaisuuksista ja se soveltuu hyvin lupaavien yhdisteiden jatkotestaukseen.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords
antimikrobiseulonta, yhteisviljelmä, *S. aureus*, nisäkässolu, infektointi

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited
Farmaseuttisen biologian osasto

Muita tietoja Övriga uppgifter Additional information
Ohjaaja Päivi Tammela

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta – Fakultet – Faculty	Osasto – Sektion – Department
Faculty of Pharmacy	Division of Pharmaceutical biology

Tekijä – Författare – Author
Janni Kujala

Työn nimi – Arbetets titel – Title
Staphylococcus aureus as a pathogen and antimicrobial screening with a co-culture of host cells and a pathogen

Oppiaine – Läroämne – Subject
Pharmacognosy

Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages
Experimental Master Thesis	May 2010	89 p + appendixes

Tiivistelmä – Referat – Abstract

Staphylococcus aureus is a common commensal and significant opportunistic pathogen. It causes a wide range of infections from superficial skin infections to serious invasive infections. Its pathogenicity is affected by many factors, such as different surface proteins as well as the excretion of toxins and extracellular enzymes. It has many ways to defend a host defense system, such as the formation of capsule and small-colony variants as well as intracellular hiding. Treatment of infections is hindered due to its ability to form resistance to almost every antimicrobial agent used. So far the development of a working and effective vaccine has not been successful. The discovery of new antibacterial agents seems to be still the only efficient way to fight against resistant bacterial strains. However, the development of new antibacterial agents has proved to be difficult. Developing new screening methods is important in order for new drugs to reach the market more effectively and to ensure that new derivatives are more effective and safer.

The experimental part of this study aimed at establishing a co-culture of host cells and a pathogen, and to investigate active compounds from primary screen with the established method (Kleymann and Werling 2004). Host cells in the co-culture was HL (Human Lung) cell line and the pathogen was *S. aureus* (ATCC 25923). Experimental work began by determining bacterial colony-forming units (CFU) and its correlation with absorbance. Based on CFU-determinations the bacterial concentration in the culture media was calculated. Next, the method was optimized and validated. In optimization, statistical parameters S/B-, S/N-values, and Z'-factor were used. Method was optimized regarding cell and bacterial concentrations and incubation time. The method was validated using known antimicrobials. Screening of compounds to be studied was carried out in two stages. All the compounds were first screened in a primary screen. The primary screening method was a standard antibacterial measurement based on turbidometry. Those compounds that were active in the primary screen were investigated in a secondary screen with a co-culture method, but none of the studied compounds showed antimicrobial activity against *S. aureus*. Therefore we studied the impact of medium that was used in the co-culture method to the activity of the compounds. It was found that the medium had a significant effect on the antibacterial activity of the compounds, the activity was weakened in the presence of the medium. In conclusion, w the established co-culture method is a powerful way to obtain simultaneously information on antibacterial activity as well as cytotoxicity, and it is well suited for further testing of promising compounds.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords
antimicrobial screening, co-culture, *S. aureus*, mammalian cell, infection

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited
Division of Pharmaceutical biology

Muita tietoja Övriga uppgifter Additional information
Supervisor Päivi Tammela

SISÄLLYSLUETTELO

KIRJALLISUUSKATSAUS:

1 JOHDANTO 1
2 *S. AUREUS* TAUDINAIHEUTTAJANA 2
2.1 Yleistä patogeenista 3
2.2 Bakteerin kolonisaatio ja invaasio 5
2.2.1 Adhesiinit ja pintaproteiinit 6
2.2.2 Biofilmin muodostus 8
2.2.3 Solunulkoiset entsyymit 9
2.3 Suojautuminen isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä 12
2.3.1 Kapseli 12
2.3.2 Toksiinit 13
2.3.3 Pienipesäkkeiset variantit ja solunsisäinen piileskely 15
2.4 Geenit virulenssin takana 18
3 *S. AUREUKSEN* AIHEUTTAMAT INFEKTIOT JA NIIDEN HOITO 21
3.1 *S. aureuksen* aiheuttamat infektiot 21
3.1.1 Toksiinivälitteiset sairaudet 22
3.1.2 Sairaalainfektiot ja MRSA 23
3.2 *S. aureuksen* aiheuttamien infektioiden hoito 25
4 RESISTENSSI 27
4.1 β-laktaami- ja metisilliiniresistenssi 29
4.2 Glykopeptidiresistenssi 30
4.3 Fluorokinoloniresistenssi 31
4.4 Aminoglykosidiresistenssi 32
4.5 Resistenssi muille antimikrobiaineille 32
5 UUSIEN BAKTEERILÄÄKKEIDEN KEHITTÄMINEN 34
6 YHTEENVETO JA POHDINTA 37

KOKEELLINEN OSA:

7 TYÖN TARKOITUS JA TAUSTAA 39
8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT 41
8.1 Tutkittavat yhdisteet, reagenssit ja antimikrobiset yhdisteet 41
8.2 Bakteerikanta ja kasvatusolosuhteet 42
8.3 Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrän määrittäminen 42
8.4 Yhteisviljelmämenetelmässä käytetty solulinja ja kasvatusolosuhteet 43
8.5 Infektointi 44
8.6 Isäntäsolujen elinkyvyn mittaaminen 44
8.7 Yhteisviljelmämenetelmän optimointi 45
8.8 Yhteisviljelmämenetelmän validointi 45
8.9 Antimikrobisen vaikutuksen primaariseulonta 46
8.10 Sekundaariseulonta yhteisviljelmämenetelmällä 46
8.11 Tulosten käsittely 47
9 TULOKSET JA POHDINTA 48
9.1 Menetelmän optimointi 48
9.1.1 Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä 49
9.1.2 Solumäärä 49
9.1.3 Solujen infektointi 51
9.1.4 Dimetyylisulfoksidialtistus infektoiduille HL-soluille 54
9.1.5 Kuoppalevyn sisäinen tulosten vaihtelu ja menetelmän toistettavuus 55
9.1.6 Menetelmän validointi 57
9.1.7 Menetelmän laadun arviointi 66
9.2 Antimikrobisen aktiivisuuden primaariseulonta 67
9.2.1 Betuliinijohdannaiset 67
9.2.2 Afrikkalaisista kasveista eristetyt puhdasaineet 69
9.2.3 Maaperäuutteet 69
9.3 Sekundaariseulonta yhteisviljelmämenetelmällä 70
9.3.1 Betuliinijohdannaiset 71
9.3.2 Afrikkalaisista kasveista eristetyt puhdasaineet 73
9.3.3 RN-mediumin vaikutus tutkittujen yhdisteiden aktiivisuuteen 74

9.4 Pohdinta 76
10 YHTEENVETO 77
KIRJALLISUUSLUETTELO 79

LIITTEET
LIITE 1 Bakteerin kasvatuksessa käytettyjen kasvatuliuosten ja ravintoagarin koostumukset
LIITE 2 Kokeellisessa työssä käytetyt reagenssit ja antimikrobiset yhdisteet
LIITE 3 Solujen kasvatuksessa ja irrotuksessa käytettyjen liuosten koostumukset
LIITE 4 Primaariseulonnassa seulotut betuliinijohdannaiset

KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO

Staphylococcus aureus on yleinen kommensaali bakteeri ja opportunisti patogeeni. Tämän tutkielman tarkoituksena on käsitellä *S. aureusta* taudinaiheuttajana. Tutkielmassa on pyritty käsittelemään tärkeimmät patogeenin taudinaiheuttamiskykyyn liittyvät tekijät, patogeenin aiheuttamat infektiot, niiden hoito sekä resistenssin kehittyminen. Lisäksi tutkielman lopussa on lyhyt pohdinta uusien bakteerilääkkeiden kehityksen tämänhetkisestä tilasta. Tutkielman tarkoituksena on luoda yleiskuva patogeenin taudinaiheuttamismekanismeista sekä merkityksestä taudinaiheuttajana.

S. aureusta on tutkittu paljon, hakusanana se tuottaa yli 66000 hakutulosta pubmed-palvelussa. Se aiheuttaa infektioita niin perusterveillä henkilöillä kuin kroonisista sairauksista kärsivillä. Isäntäorganismin suojamekanismien heiketessä opportunisti patogeeni voi aiheuttaa monenlaisia infektioita lievistä ihoinfektioista aina vakaviin minkä tahansa elimen invasiivisiin infektioihin. Se on merkittävä sairaalainfektioiden aiheuttaja. Suomessa vuosina 1999-2006 esiintyneistä veriviljelypositiivisista sairaalainfektioista 13 % oli *S. aureuksen* aiheuttamia (KTL 2007). *S. aureuksen* aiheuttamille infektioille altistavat esimerkiksi diabetes, sydän- ja verisuonisairaudet, ihosairaudet sekä immuunipuutostilat (Robinson ym. 2009). Riskitekijöitä ovat myös ruiskuhuumeiden käyttö sekä katetrit ja biolääketieteelliset apuvälineet. Jatkuvien ja latenttien infektioiden riskiä on havaittu nostavan muun muassa endovaskulaarinen infektio, vankomysiinihoito, kardiovaskulaarinen proteesi, metastaattinen infektio ja diabetes (Khatib ym. 2006). Suurempi huolenaihe nykypäivänä ovat kuitenkin metisilliinille resistentin *S. aureuksen* (MRSA) avohoidon (CA) puolella aiheuttamat infektiot, koska niihin sairastuvat ihmiset, joilla ei ole altistavia riskitekijöitä (Naimi ym. 2003, Yamamoto ym. 2009, DeLeo ym. 2010).

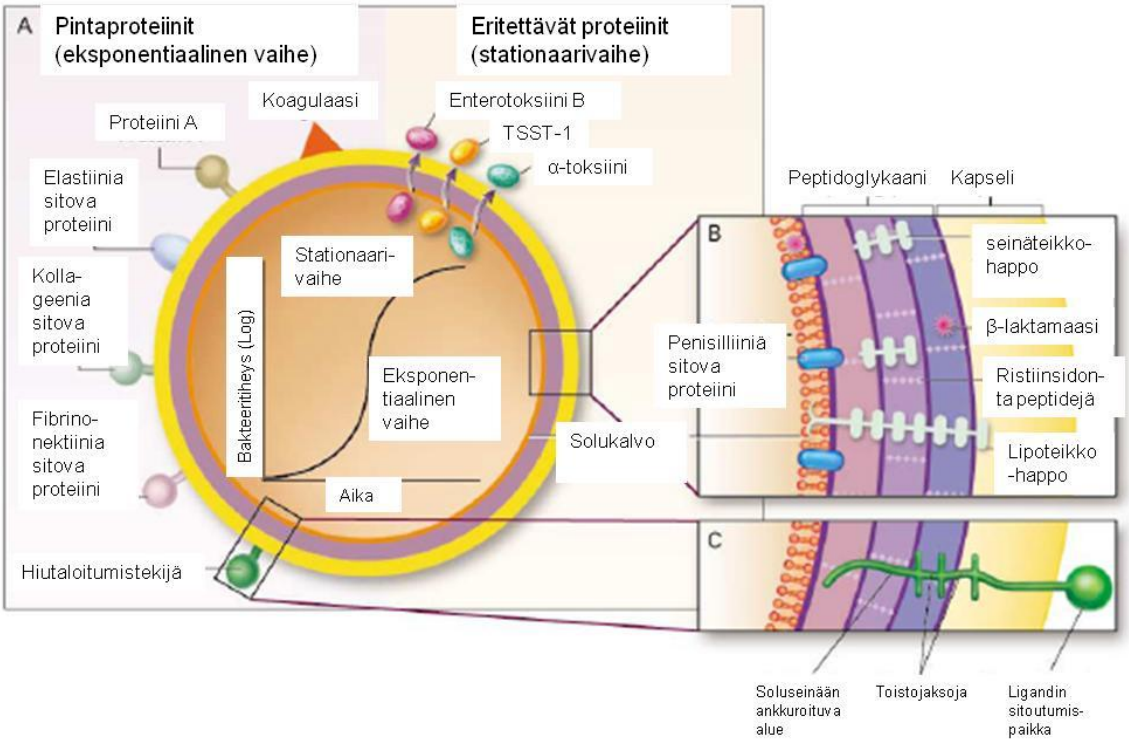
S. aureusta esiintyy yleisesti nisäkkäiden iholla ja nenän limakalvoilla, mutta sitä voi esiintyä myös esimerkiksi emättimen ja peräaukon seudulla. Noin 20-30 % ihmisistä kantaa bakteeria pysyvästi nenän limakalvoilla ja noin 30 % väliaikaisesti (Wertheim ym. 2005, Gordon ja Lowy 2008). Vain noin 20-50 % prosenttia ihmisistä ei kanna bakteeria koskaan. Kantajilla esiintyy sekä metisilliiniresistenttejä *S. aureus* (MRSA) -kantoja että metisilliinisensitiivisiä *S. aureus* (MSSA) -kantoja (Pujol ym. 1996). *S. aureuksen* pysyvillä kantajilla on suurempi riski sairastua bakteerin aiheuttamiin infektioihin (Eiff ym. 2001). Eiffin tutkimusryhmän tulokset osoittivat, että jopa 86 % *S. aureuksen* aiheuttamista bakteremioista oli klonaalisesti identtisen kannan aiheuttamia, jota aikaisemmin terveellä kantajalla esiintyi normaalifloorassa.

2 *S. AUREUS* TAUDINAIHEUTTAJANA

Virulenssilla tarkoitetaan mikrobin kykyä aiheuttaa isäntäorganismissa infektio. Patogeenin virulenssiin vaikuttavat: bakteerin kiinnittyminen isäntäorganismiin (kolonisaatio), kyky tunkeutua isäntäorganismiin (invaasio) sekä kyky puolustautua isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä. Patogeenin tarkoituksena on lisääntyä isäntäorganismissa kuitenkaan tappamatta sitä. Virulenssitekijät ovat bakteerin tuottamia yhdisteitä, yleensä entsyymejä, jotka ovat infektion alkamisen ja jatkumisen taustalla. Eri virulenssitekijöiden eritys on usein yhteydessä tiettyyn bakteerin kasvuvaiheeseen tai kasvuolosuhteisiin (Bronner ym. 2004).

Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa adhesiinit ja muut pintaproteiinit ovat merkittäviä virulenssin kannalta, kun taas stationaarivaiheessa eritettävät toksiinit ja solunulkoiset entsyymit (Kuva 1). Bakteerin virulenssi ja sen erittämät virulenssitekijät vaihtelevat eri kantojen välillä. Yleensä taudin aiheuttamisen taustalla ovat useiden virulenssitekijöiden yhdistelmät (Peacockin ym. 2002). Tietyn yksittäisen virulenssitekijän yhdistäminen tiettyyn bakteerin aiheuttamaan infektioon on vaikeaa (Jarraud ym. 2002). Patogeenin taudinaiheuttamiskykyyn vaikuttavat sekä virulenssitekijät, että kyky säilyä hengissä isäntäelimistön ulkopuolella. Infektiotilanteessa patogeenin virulenssitekijät

vuorovaikuttavat isännän puolustusjärjestelmän kanssa jatkuvasti. Isäntäorganismin immuunivasteeseen vaikuttavia seikkoja ovat muun muassa ravitsemustila, yleiskunto, muut sairaudet, geneettiset tekijät sekä hormonaaliset tekijät. Virulenssitekijöiden eritystä säädellään esimerkiksi bakteeritiheyden, ympäristön happamuuden ja hiilidioksidipitoisuuden avulla (Bronner ym. 2004).



Kuva 1. *S. aureuksen* rakenne. A: Pinta- ja eritettävät proteiinit. Monien proteiinin eritys on yhteydessä bakteerin kasvuvaiheeseen. B ja C: Solukalvon/seinän rakenne (mukaillen Lowy 1998).

2.1 Yleistä patogeenista

S. aureus on grampositiivinen kokkibakteeri, joka on halkaisijaltaan noin 1 µm (Lowy 1998). Se muodostaa kasvaessaan rypälemäisiä muodostelmia. Nimi *aureus* viittaa pesäkkeiden kultaiseen väriin, mutta väri voi myös puuttua. *S. aureus* on fakultatiivinen anaerobi. Se tuottaa energiaa pääasiassa aerobisesti, mutta kykenee myös fermentaatioon. Tämä on patogeenin kannalta hyödyllistä, koska esimerkiksi märkäpesäkkeissä hapen saanti on rajallista.

S. aureus tuottaa koagulaasientsyymiä, joka aiheuttaa plasman hyytymisen muuttamalla fibrinogeeniä fibriiniksi. Koagulaasireaktiota käytetään *S. aureuksen* tunnistamisen apuna, koska muut *Staphylococcus*-suvun bakteerit eivät tuota koagulaasientsyymiä (Plata ym. 2009). *S. aureus* on myös katalaasipositiivinen. Katalaasientsyymi hajottaa vetyperoksidia vedeksi ja hapeksi. Reaktiota käytetään *Staphylococcus* ja *Streptococcus* –sukujen erottamisessa.

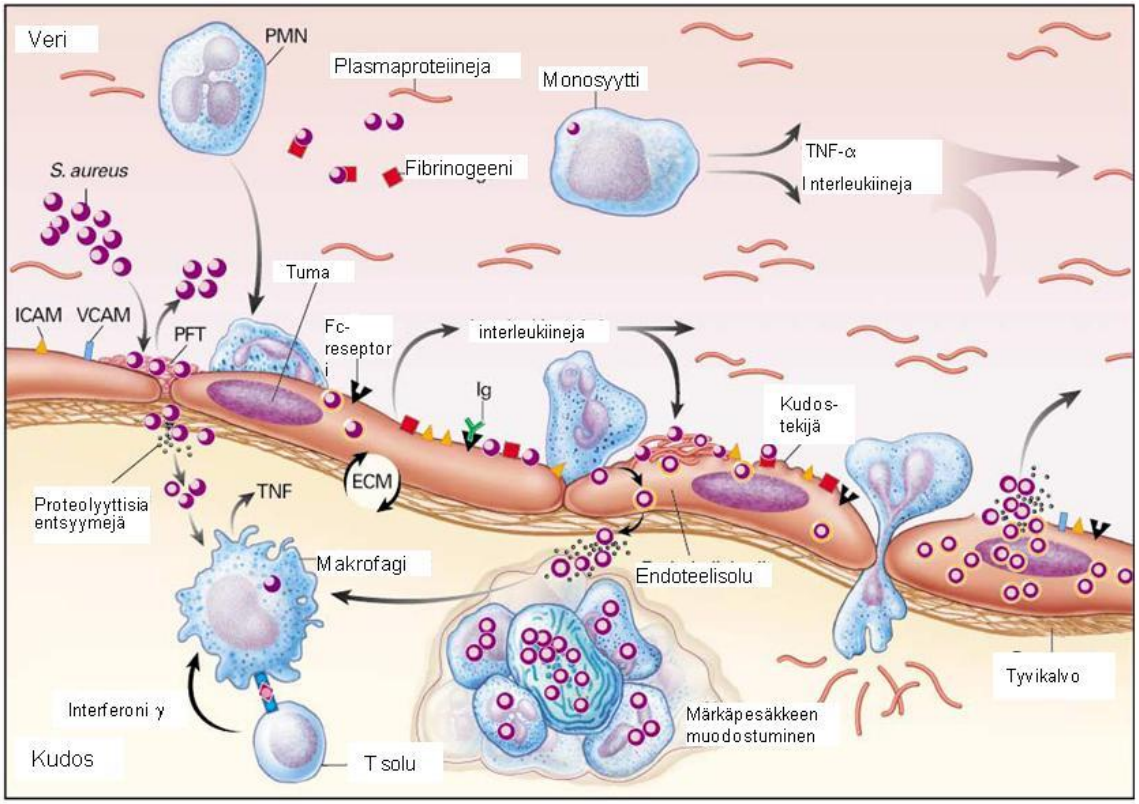
S. aureuksen soluseinä muodostuu pääosin peptidoglykaanistä (Lowy 1998). Peptidoglykaanin pääkomponentteja ovat N-asetyyliglukosamiini ja N-asetyylimuramiinihappo, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa 1,4-β sidoksilla. Lisäksi soluseinä sisältää teikkohappoja, jotka muodostuvat glyserolifosfaatti- tai ribitolifosfaattipolymeerista, joiden sivuhaaroina on erilaisia sokereita ja D-aminohappoja. Teikkohappo voi liittyä kovalenttisesti joko peptidoglykaaniin, jolloin kyseessä on seinäteikkohappo tai plasmamembraaniin, jolloin siitä käytetään nimitystä lipoteikkohappo. Suurin osa *S. aureus* -kannoista muodostaa soluseinän ulkopuolelle kapselin, joka on rakentunut polysakkaridirakenteisista polymeereistä.

S. aureuksen genomi sisältää yhden sirkulaarisen kromosomin ja koostuu noin 2,8 miljoonasta emäsparista. MRSA:n kokonaan sekvensoidun genomin on julkaissut muun muassa Kurodan tutkimusryhmä (2001) ja Holdenin tutkimusryhmä (2004). Genomin guaniinisytosiini (GC) -pitoisuus on matala, keskimäärin noin 33 % (Kuroda ym. 2001). *S. aureuksen* genomille tyypillisiä ovat monenlaiset liikkuvat geenielementit kuten, plasmidit ja erilaiset insertiojaksot. Insertiojaksot voivat siirtyä mihin tahansa genomissa ja aiheuttaa joko geenin aktivaation tai inaktivaation. Insertiojaksot voivat sisältää myös bakteriofaagiperäistä DNA:ta. Transposonit ovat liikkuvia geenielementtejä. Niiden avulla tapahtuu usein resistenssigeenien siirtyminen. Patogeenisuussaarekkeiksi kutsutaan geenielementtejä, jotka sisältävät useita virulenssin kannalta oleellisia geenejä.

2.2 Bakteerin kolonisaatio ja invaasio

Bakteerin kolonisaatioon vaikuttavat bakteerin kyky kiinnittyä isäntäorganismiin sekä kyky säilyä isäntäelimistön ulkopuolella. Bakteerin kolonisaatiota edistävät solun pinnan erilaiset adheesiota edistävät proteiinit (adhesiinit) sekä bakteerin muodostama ulkoinen polysakkaridiverkosto. Polysakkaridiverkoston avulla bakteeripopulaatio voi muodostaa biofilmin, joka on bakteerien muodostama erikoistunut rakenne. Se edistää bakteerien tarttumista erilaisiin biomateriaaleihin ja suojaa bakteeripopulaatiota erilaisilta ympäristötekijöiltä.

Bakteerin invaasion isäntäsolukkoon on monivaiheinen tapahtuma ja aiheuttaa isäntäsolukossa immuunijärjestelmän aktivoitumisen (Kuva 2). Bakteerin tunkeutumisessa isäntäorganismiin auttavat bakteerin muodostamat erilaiset solunulkoiset entsyymit ja toksiinit, jotka tuhoavat ympäröiviä kudoksia. Bakteerin tunkeutuminen kudokseen aikaansaa ensimmäisenä luonnollisen immuniteetin aktivoitumisen. Luonnollisen immuunijärjestelmän solut kykenevät tunnistamaan erilaisia patogeenisia rakenteita erikoistuneilla reseptoreillaan (esim. tollin kaltaiset reseptorit). Tunnistaessaan patogeenin ne esittelevät sen rakenteita hankinnaisen immuunijärjestelmän soluille (lymfosyyteille), kuten T-soluille. Sopivan reseptorin, patogeenirakenteen tunnistavan, omaava T-solu aktivoituu, jakaantuu vilkkaasti ja aktivoi myös vasta-ainevälitteiseen immuniteettiin kykeneviä B-soluja. Hankinnainen immuunijärjestelmä aktivoituu ja alkaa tuhota tunnistettua kohdetta sekä solu- että vasta-ainevälitteisesti. Immuunijärjestelmän aktivoitumisen seurauksena solut tuottavat sytokiineja (sytokiinit, interleukiinit yms.), joiden avulla solut aktivoivat toisiaan.



Kuva 2. *S. aureuksen* invaasio kudokseen, Neutrofiili (PMN), verihiutalefibriinitrombi (PFT), solujenvälisiä adheesio molekyylejä (ICAM), verisuonisoluadheesiomolekyylejä (VCAM), soluväliaine (ECM) (mukaillen Lowy 1998).

2.2.1 Adhesiinit ja pintaproteiinit

Adhesiinit ovat mikrobin tuottamia kiinnittymistä ja kolonisaatiota edistäviä proteiineja. Ne tunnistavat isäntäsolukon epiteelisolukon tai soluväliaineen (ECM, engl. extracellular matrix) rakenteita, kuten kollageenia, fibrinonektiiniä ja fibrinogeeniä. Ne edistävät bakteerin kiinnittymistä ja kolonisaatiota isäntäsolukon pinnalle ja ovat siten merkittäviä bakteerin virulenssin kannalta. Soluväliaine on biologisesti aktiivinen kudos, joka koostuu useista matriksimolekyyleistä (Patti ym. 1994). Se on tärkeä solujen adheesiossa, migraatiossa, jakaantumisessa ja erilaistumisessa. Eukaryoottisolujen ja soluväliaineen välinen kommunikointi tapahtuu erikoistuneiden reseptoreiden avulla, joista parhaiten kuvattuja ovat integriinit. Adhesiineista käytetään myös lyhennettä MSCRAMM (engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). MSCRAMM-

rakenteita on paljon erilaisia ja niistä on tunnistettu vasta osa. *S. aureuksella* MSCRAMM-rakenteista on tunnistettu muun muassa fibrinonektiiniä, kollageenia ja fibrinogeeniä sitovia proteiineja.

Fibrinogeeniin sitoutuvasta adhesiinista käytetään nimitystä hiutaloitumistekijä (Clf, engl. clumbing factor). Hiutaloitumistekijästä löytyy kaksi eri muotoa ClfA ja ClfB, joiden sitoutumismekanismi fibrinogeeniin on erilainen (Eidhin ym. 1998). CflA on yleisempi bakteerin aikaisessa eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa kuin ClfB. Kaksi fibrinogeeniä sitovaa adhesiinia saattavat toimia yhdessä synergisesti, jolloin bakteerisolut kykenevät sitoutumaan paremmin isäntäorganismin verihiutaleisiin. Tämä on edullista verisuoniston virtaavissa oloissa. Clf aiheuttaa bakteerisolujen kerääntymistä rykelmiin plasman läsnä ollessa. Hallin tutkimusryhmä (2003) osoitti ClfA:ta vastaan tehdyn monoklonaalisen vasta-aineen estävän *S. aureuksen* kolonisaatiota yli 90 %. Clf-proteiinit kuuluvat Sdr-proteiiniperheeseen, jotka ovat rakenteellisesti samankaltaisia pintaproteiineja (Foster ja Höök 1998).

Fibrinonektiiniä sitovasta adhesiinista on olemassa kaksi muotoa FnbpA ja FnpbB (engl. fibrinonectin binding protein A/B). Fibrinonektiini on glykoproteiini, joka esiintyy elimistöstä sekä liukoisena, että soluväliaineeseen kiinnittyneenä muotona. Sen reseptoreina isäntäsolukossa toimivat integriinit. Fibrinonektiini on apuna solujen välisissä liitoksissa ja liikkumisessa. Mutaatiokokeet ovat osoittaneet, että FnbpA:lla on useita fibrinonektiiniä sitovia alueita, jotka sitoutuvat sekä fibrinonektiiniin, että endoteelisoluihin (Massey ym. 2001). FnbpA ja FnbpB ovat tärkeitä tekijöitä bakteerin invaasiossa isäntäsolukkoon (Fowler ym. 2000). Fibrinonektiini muodostaa sillan Fnbp-molekyylien ja isäntäsolukon β1-integriinin kanssa, mikä johtaa bakteerien soluunottoon.

Kollageenia sitova proteiini (Cna, engl. collagen binding protein) on merkittävä virulenssitekijä luu- ja rustokudoksen infektioissa. Cna-positiiviset kannat sitoutuvat rustokudokseen 5-24 kertaisesti verrattuna cna-negatiiviseen kantaan (Patti ym. 1994). Tutkimuksen mukaan cna-positiivinen kanta aiheutti septisen artriitin oireet yli 70 %

testatuista hiiristä, kun cna-negatiiviset kannat vain alle 27 %. Kollageenia sitova proteiini ei ole yhtä yleinen kuin muut adhesiinit *S. aureus* -kannoilla. Keskimäärin 38-56 % *S. aureus* -kannoista ovat cna-positiivisia (Foster ja Höök 1998).

Proteiini A sitoutuu (SPA, engl. staphylococcal protein A) immunoglobuliinien Fc-osaan, joka on vasta-aineen pysyvä, ei vasta-ainetta sitova osa. Sen on havaittu sitoutuvan myös fibrinogeeniin (Wann ym. 2000). Immunoglobuliinien Fc-osaan sitoutumisen seurauksena vasta-aineet sitoutuvat bakteerin pintaan väärinpäin, eikä immuunijärjestelmän solut siten tunnista patogeeniä. Proteiini A sitoutuu myös vW-tekijään (vWF, engl. von Willebrand factor, Hartleib ym. 2000). VW-tekijä edistää verihiutaleiden adheesiota endoteelin vaurioituessa.

S. aureuksen soluseinän teikkohapon (WTA, engl. wall teichoic acids) on todettu olevan välttämätön *S. aureuksen* nasaalikolonisaatiolle (Weidenmaier ym. 2004). Tämä todettiin *in vivo* rottainfektiomallissa. Seinäteikkohapon on havaittu vuorovaikuttavan epiteelin lektiinityyppisten reseptorien kanssa. Autolysiinit ovat soluseinäentsyymejä, jotka ovat välttämättömiä bakteerin jakautumiselle (Zoll ym. 2010). Mutaatiot autolysiineja (Alt) koodaavissa geeneissä heikentävät bakteerin virulenssia.

2.2.2 Biofilmin muodostus

Biofilmi on monimutkainen bakteerien muodostama populaatio, jossa yksilöt ovat kiinnittyneet toisiinsa ja sulkeutuneet polysakkaridiverkoston sisään. Polysakkaridiverkosto on muodostunut poly-*N*-asetyyliglukosamiinista (PNAG), jonka tuotantoa säätelee *ica* (intercellular adhesion)-operonin koodaamat peptidit (Arciola ym. 2001). Biofilmin muodostuksen on ajateltu olevan tärkeä virulenssitekijä *Staphylococcus epidermiksen* aiheuttamissa infektioissa, mutta ei niinkään *S. aureuksen*. Uudemman tiedon valossa biofilmin muodostaminen on osoittautunut tärkeäksi virulenssitekijäksi myös *S. areuksen* aiheuttamissa infektioissa. Jopa 60 % kliinisesti eristetyistä *S. aureus*-kannoista löytyy *ica*-geenejä eli ne kykenevät biofilminmuodostukseen (Arciola ym. 2001). Uusimmissa tutkimuksissa on havaittu, että *S. aureus* kykenee biofilmin muodostukseen myös ilman

polysakkaridiverkostoa (Boles ym. 2010). Tämän taustalta löytyy kaksiosainen graS-säätelyjärjestelmä ja oletettu inositolimonofosfataasi. Nämä geenit on havaittu myös CA-MRSA-kannoilla. Polysakkaridiverkostosta riippumattoman biofilmin muodostamisen kannalta tärkeitä tekijöitä ovat solunulkoinen proteaasiaktiivisuus ja autolyysientsyymit. Biofilmin avulla patogeeni kykenee kiinnittymään erilaisille biomateriaalipinnoille, kuten katetreihin ja biolääketieteellisiin apuvälineisiin. Se on merkittävä virulenssitekijä katetreista ja muista invasiivisista apuvälineistä lähtöisin olevissa infektioissa, mutta sen merkitys saattaa olla oletettua suurempi myös muissa *S. aureuksen* aiheuttamissa infektioissa.

2.2.3 Solunulkoiset entsyymit

S. aureus erittää lukuisia solunulkoisia entsyymejä ja toksiineja, joiden avulla se pystyy tuhoamaan isäntäorganismin kudoksia sekä muuttamaan niitä bakteerille sopiviksi ravinteiksi (Taulukko 1). Jotkut solunulkoiset entsyymit ovat myös apuna patogeenin puolustautumisessa isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä. Invaasion apuna ovat esimerkiksi sytotoksiset toksiinit, plasman hyytymiseen vaikuttavat entsyymit sekä erilaiset proteaasientsyymit, jotka kykenevät pilkkomaan isäntäorganismin kudoksia. Muita bakteerin erittämiä solunulkoisia entsyymejä ovat muun muassa lipaasit, fosfolipaasit ja rasvahappoja muokkaava entsyymi (FAME, engl. fatty acid-modifying enzyme), joiden merkitystä virulenssin kannalta ei kovin hyvin tunneta.

S. aureuksen erittämä koagulaasi sitoutuu ihmisen protrombiiniin mooliosuudella 1:1 ja muodostaa kompleksin nimeltä stafylotrombiini, joka kykenee muodostamaan fibrinogeenistä fibriiniä (Kawabata ym. 1985). Koagulaasi sitoutuu myös fibrinogeeniin. Sen eritys on runsainta eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, mutta sen rooli patogeneesissä on vielä epäselvä. On arveltu, että koagulaasin aiheuttamien fibriinihyytymien muodostuminen infektioalueelle suojaisi patogeeniä isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä.

Stafylokinaasi (Sak) on plasminogeenin aktivaattori (Arvidson 2000). Se muodostaa plasmiinin kanssa kompleksin, jolla on suuri plasminogeeniä aktivoiva vaikutus. Sak sitoutuu myös plasminogeeniin, mutta sen aktivoimiseen tarvitaan Sak-plasmiinikompleksi. Stafylokinaasin vaikutus on trombolyyttinen ja sen eritys tapahtuu koagulaasin kanssa eri aikaan. Onkin arveltu, että se vapauttaisi patogeenin fibriinihyytymistä, kun populaatio on tarpeeksi suuri leviämään muualle isäntäelimistöön. Stafylokinaasilla on havaittu myös isäntäorganismin puolustujärjestelmältä suojaava vaikutus (Jin ym. 2004). Se suojaa patogeenia neutrofiilien (PMN, engl. polymorphonuclear neutrophil) tuottamilta α-defensiineilta, jotka ovat neutrofiilien tuottamia bakterisidisia yhdisteitä.

Taulukko 1. *S. aureuksen* tuottamia solunulkoisia entsyymejä ja niiden vaikutus isäntäorganismiin.

Entsyymi	Geeni/Lyhenne	Vaikutus	Eritys
Koagulaasi	*coa*	Fibriinihyytymien muodostuminen	Eksponentiaalinen kasvuvaihe
Stafylokinaasi	*sak*	Trombolyysi, suojautuminen defensiineiltä	Myöhäinen eksponentiaalinen kasvuvaihe
Proteaasit	*sasp* (V8)	Isäntäsolukon pilkkominen ravinteiksi	Invaasion apuna
Hyaluronaattilyaasi	*hys*A	Hyaluronaatin hydrolysoiminen (invaasio)	Eksponentiaalinen kasvuvaihe
Nukleaasi	*nuc*	Hajottaa yksi- ja kaksijuosteista DNA:ta ja RNA:ta	
Lipaasi	geh	Puolustusjärjestelmältä suojautuminen?	
Fosfolipaasit	*plc*	Isäntäsolukon hajottaminen	Invaasion apuna
Rasvahappoja muokkaava entsyymi	FAME	Rasvahappojen esterifikaatio kolesteroliksi	Invaasion apuna
Hemolysiinit	*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*	Huokosten muodostaminen	Stationaarivaihe, invaasion apuna
Katalaasi		Fagosyyttien tuottaman vetyperoksidin neutralointi	Suojautuminen isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä
Solunulkoinen adhesiini proteiini	eap	Aktivoi T-soluja	

Hemolysiinit (α, β, δ, γ -toksiinit) ovat huokosia muodostavia sytolyyttisia toksiineja. Nimi hemolysiini on alun perin johdettu niiden kyvystä hajottaa punasoluja. Hemolysiinit vaikuttavat isäntäsolujen solukalvoon muodostamalla niihin huokosia, mikä johtaa lopulta solun hajoamiseen. Niillä on tärkeä merkitys sekä bakteerin invaasiossa että puolustautumisessa isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä. Niitä käsitellään tarkemmin toksiineita käsittelevässä kappaleessa.

S. aureus tuottaa lukuisia solunulkoisia entsyymejä, joilla on proteolyyttinen aktiivisuus, kuten seriini-, metallo- ja tioliproteaaseja (Arvidson 2000). Seriiniproteaaseihin kuuluvat *S. aureuksen* tuottamat V8-proteaasit. Tioliproteaaseihin kuuluva stafopaiini (engl. staphopain) on samankaltainen kuin papaiiniryhmän tioliproteaasit. Metalloproteaaseihin kuuluva aureolysiini (aur) on solunulkoinen entsyymi. Se sitoo kalsiumia, jolla on entsyymiä stabiloiva vaikutus, ja vaatii koentsyymikseen sinkkiatomin. Proteaasien tarkoituksena ajatellaan olevan isäntäsolukon muuttaminen patogeenille sopiviksi ravinteiksi.

Muita *S. aureuksen* tuottamia solunulkoisia entsyymejä ovat hyaluronaattilyaasi, termostabiili nukleaasi ja katalaasi. Hyaluronaattilyaasi hydrolysoi selkärankaisissa yleisesti esiintyvää hyaluronihappoa (Arvidson 2000). Sen eritys on vilkkainta bakteerin kasvun eksponentiaalisessa vaiheessa, mikä viittaa sen tärkeyteen patogeenin kolonisaatio- ja invaasiovaiheessa. Lähes kaikki *S. aureus* -kannat erittävät termostabiilia nukleaasia (TNase) ja sitä on käytetty bakteerin tunnistamisen apuna, mutta sen merkitys bakteerin virulenssiin on epäselvä. Katalaasi on entsyymi, joka katalysoi vetyperoksidin hajoamista vedeksi ja hapeksi. Katalaasilla on havaittu olevan vaikutus bakteerin virulenssiin. Katalaasin tuotolla oli suora korrelaatio hiirien kuolleisuuteen Mandelin (1975) tekemässä tutkimuksessa. Katalaasin ajatellaan suojaavan patogeenia puolustusjärjestelmän solujen tuottamalta vetyperoksidilta ja olevan siten merkittävä bakteerin virulenssiin vaikuttava tekijä. Solunulkoinen proteiini eap (engl. extracellular adherence protein) aktivoi T-soluja, mutta eri mekanismilla kuin superantigeenitoksiinit (Haggar ym. 2009). Sillä on havaittu olevan voimakkaita anti-inflammatorisia vaikutuksia.

2.3 Suojautuminen isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä

S. aureuksella on monia keinoja puolustautua isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä. Suojautumiskeinoja ovat muun muassa kapselimuodostus, toksiinien ja solunulkoisten entsyymien muodostaminen. Bakteerin pesäkkeiden kultaisen värin taustalla olevien karotenoidien on myös havaittu suojaavan immuunijärjestelmän tuottamilta oksidanteilta (Liu ym. 2005). Patogeeni pystyy myös tunkeutumaan isäntäorganismisoluihin ja piileskelemään siten solunsisäsesti isäntäorganismin puolustusjärjestelmältä. Myös edellä kuvatut adhesiinit ja pintaproteiinit edesauttavat puolustautumista keräämällä isäntäorganismista peräisin olevien molekyylejä bakteerin pintaan, jolloin immuunijärjestelmän solut eivät tunnista patogeeniä (Patti ym. 1994).

2.3.1 Kapseli

Useat kliinisesti eristetyt *S. aureus* -kannat tuottavat kapselirakennetta. Kapseli on muodostunut solunulkoisista polysakkarideista. Karakawan tutkimusryhmä (1985) on kehittänyt vasta-aineisiin perustuvan serologisen testin, jonka avulla he pystyivät erottamaan 8 erilaista kapseliserotyyppiä. Erilaisia kapseliserotyyppejä on tähän mennessä tunnistettu 11 kappaletta, joista tyypit 5 ja 8 esiintyvät yleisimmin kliinisesti eristetyissä kannoissa (Arbeit ym. 1984, Poutrel ym. 1988). Useilla patogeeneillä kapselin on todettu edistävän bakteerin kolonisaatiota. Kapselin on havaittu suojaavan opsonisaation avulla tapahtuvalta fagosytoosilta. Opsonisaatiossa vasta-aineet kiinnittyvät patogeenin pintaan, jolloin immuunijärjestelmän fagosytoivat solut tuhoavat kohteen. Kapselin avulla bakteerikasvusto voi liimautua ympäristöönsä ja muodostaa biofilmin (ks. kappale 2.2.2).

Kapseli voi olla paksu, jolloin kyseessä on korkeasti kapseloitunut (engl. heavily/highly encapsulated) kanta (O´Riordan ja Lee 2004). Korkeasti kapseloituneet kannat muodostavat agarmaljalla limaisia pesäkkeitä. Kapselirakenne voi myös olla ohuempi, jolloin käytetään nimitystä mikrokapseli. Mikrokapselikannat eivät muodosta limaisia pesäkkeitä, eikä niitä siksi pystytä erottamaan agarmaljalla kapseloitumattomasta kannasta. Korkeasti kapseloituneet kannat kuuluvat serotyyppeihin 1 ja 2. Niiden on havaittu useissa

tutkimuksissa vähentävän opsonisaatiota ja suojaavan bakteeria fagosytoosilta (Peterson ym. 1978, Wilkinson ym. 1979). Mikrokapselin vaikutus patogeenin virulenssiin ei ole yhtä yksiselitteinen. Karakawan tutkimusryhmän (1988) tulosten mukaan kapseliserotyypit 5 ja 8 suojasivat bakteeria fagosytoosilta kaninseerumissa, mutta monoklonaalisella vasta-aineella voitiin indusoida kapseliserotyyppien 5 ja 8 fagosytoosia. Albuksen tutkimusryhmän (1991) mukaan tyypin 5 mikrokapselirakenteen ei todettu rottamallissa edistävän *S. aureuksen* virulenssia. Thakkerin tutkimusryhmän (1998) tekemässä tutkimuksessa kapseliserotyyppi 5 lisäsi patogeenin virulenssia hiiri-infektiomallissa ja suojasi fagosytoosilta.

2.3.2 Toksiinit

S. aureus erittää monenlaisia toksiineja, joihin kuuluvat esimerkiksi superantigeenitoksiinit, eksfoliatiiviset toksiinit ja hemolysiinit. Toksiineilla on monia vaikutuksia immuunijärjestelmän soluihin, mutta myös muita biologisia vaikutuksia (Dingens ym. 2000). Toksiinit ovat merkittäviä bakteerin virulenssissa, joissakin tapauksissa toksiini on pääsyy bakteerin aiheuttamassa taudissa. Toksiinien ja ekstrasellulaaristen entsyymien eritys tapahtuu pääasiassa bakteerin kasvun stationaarisessa vaiheessa (Kuva 1). Useat *S. aureuksen* erittämät toksiinit ovat immunogeenisia ja aiheuttavat aikuisilla lapsia suuremman IgG vasteen (Verkaik ym. 2009). Tämä viittaa siihen, että kohtaamiset patogeenin kanssa kehittävät vasta-ainevälitteistä immunitettia.

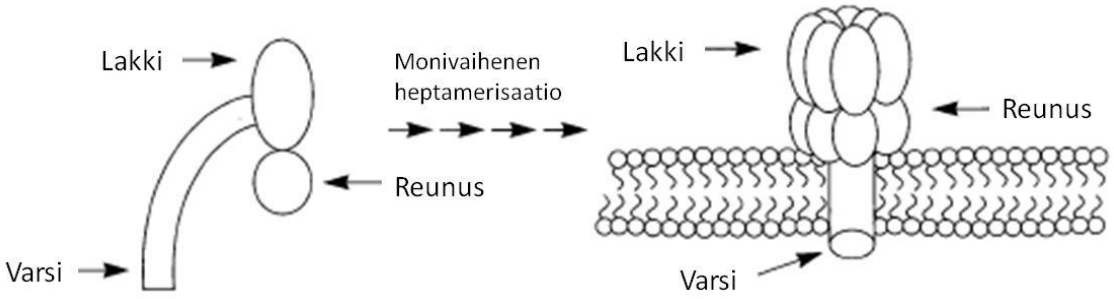
Superantigeenitoksiinien (PTSA, engl. pyrogenic toxin superantigens) –ryhmään kuuluvat toksinen sokkioireyhtymätoksiini-1 (TSST-1) ja useimmat stafylokokkaaliset enterotoksiinit (SE) (Dingens ym. 2000). Yhteisinä ominaisuuksina PTSA-ryhmän toksiineilla on pyrogeeni- ja superantigeeniominaisuus. Superantigeenina toimivien toksiinien on todettu stimuloivan T-soluja (Choi ym. 1989). Superantigeenit vaikuttavat isäntäelimistössä epäsuorasti. Ne aktivoivat T-soluja, sitoutumalla T-solureseptoriin. Konventionaaliset antigeenit sitoutuvat T-solureseptorin vaihtelevalle alueelle antigeenia sitovalla alueella. Normaalissa immuunivasteessa alle 0,01 % kaikista T-soluista on vuorovaikutuksessa antigeenin kanssa. Superantigeenit sitoutuvat T-solureseptorin Vβ-

alueelle, joka on normaalin antigeenia sitovan alueen ulkopuolella. Superantigeeni sitoutuu kaikkien samanlaisen rakenteen omaavien T-solujen Vβ-alueelle ja monilla T-soluilla tämä vaihtelevan alueen ulkopuolinen alue on sama (5-25% T-soluista). Lisäksi ne sitoutuvat antigeeniä esittelevän solun MHC II (engl. major histocompatibility complex)-proteiiniin. Sitoutuminen antigeeniä esittelevän solun pinnalle saa aikaan T-solujen voimakkaan aktivaation. T-solut alkavat tuottaa sytokiinejä, jotka stimuloivat muita soluja. Tämä saa aikaan systeemisen inflammaatioreaktion, jonka oireita ovat oksentelu, kuume, liman eritys sekä systeeminen sokki. PTSA-toksiinien vaikutusmekanismin vuoksi niiden mahdollista yhteyttä autoimmuunisairauksien syntymiseen on epäilty (Dingens ym. 2000). Asialle ei ole vielä kuitenkaan saatu varmistusta.

Eksfoliatiiviset toksiinit (ET) aiheuttavat voimakasta ihon kesimistä ja rakkulointia. Myös niillä on superantigeeniominaisuus (Choi ym. 1989). ET:t ovat rakkulaisen ja hilseilevän ihottumaoireyhtymän (SSSS, engl. stafylococcal scalded skin syndrome) sekä rakkulaisen märkäruven taustalla (Ladhani 2003). Eksfoliatiiviset toksiinit vaikuttavat isäntäsolukon desmosomien kadheriinityyppisiin proteiineihin, jotka ovat tärkeitä solujen välisissä liitoksissa epidermissä. Niiden vaikutus kohdistuu proteiiniin nimeltä desmogleiini-1. Eksfoliatiiviset toksiinit ETA ja ETB ovat eniten tutkittuja. Yamaguchin tutkimusryhmä (2002) löysi uudesta patogeenisusssaarekkeesta kaksi uutta eksfoliatiivista (ETD ja EDON-B) toksiinia koodaavaa avointa lukualuetta (ORF, engl. open reading frame). Puhdistettu rekombinantti-EDT aiheutti ihon kesimistä vastasyntyneellä hiirellä ja sen vaikutuksen havaittiin myös kohdistuvan desmogleiini-1.

Hemolysiinit (α-, β-, δ-, γ-toksiinit) ovat sytolyyttisia toksiineja. Näistä α-toksiinia on tutkittu eniten. Se vaikuttaa isäntäorganismin solukalvoon muodostamalla siihen huokosen. Vesiliuoksessa alkuperäinen α-toksiini on hydrofiilinen monomeeri (Füssle ym. 1981). Solukalvoista eristetty α-toksiini on amfifiilinen oligomeeri. Alkuperäinen toksiini oligomerisoituu solukalvolla ja muodostaa rengasmaisen huokosen solukalvon läpi (Kuva 3). α-toksiinin sitoutumismekanismi erilaisiin soluihin vaihtelee. α-toksiinin sitoutuminen kanin erytrosyytteihin vaatii erityiset sitoutumisalueet, kun taas ihmisen eytrosyytteihin

sitoutuminen on adsorptiivisempää ja epäspesifisempää (Hildebrand ym. 1991). α-toksiini on *in vitro* ja *in vivo* hemolyyttinen, sytotoksinen, dermonekroottinen ja tappava toksiini. β-hemolysiinistä käytetään myös nimitystä sfingomyelinaasi C, joka liittyy sen fosfolipaasiaktiivisuuteen. δ-toksiini on on pieni, lämpöstabiili ja pinta-aktiivinen sekä sytolyyttinen useimpia solukalvoja vastaan. Panton-Valentine leukosidiini (PVL) ja γ-toksiini ovat *S. aureuksen* erittämiä sytotoksisia, isäntäsolukkoon huokosia muodostavia kaksiosaisia toksiineja (Dingens ym. 2000). γ-hemolysiiniä erittävät lähes kaikki kannat (97 %). Panton-Valentine leukosidiinia muodostaa vain 2-3 % kannoista. PVL on merkittävä toksiini sillä sitä esiintyy kuitenkin useilla kliinisesti eristetyillä *S. aureus* –kannoilla ja sen esiintyminen on yhdistetty moniin infektioihin (Lina ym. 1999). γ-hemolysiini ja PVL:n biologinen vaikutus kohdistuu neutrofiileihin ja makrofageihin.

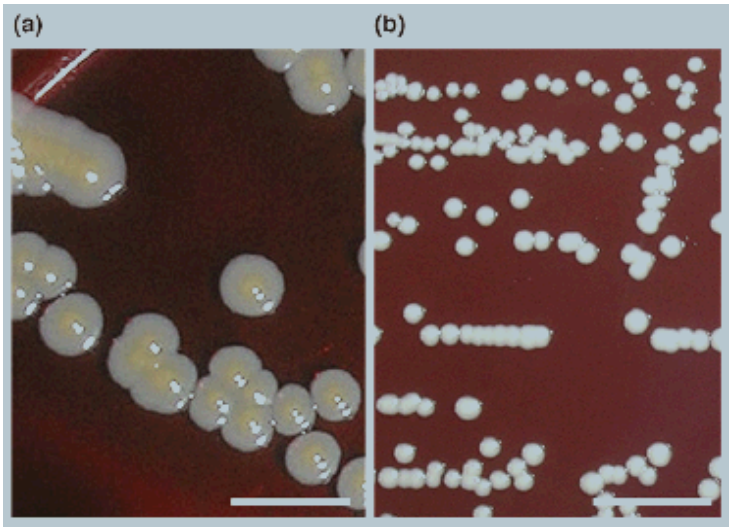


Kuva 3. α-toksiinin vapaa hydrofiilinen muoto ja heptamerisaatio solukalvolle huokosen muodostavaksi toksiiniksi (mukaillen Dingens ym. 2000).

2.3.3 Pienipesäkkeiset variantit ja solunsisäinen piileskely

S. aureuksesta tavataan pienipesäkkeisiä muunnoksia (SCV, engl. small colony variants, Kuva 4), jotka ovat vain kymmenesosan kokoisia villityypin pesäkkeisiin verrattuna (Proctor ym. 2006). SCV-variantit kasvavat hitaammin ja vaativat usein kasvaakseen jotain tiettyä ravintoainetta (auksotrofia), kuten hemiä, tiamiinia tai menadionia. Ne voivat ravinnemuutosten myötä palautua takaisin nopeammin kasvaviksi villityypin pesäkkeiksi. SCV-variantit voivat piileskellä solunsisäisesti isäntäeliön immuunijärjestelmältä ja antibiooteilta ja voivat esimerkiksi siten olla uusiutuvien sekä latenttien infektioiden taustalla. Solunsisäinen piileskely liittyy ainakin osittain α-toksiinin vähentyneeseen

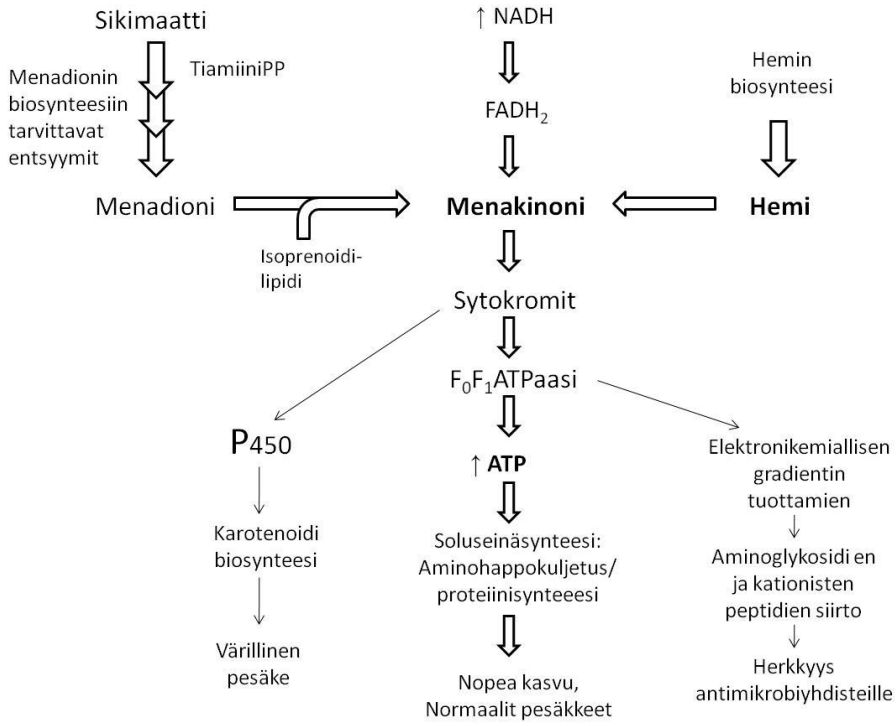
tuottoon, jolloin bakteerit pysyvät solunsisäisessä ympäristössä hajottamatta isäntäsolua (Eiff ym. 1997). Menadioni, hemi, tiamiini, tyydyttymättömät rasvahapot ja hiilidioksidi ovat pystyneet stimuloimaan auksotrofisten SCV-varianttien palautumista takaisin normaalisti kasvaviksi. SCV-varianttien on havaittu olevan ainakin kystisestä fibroosista kärsivien potilaiden jatkuvien infektioiden taustalla (Kahl ym. 1998). SCV-varianttien ilmaantumisen havaittiin olevan yhteydessä etenkin pitkäaikaiseen trimetopriimi-, sulfa- tai laskimonsisäisesti annosteltuun aminoglykosidihoitoon. SCV-varianteilla oli havaittavissa villityypin kantaan verrattuna viivästynyt katalaasireaktio ja vähentynyt α-hemolysiinin tuotanto. Lisäksi SCV-variantit olivat koagulaasipositiivisia sekä auksotroofisia hemin, tymidiinin tai menadionin suhteen.



Kuva 4. Normaali pesäke (a) ja pienipesäkkeinen variantti (b) lampaanveriagarmaljalla (Sendi ja Proctor 2008).

SCV-varianttien taustalla ovat mutaatiot geeneissä *menD* ja *hemB* (Proctor ym. 2006). Mutaatio *menD*-geenissä estää menadionin biosynteesin, joka on menakinonin (K-vitamiini) lähtöaine. *HemB*-mutanttikannoilla hemin biosynteesi on muuttunut, joka vaikuttaa sytokromin biosynteesiin. Menakinoni ja hemi ovat tärkeitä komponentteja elektroninsiirtoketjussa, joten mutaatiot näissä geeneissä johtavat häiriöihin elektroninsiirtoketjussa (Kuva 5). *HemB*-mutanttikannan havaittiin olevan villityyppiä virulentimpi hiiren artriittimallissa (Jonsson ym. 2003). Tämän ajateltiin johtuvan ainakin

osittain *hemB*-mutanttikannan tuottamista proteaaseista (yli 20 kertaa enemmän kuin villityyppi). *MenD*- ja *hemB*-mutanttikantojen virulenssia on tutkittu myös kanin endokardiittimallilla, mutta tutkimuksessa niiden ei havaittu olevan virulentimpia kuin villityypin (Bates ym. 2003). *MenD*-mutanttikanta pystyi kuitenkin villityypin kantaa paremmin selvitymään munuaisissa antibioottihoidon aikana. SCV-variantit tuottavat enemmän fibrinogeenia ja fibrinonektiinia sitovia proteiineja (Vaudaux ym. 2002). SCV-fenotyyppien taustalla on monia mekanismeja ja varianttien geneettinen tausta vaatii vielä jatkotutkimuksia (Schaaf ym. 2003).



Kuva 5. Elektroninsiirtoketjun vajauksen yhteys SCV-fenotyyppiin (mukaillen Proctor 2000).

Kyky piileskellä solunsisäisesti ei rajoitu pelkästään SCV-variantteihin, vaan myös villityyppien on havaittu kykenevän siihen. Grundmeierin tutkimusryhmän (2000) tekemässä tutkimuksessa kaikki tutkitut *S. aureus* -kannat (Cowan I, 6850 ja ST239) olivat yhtä invasiivisia endoteelisoluihin, mutta niiden aiheuttama inflammaatiovaste oli erilainen. Tutkimuksen mukaan patogeenin tunkeutuminen isäntäsolukkoon on tärkeä, mutta ei välttämätön tekijä voimakkaan inflammaatioreaktion aiheuttamisessa. Greshamin

tutkimusryhmä (2000) havaitsi patogeenin tunkeutuvan polymorfonukleaarisiin neutrofiileihin (PMN). He eristivät infektiopaikalta PMN-soluja ja totesivat niiden sisältävän elinkykyisiä bakteerisoluja, joilla voitiin aiheuttaa infektio terveessä eläimessä.

2.4 Geenit virulenssin takana

Useimmat *S. aureuksen* tuottamat virulenssitekijät ovat kaksiosaisten säätelygeenien kontrolloimia (Cheung ja Zhang 2002, Bronner ym. 2004). Näissä solukalvoon kiinnittynyt reseptori, ”membraanisensorina” toimiva histidiinikinaasi, aktivoi säätelyproteiinin fosforyloimalla sen. Fosforyloitunut säätelyproteiini sitoutuu kohdegeenin säätelyalueelle ja aktivoi transkription. C-terminaalinen osa membraanisensorimolekyylista ja N-terminaalinen osa vasteen säätelyproteiinista ovat bakteereilla hyvin säilyneitä rakenteita. Sekvenssin perusteella *S. aureuksen* genomista on tunnistettu noin 16 mahdollista kaksiosaista säätelygeeniä, joista eniten tutkittu on *agr*-säätelyjärjestelmä (Cheung ja Zhang 2002).

S. aureuksella monien virulenssigeenien taustalla on kaksiosainen säätelygeeni, josta käytetään nimitystä *agr* (engl. accessory gene regulator). *Agr*-säätely on monimutkaista. Se toimii positiivisena säätelijänä solunulkoisten entsyymien ja toksiinien eritykselle bakteerin elinkaaren loppuvaiheessa, mutta negatiivisena säätelijänä solupinnan virulenssitekijöille (Bronner ym. 2004). *Agr*-efektorina toimii RNA-molekyyli RNAIII, joka toimii säätelijänä sekä transkriptio-, että translaatiotasolla (Novick ym. 1993). *Agr*-lokuksen säätely bakteerin eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa tapahtuu autoaktivaation avulla. Autoaktivaatiossa RNAII ja RNAIII-transkriptio käynnistyy ja lopputuotteena saadaan aikaan autoindusoituvia peptidejä (AIP). AIP:t ovat pienimolekyylisiä yhdisteitä, joiden avulla bakteeripopulaatio kommunikoi. Tällaisesta bakteeritiheyteen liittyvästä bakteerien välisestä kommunikoinnista käytetään nimitystä quorum sensing (QS). AIP-molekyylien avulla bakteerit voivat aktivoida toistensa virulenssikaskadin käynnistymistä. AIP polymorfian mukaan kannat voidaan jakaa neljään eri *agr*-ryhmään (Jarraud ym. 2002). On havaittu, että eri kantojen tuottamat AIP-molekyylit voivat estää virulenssikaskadin käynnistymistä toisilla kannoilla. Tämän ajatellaan olevan edullista alalajien välisessä

kilpailussa. Jarraudin tutkimusryhmä (2002) yritti tutkimuksessaan selvittää *agr*-ryhmän (I-IV) ja kannan aiheuttamien infektioiden välistä yhteyttä, mutta suoraa korrelaatiota ei löytynyt. *Agr*-ryhmän havaittiin kuitenkin olevan yhteydessä kannan geneettiseen taustaan. Solunsisäiseen piileskelyyn kykenivät kannat, jotka eivät aiheuttaneet voimakasta inflammaatioreaktiota (Grundmeier ym. 2010). Ne myös vähensivät useiden virulenssitekijöiden muodostusta, kuten solunulkoisten entsyymien ja toksiinien muodostumista myöhäisessä eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. *Agr*-vajaat (engl. *agr*-defective) kannat saattavat siten olla myös jatkuvien ja toistuvien infektioiden taustalla.

SarA (engl. Staphylococcal acccessory regulator A)-proteiiniperhe kontrolloi monien virulenssitekijöiden ekspressiota *agr*-säätelyjärjestelmän ohella (Taulukko 2, Cheung ja Zhang 2002). Sar-proteiiniperheeseen kuuluu monia säätelyproteiineja muun muassa SarR, SarS(H1), SarT ja SarU. SarA-säätelyproteiinit lisäävät hemolysiinien, TSST-1, enterotoksiinien, FAME, fibrinogeenia ja fibrinonektiinia sitovien proteiinien tuotantoa ja vähentävät proteiini A:n, kollageenia sitovan proteiinin, lipaasin ja proteaasien tuotantoa. SarA-säätelyproteiinien ajatellaan tekevän yhteistyötä *agr*-säätelyjärjestelmän kanssa, koska sarA-proteiinit pystyvät aktivoimaan *agr*-promoottoreita. SarA ja *agr*-säätelyä pidetään globaalina säätelyjärjestelmänä. SarA-proteiinia tuotetaan maksimaalisesti myöhäisessä eksponentiaalisessa vaiheessa ja sen erityksen on havaittu olevan yhteydessä fnbA-ekspressioon. Maksimaalinen sarA-ekspressio käynnistää mahdollisesti *agr*-säätelyjärjestelmän, joka johtaa *agr*-järjestelmän aiheuttamaan pintaproteiinituotannon supressioon. Greshamin tutkimusryhmän (2000) tekemässä tutkimuksessa havaittiin myös s*ar*–mutanttikannan olevan vähemmän virulentti, koska se ei kyennyt selviytymään yhtä hyvin solunsisäisesti.

Sae (engl. *S. aureus* exoprotein expression)-lokus on säätelygeeni, joka säätelee solunulkoisten sekä soluseinäproteiinin ekspressiota. Giraudon (1997) tutkimusryhmän tekemässä tutkimuksessa *sae*-mutaatiokokeilla havaittiin, että α- ja β-hemolysiinin sekä koagulaasin eritys väheni merkittävästi. Vaikutus oli vähäisempi proteiini A:n ekspressioon. Geenien ekspression tutkimus paljasti, että *hla*- ja *hlb*- (α-, β-toksiinit) sekä *coa*

(koagulaasi)-geenien transkriptiota ei tapahdu ja *spa* (proteiini A) transkriptiota tapahtuu vähemmän Tn*551*-insertiomutantti kannassa. Tulosten perusteella oli havaittavissa, että *sae*-lokus säätelee solunulkoisten proteiinien synteesiä transkriptiovaiheessa. *Sae*-mutaatiolla ei havaittu olevan vaikutusta *agr*- tai *sar*-säätelylokuksiin.

Taulukko 2. Virulenssitekijöiden *agr*- ja sarA-säätely (mukaillen Cheung ja Zhang 2002).

Virulenssitekijä	Geeni/ Lyhenne	agr	sarA
Metalloproteaasi	aur	+	-
Enterotoksiini B	SEB	+	+
Hemolysiinit	α, β, δ, γ	+	+
Eksfoliatiiviset toksiinit	ET	+	Tuntematon
Rasvahappoja muokkaava entsyymi	FAME	+	+
Hyaluronaattilyaasi	HysA	+	Tuntematon
Lipaasi		+	-
Stafylokinaasi	sak	+	Tuntematon
Toksinen sokkioireyhtymä toksiini	TSST-1	+	+
V8-proteaasi	V8	+	-
Hiutaloitumistekijä B	ClfB	+	
Koagulaasi	Coa	-	+
Kollageenia sitova proteiini	Cna	±	-
Kapselipolysakkaridityyppi 5	Cap5	+	+
Fibrinonektiiniä sitovat proteiinit	Fnbp	-	+
Proteiini A	spa	-	-

Muita virulenssigeenien säätelyyn vaikuttavia säätelyjärjestelmiä on todella paljon ja kaikkia ei varmastikaan ole vielä edes tunnistettu. Muita säätelyjärjestelmiä/tekijöitä ovat muun mussa sigma-tekijä (σ^B), *graS*-säätelygeeni ja *wal*KR-säätelyjärjestelmä. σ^B-tekijävälitteisen säätely on tärkeä stressireaktioihin liittyvässä säätelyssä (Bronner ym. 2004). *Gra*RS-säätelygeenillä on myös havaittu olevan vaikutus bakteerikannan infektiokykyyn. Krausin (2008) tutkimusryhmä havaitsi *gra*RS-deleetion heikentävän bakteerikannan infektiokykyä *in vivo* rottainfektiomallissa. Kolonisaation aikana aktiivinen säätelyjärjestelmä on *wal*KR (geenituotteet: *sak* stafylokinaasi ja *sce*D autolysiini), joka säätelee erityisesti teikkohapon ja MSCRAMM-rakenteiden toimintaa (Burian ym. 2010).

Tätä tutkittiin *in vivo* rottamallilla. Teikkohapon ekspressio oli runsainta kolonisaation alkuvaiheessa, mutta kymmenen päivän kuluttua ekspressioprofiili kääntyi adhesiinien (ClfB ja IsdA, engl. iron-regulated surface determinant A) puoleen.

Peacockin tutkimusryhmä (2002) tutki virulenssitekijöiden yhteyttä patogeenin taudinaiheuttamiskykyyn. He havaitsivat seitsemän virulenssigeenin vaikuttavan patogeenisyyteen muita enemmän. Nämä seitsemän geeniä olivat: *fnbA* (fibrinogeeniä sitova proteiini), *cna* (kollageenia sitova proteiini), *sdrE* (tuntematon oletettu adhesiini), *sej* (enterotoksiinit J), *eta* (eksfoliatiivinen toksiini A), *hlg* (gamma-toksiini), ja *ica* (solujen välinen polysakkaridi adhesiini). Mikään geeneistä ei kuitenkaan vaikuttanut virulenssiin muita enemmän vaan niiden vaikutus bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn oli kumulatiivinen. Tutkimuksen perusteella on kuitenkin havaittavissa adhesiinien merkitys patogeenin virulenssiin. Tutkimuksessa tutkituista 33 virulenssitekijästä valikoituneista seitsemästä virulenssigeenistä kolme olivat adhesiineja koodaavia geenejä ja mukana oli myös biofilmin muodostamiseen liittyvä geeni *ica*. Adhesiinien merkitys patogeenin taudinaiheuttamiskykyyn on merkittävä. Tulosten arvioinnissa tulee kuitenkin huomioida se, että kaikkia virulenssiin vaikuttavia tekijöitä ei vielä tunneta.

3 *S. AUREUKSEN* AIHEUTTAMAT INFEKTIOT JA NIIDEN HOITO

3.1 *S. aureuksen* aiheuttamat infektiot

S. aureuksen aiheuttamien infektioiden kirjo on todella laaja. Lievimmillään infektiot ovat pinnallisia ja vaarattomia ihon, karvatupen tai kynsivallin tulehduksia. *S. aureus* on myös yleinen selluliitin eli ihonalaisen rasvakudoksen tulehduksen ja mastiitin eli rintatulehduksen aiheuttaja. Selluliittia aiheuttavat kannat olivat Linan tutkimusryhmän (1999) tekemän tutkimuksen mukaan 55 % PVL-positiivisia. Tunkeutuessaan pintaa syvemmälle patogeenin aiheuttamat suhteellisen lievät ihoinfektiot voivat kuitenkin kehittyä esimerkiksi märkäisiksi paiseiksi ja yleistyneeksi paisetaudiksi (furunkuloosi). Epideemisen furunkuloosin esiintymiseen liittyy osittain PV-leukosidiinia tuottavat *S.*

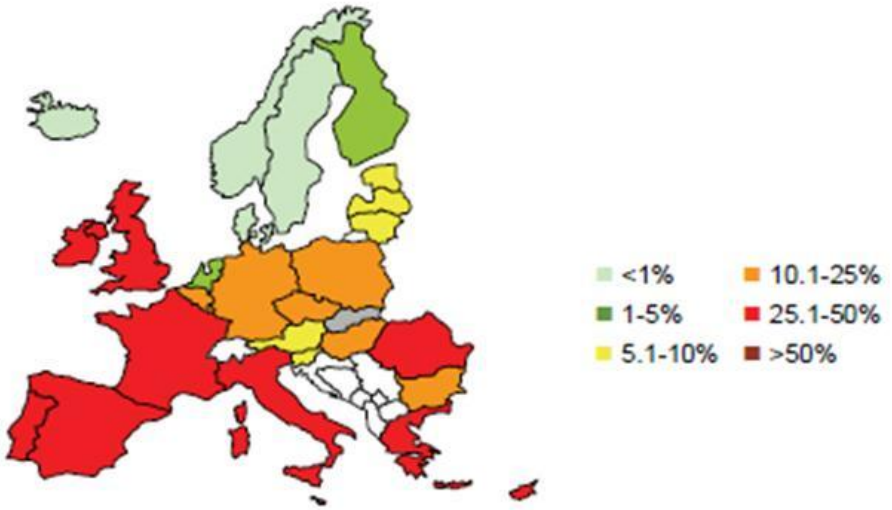
aureus kannat (Lina ym. 1999, Durupt ym. 2007). Märkärupi on yleinen ja helposti leviävä pikkulapsilla esiintyvä rakkulainen ihotauti. Märkäruven taustalla on eksfoliatiivisia toksiineja tuottavat *S. aureus* kannat (Durupt ym. 2007). Märkäiset paiseet voivat edelleen johtaa bakteerin leviämiseen verenkiertoon ja mahdolliseen bakteremiaan tai sepsikseen. Verenkiertoon levittyään bakteeri voi aiheuttaa minkä tahansa elimen infektion. *S. aureksen* aiheuttamaa pneumoniaa esiintyy etenkin keuhkosairauksista kärsivillä. Vakavaa nekroottista pneumoniaa (CA) sairastavilta eristetyt *S. aureus* –kannat olivat PVL-positiivisia (Lina ym. 1999). *S. aureuksen* aiheuttama osteomyeliitti eli luukudoksen tulehdus (luumätä) syntyy yleensä vamman seurauksena ja sitä esiintyy yleisimmin pitkissä luissa. Osteomyeliittipotilailta eristetyt *S. aureus* -kannat olivat 23 % PVL-positiivisia (Lina ym. 1999). *S. aureuksen* aiheuttama endokardiitti eli sydämen sisäkalvon tulehdus ilmenee useimmiten sydämen kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä. *S. aureuksen* aiheuttamaa artriittia eli niveltulehdusta esiintyy yleensä vain yhdessä nivelessä ja sen oireena on usein kuume ja nivelen voimakas kipu ja turvotus.

3.1.1 Toksiinivälitteiset sairaudet

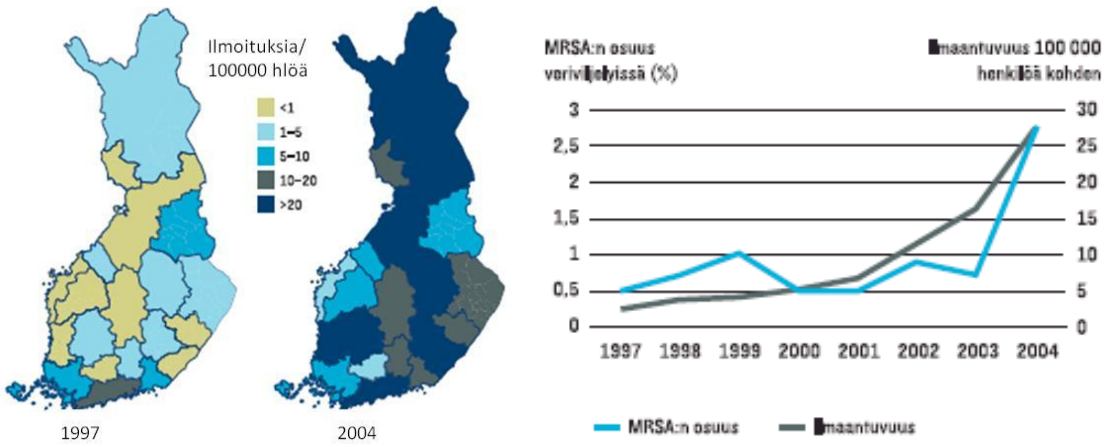
S. aureus aiheuttaa useita toksiinivälitteisiä infektioita. Bakteerin erittämät enterotoksiinit (SE) ovat ruokamyrkytysten taustalla, koska enterotoksiinit eivät tuhoudu kuumennettaessa. Toksisen sokkioireyhtymän (TSS) taustalla on *S. aureuksen* tuottama toksiini TSST-1. TSS:n oireita ovat äkillinen korkea kuume, oksentelu, ripulointi ja lihaskivut, joita seuraa usein verenpaineen lasku. Voimakas verenpaineen lasku voi johtaa sokkiin ja pahimmassa tapauksessa kuolemaan. Siihen saattaa myös liittyä auringonpolttaman kaltainen ihottuma. TSS:ää esiintyy useimmin menstruoivilla naisilla ja se on liitetty liian imukykyisiin tamponeihin. PTSA-ryhmän toksiinien epäillään ainakin osittain olevan myös Kawasakin taudin taustalla. Kawasakin tauti on lasten immunologinen sairaus, joka voi pahimmillaan johtaa kuolemaan sydänlihaksen verisuonivaurioiden vuoksi. Matsubaran tutkimusryhmän (2006) tekemässä tutkimuksessa havaittiin Kawasakin taudissa superantigeenien nostavan IgM-pitoisuuksia. Superantigeenien osuutta myös muihin autoimmuunisairauksiin tutkitaan. Rakkulaisen ja hilseilevän ihottumaoireyhtymän (SSSS) sekä rakkulaisen märkäruven taustalla ovat eksfoliatiiviset toksiinit (ET).

3.1.2 Sairaalainfektiot ja MRSA

Metisilliiniresistentti *S. aureus* (MRSA) on yksi merkittävimmistä sairaalainfektoiden aiheuttajista. MRSA on maailmanlaajuisesti lisääntyvä ongelma. Euroopassa verestä eristettyjen MRSA-kantojen osuus vaihteli vuosina 1999-2002 maiden välillä melkein 100-kertaisesti Pohjois-Euroopan <1 % Etelä- ja Länsi-Euroopan >40 % (Tiemersma ym. 2004). Tilanne on pysynyt samankaltaisena myös vuosina 2005-2007, mutta verestä eristettyjä MRSA-kantoja on raportoitu yhä enemmän (Kuva 6). MRSA:n aiheuttamat sairaalainfektiot ovat lisääntyneet Suomessa 10-kertaisesti vuodesta 1997 vuoteen 2004 (Kerttula ym. 2006). Vuonna 1997 MRSA-tapauksia oli 2,3 tapausta 100 000 henkilöä kohden, kun vastaava luku vuonna 2004 oli 27,9 (Kuva 7). MRSA:n aiheuttamat bakteremiat ovat yleisempiä sairaalahoidon (90,4 %) kuin avohoidon (9,6 %) puolella (Robinson ym. 2009). Cosgroven tutkimusryhmän (2003) tekemän meta-analyysin mukaan MRSA-kantojen aiheuttaamaan bakteremiaan liittyy suurempi kuolleisuus, kuin MSSA-kantojen aiheuttamaan bakteremiaan. Meta-analyysin perusteella oli myös havaittavissa, että bakteremiaa esiintyy enemmän sairaaloissa ja riskitekijöitä ovat keskuslaskimokatetri ja endokardiitti. MRSA:n aiheuttamat endokardiitit ovat autralialaistutkimuksen mukaan useimmiten sairaalaperäisiä ja niihin liittyvä kuolleisuus on jopa 66 % (Rogers ym. 2009).

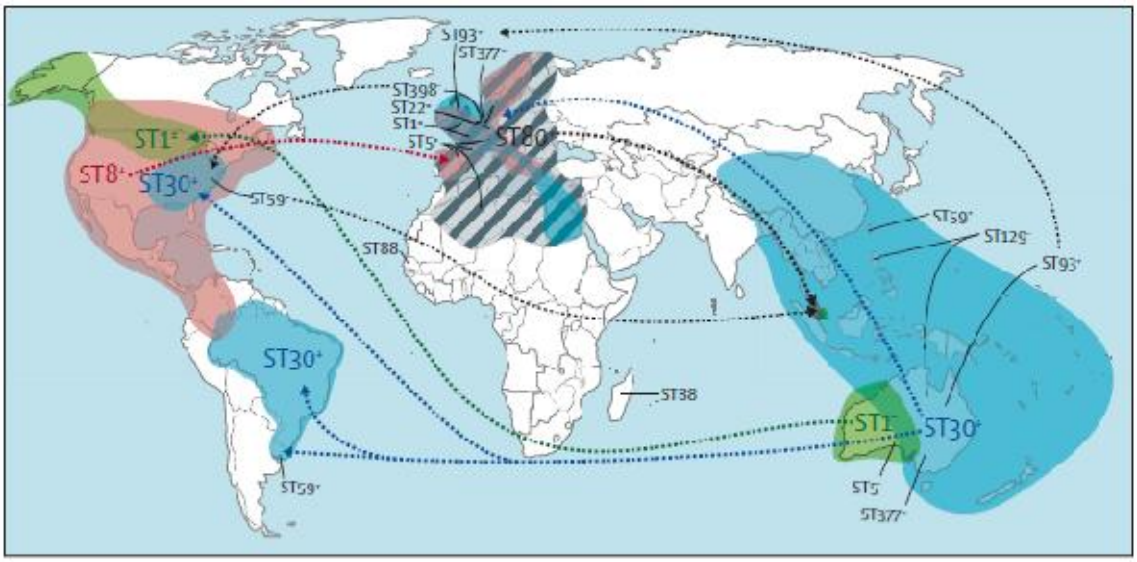


Kuva 6. MRSA-tilanne euroopassa vuosina 2005-2007 (EMEA 2009).



Kuva 7. MRSA-tilanne Suomen sairaanhoitopiireissä vuosina ja MRSA esiintyvyys ja osuus verestä eristetyistä S. aureus –kannoista vuosina 1997 ja 2004 (Kerttula ym. 2006).

MRSA-tartunnat eivät rajoitu enää pelkästään sairaalaympäristöön vaan niitä löytyy myös avohoidon (CA, engl. community-acquired) piiristä. MRSA-kantajilla on Pujolin tutkimusryhmän (1996) tekemän tutkimuksen mukaan 3,9 kertainen riski sairastua *S. aureuksen* aiheuttamaan bakteremiaan MSSA-kantajiin verrattuna. CA-MRSA-infektioita esiintyy enemmän perusterveillä ihmisillä, joilla ei ole taudille altistavia riskitekijöitä, kuten lapsilla ja nuorilla urheilijoilla (Naimi ym. 2003, Yamamoto ym. 2009, DeLeo ym. 2010). Lisäksi CA-MRSA-tapaukset saattavat esiintyä pieninä paikallisina epidemioina perheissä ja pienissä yhteisöissä, mutta kannat ovat levinneet myös eri mantereille. MRSA-kantojen geneettisen taustan perusteella on seurattu kantojen leviämistä (Kuva 8). MRSA ja MSSA -kannoilla on havaittu erilainen pesäkkeiden kolonisaatiokyky (Kaito ym. 2008). MRSA:n kolonisaatiokyky voitiin palauttaa SCC*mec*-deleetiolla. *Fudoh*-geenillä voitiin supressoida bakteerin kolonisaatiokykyä. Tutkimuksessa havaittiin, että CA-MRSA-kannalta puuttui *fudoh*-geeni, jolloin niiden aiheuttamat infektiot olivat vakavampia. CA-MRSA-kannoilla on usein myös erilainen toksiiniprofiili, esimerkiksi PVL-geenit ovat yleisempiä CA-MRSA kannoilla kuin sairaaloissa esiintyvillä MRSA-kannoilla (Naimi ym. 2003).



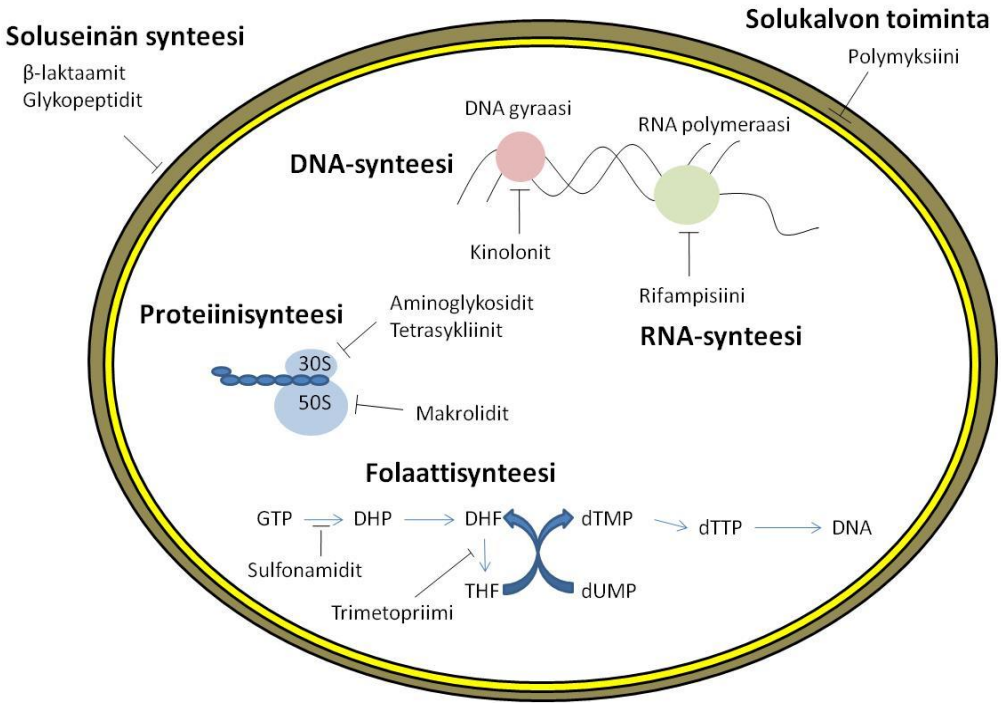
Kuva 8. CA-MRSA:n maailmanlaajuinen esiintyminen ja kantojen oletettu leviäminen (DeLeo ym.2010).

3.2 *S. aureuksen* aiheuttamien infektioiden hoito

Bakteerien aiheuttamien infektioiden hoito perustuu prokaryootti- ja eukaryoottisolujen välisiin eroavaisuuksiin muun muassa soluseinässä, ribosomin rakenteessa ja aineenvaihduntareiteissä. Bakteerilääkkeet voivat olla vaikutukseltaan bakteereita tappavia eli bakterisidisia tai bakteerien lisääntymistä estäviä eli bakteriostaattisia.

S. aureuksen aiheuttamien infektioiden hoidossa ensisijaisia mikrobilääkkeitä ovat olleet bakteerin soluseinäsynteesiin vaikuttavat β-laktaamirakenteiset antibiootit (Kuva 9). Ryhmään kuuluvat esimerkiksi penisilliini, kefalosporiinit, karbapeneemit ja monobaktaamit. Glykopeptidiantibioottien (vankomysiini ja teikoplaniini) vaikutus perustuu myös soluseinäsynteesin estoon ja ne ovat olleet tärkeitä lääkkeitä MRSA-kantojen aiheuttamien infektioiden hoidossa. Muita mikrobilääkkeitä ovat bakteerien proteiinisynteesiin vaikuttavat aminoglykosidit, tetrasykliinit ja makrolidit sekä paikalliseen käyttöön soveltuvat fusidiinihappo ja mupirosiini. Fluorokinolonien vaikutus perustuu puolestaan bakteerin nukleiinihapposynteesin häiritsemiseen. Sulfonamidien ja trimetopriimin vaikutus kohdistuu bakteereille elintärkeän foolihapon synteesiin.

Polymyksiini vauriottaa bakteerin, mutta myös eukaryoottisolujen solukalvoa. Uudempia antimikrobiaineita ovat oksatsolidinonit (linetsolidi), jotka vaikuttavat bakteerien proteiinisynteesiin estämällä 70S-initiaatiokompleksin muodostumista (Vaara ja Saxen 1999). Kinupristiini ja dalfopristiini ovat parenteraaliseen käyttöön tarkoitettuja streptogramiinijohdoksia. Ne sitoutuvat makrolidien tapaan bakteerin ribosomin 50S-alayksikköön ja estävät proteiinisynteesiä. Lääke kuuluu makrolidi-linkosamiini-streptogramiiniryhmään. Daptomysiini on lipopeptidiantibiootti, joka vaikuttaa etenkin grampositiivisten bakteerien solukalvoon. *S. aureuksen* aiheuttamien infektioiden hoitoa vaikeuttaa bakteerin kyky muodostaa resistenttejä kantoja lähes kaikille käytössä oleville bakteerilääkkeille. Moniresistenssistä puhutaan silloin, kun bakteeri on resistentti kolmelle tai useammalle antimikrobiaineryhmälle. Resistenttien kantojen aiheuttamien infektioiden hoidossa joudutaan turvautumaan uusimpien antimikrobiaineiden tai johdosten käyttöön, jolloin riski resistenssin kehittymiselle niitäkin vastaan kasvaa.



Kuva 9. Antimikrobiaineiden vaikutuskohteita.

S. aureuksen erilaiset pintaproteiinit ja muut virulenssitekijät ovat olleet rokotekehityksen kiinnostuksen kohteena. Esimerkiksi *S. aureuksen* kapselipolysakkarideista (tyypit 5 ja 8) ja *Pseudomonas aeruginosan* myrkyttömästä eksotoksiini A:sta tehtyä rokotetta on kokeiltu hemodialyysipotilailla (Shinefield ym. 2002). Rokotteella aikaansaatiin immunisaatio arviolta 57 % potilaista noin 40 viikoksi. Myös pintaproteiini IsdB (iron surface determinant B) mahdollisuuksia rokotteena on tutkittu hiirillä ja reesusapinoilla (Kuklin ym. 2006). Sillä saatiin yli viisinkertainen vasta-ainetuotanto yhdellä immunisaatiolla kontrolliin verrattuna. IsdB-proteiinia ekspressoidaan, kun bakteerilla on pulaa raudasta. Tutkimuksen mukaan sitä esiintyi kaikilla tutkituilla kannoilla. Toistaiseksi *S. aureusta* vastaan ei ole onnistuttu kehittämään tehokasta ja toimivaa rokotetta.

4 RESISTENSSI

S. aureus on hyvin mukautuva patogeeni. Se on kehittänyt resistenttejä kantoja lähes kaikkia käytössä olevia antibiootteja kohtaan. Metisilliinin tultua markkinoille jo vuoden päästä kliinisistä näytteistä eristettiin sille resistenttejä *S. aureus* -kantoja. Erityisen ongelman muodostavat moniresistentit kannat, joilla on vastustuskyky useille mikrobilääkkeille. Resistenssin kehittymisen taustalla on bakteerin perimässä tapahtuva mutaatio, jonka seurauksena:

1) bakteeri tuottaa lääkeainetta hajottavaa entsyymiä,
2) lääkeaineen vaikutuskohteessa tapahtuu muutos tai
3) lääkeaine pumpataan aktiivisesti ulos solusta (effluksipumput).

Mutaatio voi syntyä joko spontaanisti solun jakautumisessa perintöaineksessa tapahtuvien virheiden seurauksen tai hankitusti, jolloin bakteeri vastaanottaa geneettistä materiaalia ympäristöstä. Bakteerien genomi on haploidinen, jolloin spontaanit mutaatiot tulevat helposti näkyviin perintöaineksessa. *S. aureuksella* antibioottiresistenssigeenit ovat plasmideissa ja muissa liikkuvissa geenielementeissä (Kuroda ym. 2001). Monet geenit näyttäisivät olevan horisontaalisesti siirtyneitä. Horisontaalisella siirtymisellä tarkoitetaan muuta kuin suvullista eli genomin jakaantumisen seurauksena tapahtuvaa geneettisen

materiaalin siirtymistä. Horisontaalista siirtymistä voi tapahtua sekä lajin sisäisesti, että lajien välisesti. Horisontaalisia siirtymistapoja ovat transformaatio, transduktio ja konjugaatio. Transformaatiossa bakteeri vastaanottaa geneettistä materiaalia ympäristöstä. Transduktiossa geneettinen materiaali siirtyy bakteriofaagin eli bakteereihin erikoistuneen viruksen välityksellä. Konjugaatiossa geneettinen materiaali siirtyy bakteerien välillä erikoistuneen rakenteen sukupuolipiluksen avulla.

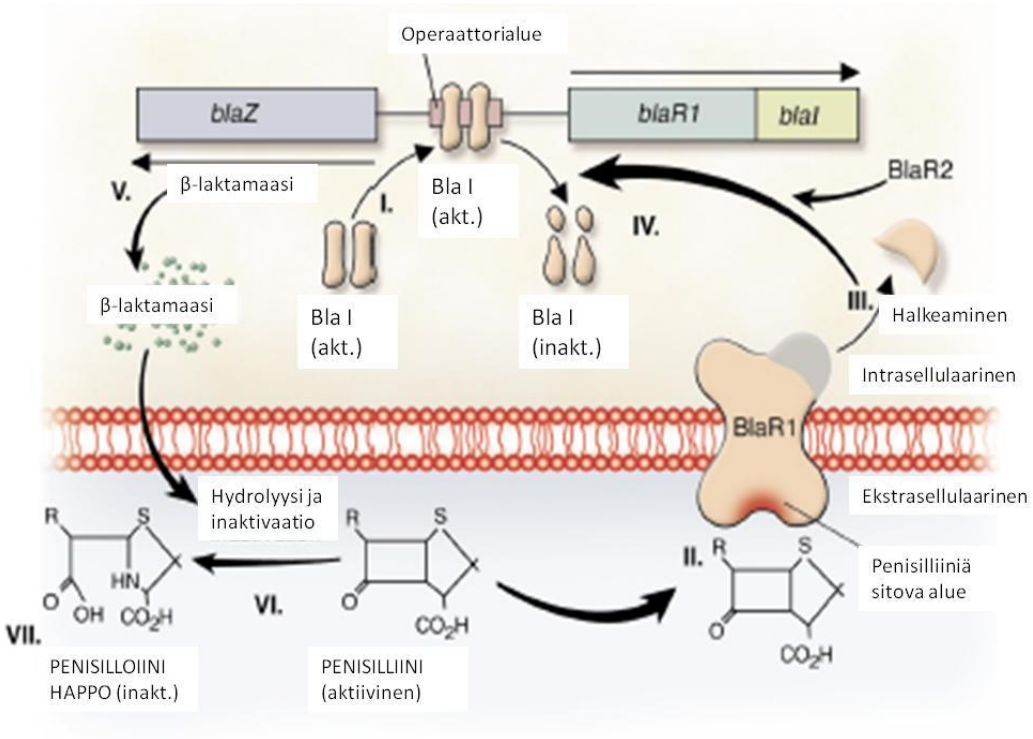
S. aureuksella resistenssigeenit sijaitsevat usein liikkuvissa geenielementeissä, kuten plasmideissa, transposoneissa, insertiojaksoissa ja patogeenisuussaarekkeissa (Kuroda ym. 2001). Tämä johtaa helposti moniresistenssin kehittymiseen. Patogeenisuussaarekkeet ovat geenielementtejä, jotka sisältävät useita virulenssin kannalta merkittäviä geenejä. *S. aureuksella* tärkein patogeenisuussaareke on SCC*mec*-kasettikromosomi (engl. staphylococcal cassette chromosome *mec*).

Resistenssin selvittäminen laboratorio-oloissa tapahtuu antimikrobiaineiden herkkyysmääritysmenetelmillä. Yleisimmin käytettyjä herkkyysmääritysmenetelmiä ovat kiinteäfaasinen agardiffuusiomenetelmä ja liuosfaasiset makro- ja mikrodiluutiomenetelmät. Perusperiaatteena molemmissa menetelmissä on antimikrobiaineesta tehtävä laimennossarja ja tiedetty bakteerimäärä. Antimikrobiaineen bakteerikasvun pienin estävä pitoisuus (MIC, engl. minimal inhibitory concentration) luetaan maljasta tai liuoksesta, jossa bakteerin kasvua ei näkyvästi enää havaita. Antimikrobiaineen MIC-pitoisuuksille on määritetty erilaisia laboratoriostandardeja (esim. NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards), joiden perusteella voidaan arvoida esimerkiksi potilasnäytteestä viljellyn patogeenin tutkittavalle antimikrobiaineelle. MIC-arvojen perusteella bakteeri luokitellaan kuuluvaksi johonkin kolmesta herkkyysluokasta S, I ja R (herkkä, kohtalaisen herkkä, resistentti).

Resistenttien *S. aureus* -kantojen aiheuttamat infektiot ovat yleisempiä sairaalaympäristössä kuin avohoidon puolelle. Sairaalaympäristössä mikrobit altistuvat herkemmin useille antimikrobiaineille ja alhaisten antimikrobiaineiden käyttökonsentraatioiden on todettu edistävän resistenssin kehittymistä (Norström ym. 2007, Mesak ja Davies 2009).

4.1 β-laktaami- ja metisilliiniresistenssi

β-laktaamiresistenssin taustalla on bakteerin tuottama β-laktamaasientsyymi, joka kykenee hajottamaan ryhmän antimikrobiyhdisteissä esiintyvän β-laktaamirenkaan (Kuva 10). Nykyään yli 90 % kliinisesti eristetyistä *S. aureus* -kannoista tuottaa β-laktamaasia (Lowy 2003). β-laktamaasia koodaava geeni löytyy transposaalisesta elementistä (Tn552), mikä löytyy usein plasmidista (Rowland ja Dyke 1990). β-laktamaasiantibioottien on havaittu käynnistävän *S. aureuksen* SOS-vasteen ja virulenssitekijöiden horisontaalisen siirtymisen (Maiques ym. 2006). SOS-vaste on globaali säätelyjärjestelmä, joka aktivoituu DNA-vaurioiden seurauksena. Sen avulla bakteerisolun DNA-vaurioiden sekä soluvaurioiden korjaamiseen tarvittavat geenit aktivoituvat.



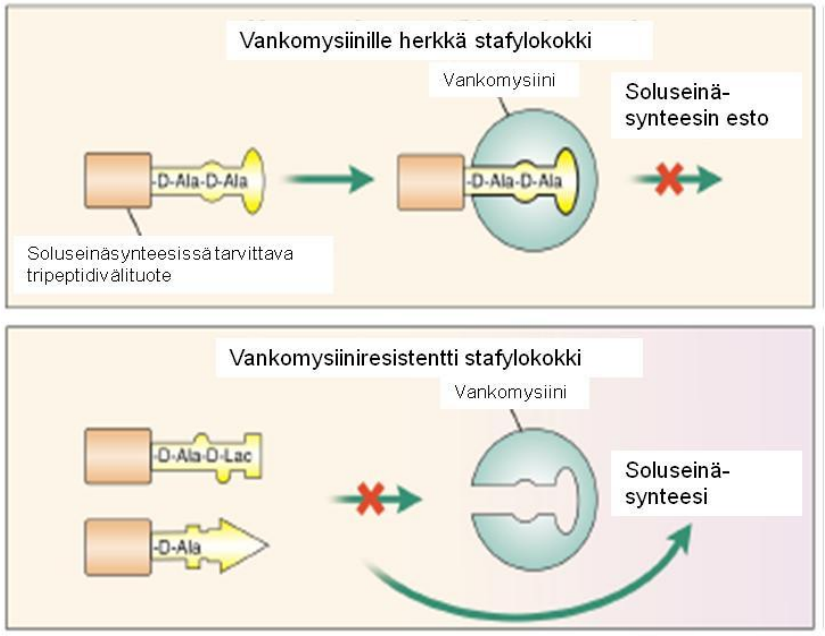
Kuva 10. β-laktamaasisynteesi β-laktaamirakenteisen antibiootin läsnäollessa. DNA:ta sitova proteiini (I) BlaI sitoutuu operaattorialueelle ja estää blaZ, blaR1 ja blaI RNA transkription. Kun penisilliiniä ei ole ympäristössä β-laktamaasia ekspressoidaan vähemmän. Penisilliinin sitoutuminen transmembraaniseen reseptoriin BlaR1 (II) stimuloi BlaR1 autokatalyyttisen aktivaation. Aktivoitunut BlaR1 (III-IV) halkaisee joko suoraan tai epäsuorasti BlaI inaktiiviseksi fragmentiksi -> blaZ ja blaR1-blaI transkriptio alkaa. blaz-geeni (V-VII) koodaa β-laktamaasientsyymiä, joka hydrolysoi β-laktaamirenkaan ja inaktivoi sen (mukaillen Lowy 2003).

β-laktamaasia kestävissä penisilliineissä, kuten kloksasilliinissa, dikloksasilliinissa ja metillisiinissä, sivuketjun rakenne estää entsyymin toiminnan. Metisilliiniresistenssin taustalla on *mecA*-geeni, joka syntetisoi mutatoitunutta muotoa penisilliiniä sitovasta proteiinista (PBP2a, engl. penicillin binding protein, Lowy 2003). PBP on solukalvoon sitoutunut entsyymi, joka katalysoi transpeptidaasireaktiota ja on välttämätön peptidoglykaaniketjujen ristikkäin sitomiselle. PBP2a korvaa muut PB-proteiinit ja sen vähäinen affiniteetti β-laktaamiantibiooteille suojaa bakteeria niiden vaikutuksilta. Metisilliiniresistenssin taustalla oleva *mec*-geeni löytyy SCC*mec*-kasettikromosomista, josta on tähän mennessä löydetty viisi muotoa. Suomessa avohoidon MRSA-kannat kantavat yleisimmin muotoa IV (Karden-Lilja ym. 2007). MRSA-kantojen löytyminen on Tacconellin tutkimusryhmän (2008) tekemässä meta-analyysissa yhdistetty potilaan aikaisemmin saamaan antibioottihoitoon. Antibioottihoitoa saaneilla oli 1,8-kertainen riski MRSA-kannan eristämiseen. Eri antimikrobiyhdisteillä havaittiin erilainen riski MRSA-kannan eristämiseen. Vertailukohtana toimivat potilaat joilta eristettiin MSSA-kanta ja potilaat joilta ei löytynyt ollenkaan *S. aureusta*. Esimerkiksi kinolonihoidolla oli 3-kertainen glykopeptihoidolla 2,9-kertainen, kefalosporiinihoidolla 2,2-kertainen ja muulla β-laktaamihoidolla 1,9-kertainen riski MRSA-kannan eristämiseen myöhemmin.

4.2 Glykopeptidiresistenssi

Glykopeptidiantibioottien käytön lisääntyminen MRSA-kantojen aiheuttamien infektioiden hoidossa johti nopeasti vankomysiiniresistenssin kehittymiseen. Vankomysiinille resistenttejä kantoja on kahdenlaisia vankomysiini-intermediaatille resistentti *S. aureus* (VISA) ja vankomysiiniresistentti *S. aureus* (VRSA, Lowy 2003). Vankomysiiniresistenssin taustalla on geneettisen analyysin perusteella havaittu konjugatiivinen moniresistenssiplasmidi, joka sisältää resistenssin taustalla olevan *vanA*-geenin (Weigel ym. 2003). Vankomysiiniresistenssin taustalla oleva Tn*1546*-plasmidi on geneettisen analyysin perusteella siirtynyt lajien välisesti ko-isolaatilta *Enterococcus*

feacalikselta. Vankomysiiniresistentit kannat tuottavat muuntunutta soluseinäsynteesiin tarvittavaa välituotetta, jolla on heikompi affiniteetti vankomysiiniin (Kuva 11).



Kuva 11. Vankomysiiniresistenssin mekanismi. VRSA-kannat tuottavat muuntunutta soluseinän muodostumiseen tarvittavaa tripeptidiä, jolla on huonompi affiniteetti vankomysiiniin. (mukaillen Lowy 2003).

4.3 Fluorokinoloniresistenssi

Fluorokinoloniresistenssi kehittyy DNA-gyraasia (*gyr*A ja *gyr*B) ja topoisomeraasi IV (*grl*A ja *grl*B) koodaavien geenien asteittaisten mutaatioiden kautta (Projan 2000). Myös effluksipumppujen toimintaan vaikuttavien geenien mutaatioiden on havaittu olevan fluorokinoloniresistenssin taustalla. Mesak ja Davies (2009) tutkivat fluorokinolonien alhaisten käyttökonsetraatioiden vaikutusta resistenssin kehittymiseen. Tutkimuksessa havaittiin matalien siprofloksasiinipitoisuuksien (0,2 ja 0,5 µg/ml) lisäävän mutaatiota antibiootille 3,2 ja 1,6-kertaisesti. Havainto vahvistaa käsitystä antibioottien annosvasteen tärkeydestä resistenttien kantojen ehkäisyssä.

4.4 Aminoglykosidiresistenssi

Resistenssi aminoglykosideille kehittyy useimmiten lääkeaineen entsymaattisen inaktivaation avulla. Aminoglykosideille resistenteillä kannoilla on aminoglykosideja muokkaavia entsyymejä (AME, engl. aminoglycoside modifying enzyme), joita kodaavat kolme geeniä: HLGR-10, HLGR-12 ja MSSA-21 (Chandrakanth ym. 2008). HLGR-10 ja HLGR-12 geenit koodaavat bifunktionaalista geeniä ja kannat ovat hyvin resistenttejä gentamysiinille ja streptomysiinille. MSSA-21 geenin aiheuttama resistenssi on heikompi. Amionoglykosidejä muokkaavat entsyymit ovat peräisin, joko sitä tuottavalta organismilta tai niitä voi syntyä sellulaaristen ylläpitogeenien mutaation kautta. *S. aureuksella* aminoglykosideja muokkaavat entsyymit ovat peräisin muualta. Ne löytyvät usein transposaalisista elementeistä tai plasmideista. Gillespien tutkimusryhmä (1986) on paikallistanut gentamysiini resistenssigeenin Tn*4001*-plasmidiin, joka voi integroitua myös kromosomiin.

Baumertin tutkimusryhmä (2002) tutki geneettisesti muokatun SCV-kannan ja alkuperäisen villityyppikannan herkkyyttä eri antimikrobiaineille. Suurin vaikutus antimikrobisen aktiivisuuden heikentymisessä havaittiin aminoglykosideilla. Aminoglykosideille resistentit SCV-kannat olivat pääasiassa *hemB*-mutantteja. SVC-kannoilla on yleensä puutteellinen elektroninsiirtoketju, jonka seurauksena solukalvon potentiaali on muuttunut Aminoglykosidien vaikutukseen (soluun pääsy) liittyy oleellisesti solukalvon potentiaali.

4.5 Resistenssi muille antimikrobiaineille

Fusidiinihapporesistenssin taustalla on mutaatio translaatioelognaatiotekijä EF-G koodaavassa *fus*A geenissä (FusA-kanta). Mutaation seurauksena fusidiinihapon kiinnittyminen vaikutuskohteeseensa vähenee. Useat fusidiinihapolle resistentit kannat ilmentävät SCV-fenotyyppiä (Norström ym. 2007). FusA-SCV-kannat vaativat kasvaakseen hemiä. Nordtrömin tutkimusryhmä (2007) tunnisti myös toisen fusidiinihapolle resitentin kannan (FusE), jolla on myös SCV-fenotyyppi, mutta kasvuvaatimuksena joko hemi tai menadioni.

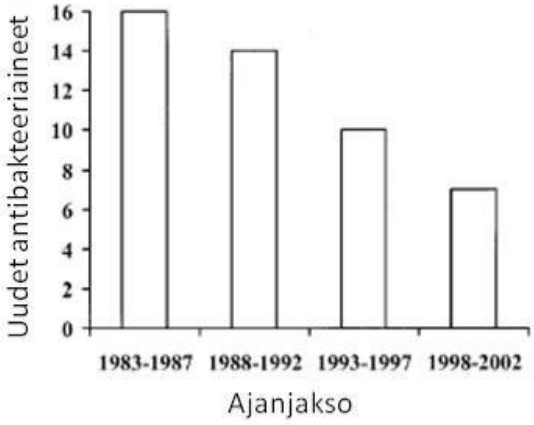
Tetrasykliiniresistenssin taustalla ovat resistanssigeenit *tet*(K), *tet*(L) ja *tet*(M) (Projan 2000). Geenit *tet*(K) ja *tet*(L) koodaavat tetrasykliinieffluksipumppuja. Geeni *tet*(K) löytyy usein plasmidista (pT181). Mutaatio geenissä *tet*(M) aiheuttaa resistenssin kaikille tetrasykliineille. Kloramfenikoliresistenssin taustalla on antibiootin inaktivoiminen kloramfenikoliasetyylitransferaasin avulla (Projan 2000). Resistenssin taustalla on *cat*-geeni, joka esiintyy useissa pienissä plasmideissa (pC194, pC221, pC223 ja pUB112). Sulfonamidiresistenssin taustalla on lisääntynyt *p*-aminobentsoaattituotanto (Landy ym. 1943). Lisääntyneen *p*-aminobentsoaattituotannon taustalla on kromosomaalinen *sul*A-geeni (Projan 2000).

S. aureus on kehittänyt resistenssiä myös uudemmille antimikrobiaineille. Esimerkiksi linetsolidille resistenttejä *S. aureus* -kantoja on raportoitu (Tsiodras ym. 2001). Linetsolidin MIC-arvot olivat herkälle kannalle 2 mg/l ja resistentille kannalle > 32 mg/l. Kaikilta linetsolidille resistenteiltä kannoilta löytyi *mec*A-geeni eli ne olivat myös metisilliiniresistenttejä. Linetsolidiresistentit kannat olivat metisilliinin lisäksi resitenttejä fluorokinoloneille ja tetrasykliineille. Osa kannoista oli resitenttejä myös trimetopriimin ja sulfametoksatsolin yhdistelmälle. Myös kliinisesti eristettyjä daptomysiiniresistenttejä *S. aureus* -kantoja on raportoitu (Marty ym. 2006). *S. aureus* on kehittänyt resistenssin myös kinupristiinille ja dalfopristiinille (Werner ym. 2001).

Moniresistentit kannat määritellään usein kannoiksi, joilla on resistenssiä useammalle kuin kolmelle antimikrobiyhdisteluokalle. Pillarin tutkimusryhmän (2008) tekemässä tutkimuksessa sairaalapotilaista eristettyjen MRSA-kantojen osuus oli 55,7 % ja näistä kannoista moniresitenttejä oli 53,9 %. Avohoidon potilailla MRSA-kantojen osuus oli 48,7 % ja näistä moniresistenttien kantojen osuus oli 30,7%. Moniresistentit kannat ovat yleisempiä sairaala- kuin avohoitopotilailla. Tutkimuksen perusteella on havaittavissa, että moniresistenttien kantojen osuus eristetyistä MRSA-kannoista on merkittävä.

5 UUSIEN BAKTEERILÄÄKKEIDEN KEHITTÄMINEN

Uusien mikrobilääkkeiden kehittäminen on jatkuvaa kilpajuoksua resistenttejä mikrobikantoja vastaan. Lääkeyhtiöt eivät ole kovinkaan kiinnostuneita uusien mikrobilääkkeiden kehittämisestä, koska kehitystyö on kallista eikä uuden antimikrobiaineen elinkaari todennäköisesti tule olemaan kovinkaan pitkä nopean resistenssin kehittymisen vuoksi. Hitaan lääkekehitystyön seurauksena resistenssi antimikrobiaineelle saattaa kehittyä jo ennen kuin se pääsee markkinoille. Geenitutkimuksen myötä uusia vaikutuskohteita luulisi löytyvän helposti, mutta useimmiten uudet yhdisteet ovat vanhojen mikrobilääkkeiden paranneltuja johdoksia. Tämä on yrityksille kannattavampaa kuin uusien vaikutusmekanismien omaavien lääkkeiden kehittäminen. Vuoden 1962 jälkeen kului lähes 40 vuotta ennen kuin markkinoille tuli fluorokinoloniryhmän esittelyn jälkeen uudenlaisen vaikutusmekanismin omaava lääke oksatsolidinoniryhmään kuuluva linetsolidi (Coates ym. 2002). Tällä välillä kaikki markkinoille tulleet uudet antimikrobiaineet olivat vanhojen lääkkeiden paranneltuja johdoksia. Kaiken lisäksi uusille lääkkeille asetettavat viranomaisvaatimukset kovenevat. Lääkkeen valmistukselle, turvallisuudelle ja tehokkuudelle asetetut vaatimukset ovat kasvaneet vuosi vuodelta. Kliiniseen vaiheeseen tarvittavat potilasmäärät ovat kolminkertaistuneet kymmenessä vuodessa (Projan ja Shlaes 2004). Monet suuret lääkeyhtiöt ovat lopettaneet uusien antimikrobiaineiden kehitystyön kannattavuuden heikentyessä. Yhdysvaltojen lääkevalvontaviranomaisten (FDA, Food and Drug Administration) vuosina 1998-2002 hyväksymät uudet antibakteeriaineet vähenivät 56 % verrattuna vuosina 1983-1987 hyväksyttyihin (Kuva 12, Spellberg ym. 2004).



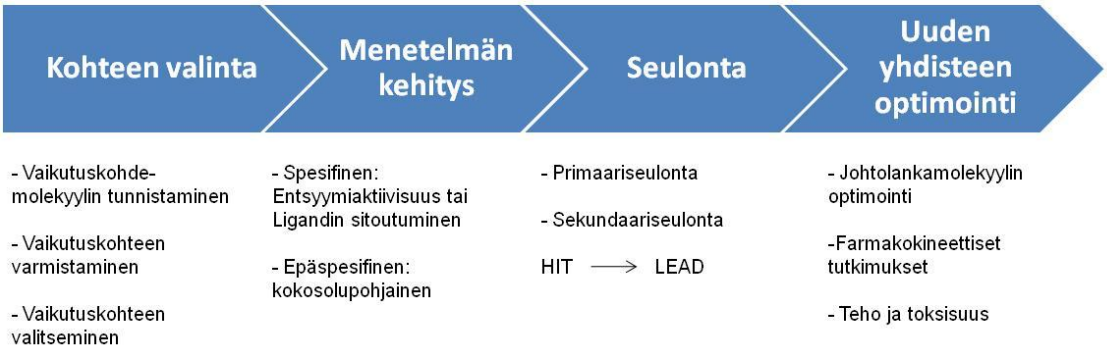
Kuva 12. FDA:n hyväksymien uusien antibakteeriaineiden lukumäärä 1983-2002 (mukaillen Spellberg ym. 2004)

Perinteisesti antimikrobiaineita on etsitty luonnosta. Suuri osa antimikrobisista yhdisteistä onkin mikrobien itsensä tuottamia, kuten *Penicillium chrysogenum* –homesienen tuottama penisilliini tai *Streptomyces griseus* –bakteerin tuottama steptomysiini. Mikrobien tuottamat antibiootit ovat syntyneet eri mikrobilajien välisen kilpailun myötä. Tämän vuoksi nopean resistenssin kehittymisen luoman paineen alla ajateltiin, että resistenssin kehittyminen olisi hitaampaa täysin synteettisille yhdisteille. Resistenssi kehittyi kuitenkin nopeasti myös täysin synteettisille yhdisteille (esimerkkinä fluorokinoloniresistenssin kehittyminen). Resistenssiä vastaan taistelu vaatii täysin uudenlaisia vaikutusmekanismeja omaavien antimikrobiaineiden kehitystä. Uusia vaikutuskohteita voikin tulevaisuudessa olla erilaiset bakteerin virulenssiin vaikuttavat tekijät, kuten MSCRAMM-rakenteiden ja kapselin muodostumisen esto, bakteerien välisen QS-kommukoinnin esto sekä patogeenisille bakteereille ominaisten aineenvaihduntareittien häiritseminen (menakinonibiosynteesi).

Uusien antimikrobiaineiden etsimisessä voidaan käyttää erilaisia strategioita. Lähtökohtana kehityksessä on kemiallisesti monimuotoinen ja laaja yhdistekirjasto. Yhdistekirjaston molekyylejä voidaan seuloa *in silico* valittuun kohdemolekyyliin (RDD, Rational Drug Desig) tai *in vitro* HTS (High throughput screening)-seulontamenetelmillä. Nykypäivänä vaikutuskohteita etsitään mikrobin genomista. Esimerkiksi GlaxoSmithKline tutki 7 vuoden

aikana (1995-2001) yli 300 geenin mahdollisuuksia uuden antimikrobiaineen vaikutuskohteena (Payne ym. 2007). Tutkimusten perusteella löydettiin 160 mikrobille välttämätöntä geeniä. Vaikutuskohteiden löytämisen jälkeen toteutettiin yhteensä 70 HTS-kampanjaa lääkeyhtiön yhdistekirjaston molekyyleilla yksittäisiä vaikutuskohteita, kokonaisia biosynteesireittejä ja kokonaisia soluja vastaan. Vain 16 HTS-kampanjaa tuotti niin sanottuja osumamolekyylejä (hit) ja näistä löytyi vain 5 johtolankamolekyyliä (lead). Tilanne kuvaa hyvin uusien antimikrobiaineiden löytämisen vaikeutta.

Uuden antimikrobiaineen kehitystyö alkaa vaikutuskohteen valinnasta ja päättyy uuden yhdisteen optimoinnin kautta potentiaaliseen lääkeainekandidaattiin (Kuva 13). Alkuvaiheesta selvinneen lääkeainekandidaatin tulee kuitenkin voittaa matkallaan vielä monia esteitä ennen kuin se lopulta pääsee markkinoille. Alkuvaiheen seulontamenetelmien kehittäminen on tärkeää, jotta jo alkuvaiheessa valikoituvat lääkeainekandidaatit olisivat riittävän tehokkaita ja turvallisia selviytyäkseen lääkekehityksen kalleimmasta ja raskaimmasta kliinisestä vaiheesta.



Kuva 13. Uuden antimikrobiaineen kehittämisen alkuvaiheet kaaviokuvana.

Uuden antimikrobiaineen kehitystyö vaatii kokonaisvaltaista strategiaa, joka ottaa huomioon antimikrobiaineen käyttötarkoituksen, todennäköisyyden resistenssin kehittymiselle, kemiallisesti monimuotoisen yhdistekirjaston, luotettavan ja herkän seulontamenetelmän sekä valittujen vaikutuskohteiden ainutlaatuisuuden (Donadio ym. 2002). Tämän vuoksi jo lääkekehityksen alkuvaiheen seulontamenetelmien kehittäminen on

tärkeää, jotta uudet lääkeainekandidaatit olisivat entistä valmiimpia, tehokkaampia ja turvallisempia.

6 YHTEENVETO JA POHDINTA

S. aureus esiintyy yleisesti kommensaalina bakteerina ihmisten iholla ja limakalvoilla. Mikä saa harmittoman bakteerin aiheuttamaan hyvinkin vakavia, joissakin tapauksissa jopa kuolemaan johtavia infektioita? Patogeenin virulenssiin vaikuttavia ja taudinaiheutumisen taustalla olevia tekijöitä on tutkittu paljon, mutta siitä huolimatta ei patogeenin taudinaiheuttamismekanismeja ole onnistuttu perusteellisesti selvittämään. Selkein yhteys taudin ja virulenssitekijän välillä on toksiinivälitteisissä infektioissa, mutta niidenkin osallisuus muihin tauteihin (autoimmuunisairaudet) on vielä selvittämättä. Virulenssiin vaikuttavia tekijöitä on paljon ja kunkin merkitys yksinään saattaa olla hyvinkin pieni. Sopivien virulenssitekijöiden yhdistelmä sekä niiden oikea-aikainen geneettinen säätely yhdistettynä isäntäorganismin puolustusjärjestelmän heikkouksiin on taudin alkamisen ja jatkumisen kannalta tärkeitä tekijöitä (Jarraud ym. 2002, Bronner ym. 2004, Plata ym. 2009).

Patogeenin aiheuttamista infektioista yleisimpiä ovat erilaiset ihoinfektiot. Bakteerin leviäminen verenkiertoon voi kuitenkin johtaa lähes minkä tahansa elimen invasiiviseen infektioon. Tärkeimmässä osassa infektioiden hoidossa ovat bakteerien soluseinäsynteesiin vaikuttavat antibakteeriset aineet. Infektioiden hoitoa on merkittävästi vaikeuttanut patogeenin kyky muodostaa resistenssi lähes kaikille käytössä oleville antimikrobiaineille. Erityisen ongelman muodostavat moniresistentit kannat, jotka ovat resistenttejä kolmelle tai jopa useammalla antimikrobiaineryhmälle. Tärkeimpänä tekijänä resistenssin kehittymisen taustalla on horisontaalinen geenisiirto. Toistaiseksi *S. aureusta* vastaan ei ole onnistuttu kehittämään tehokasta ja toimivaa rokotetta, joten lääkehoito on ainakin vielä merkittävämpi hoitomuoto patogeenin aiheuttamissa infektioissa.

Uusien antimikrobiaineiden kehittämisessä on tapahtunut romahdus. Tätä havainnollistaa hyvin lähes 40 vuoden innovaatioaukko fluorokinoloneista oksatsolidinoneihin. Kaikki väliajalla markkinoille tulleet uudet antimikrobiaineet olivat vanhojen yhdisteiden paranneltuja johdoksia. Resistenssin nopea kehittyminen vaatii kuitenkin yhä uusia vaikutusmekanismeja omaavien lääkeaineiden kehittämistä. Yksi keino uusien antimikrobiaineiden löytämiseen on seulonnassa käytettävien menetelmien kehittäminen. Uusilla menetelmillä saatava informaatiomäärä on suurempi ja uudet yhdisteet ovat entistä tehokkaampia ja turvallisempia jo aikaisemmassa vaiheessa.

KOKEELLINEN OSA

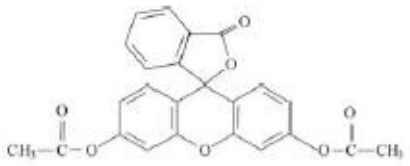
7 TYÖN TARKOITUS JA TAUSTAA

Kokeellisen työn tarkoituksena oli perustaa isäntäsolun ja patogeenin yhteisviljelmämenetelmä sekä tutkia primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneita yhdisteitä kyseisellä menetelmällä. Yhteisviljelmämenetelmä on kuvattu Kleymannin ja Werlingin kirjoittamassa artikkelissa 2004. Kleymannin ja Werlingin kuvaama menetelmä toimi yhteisviljelmämenetelmän perustamisen ja optimoinnin pohjana. Yhteisviljelmämenetelmällä tutkittavat yhdisteet olivat pääasiassa betuliinijohdannaisia. Lisäksi tutkittiin afrikkalaisista kasveista eritettyjä puhdasaineita sekä maaperäuutteita.

Yhteisviljelmämenetelmässä isäntäsolut infektoidaan patogeenillä (Kleymann ja Werling 2004). Menetelmällä simuloidaan luonnollista infektiotilaa. Ilman patogeenin lisääntymistä estävää antimikrobista ainetta patogeeni lisääntyy isäntäsolujen kasvatusmediumissa ja valtaa tilaa ja ravinteita isäntäsolulta, jolloin isäntäsolujen kasvu estyy tai ne kuolevat. Yhteisviljelmämenetelmän avulla voidaan seuloa primaarivaiheessa lupaaviksi osoittautuneita yhdisteitä. Sillä saavutetaan enemmän informaatiota yhdellä testillä kuin perinteisillä primaariseulontaan soveltuvilla antimikrobiaineiden seulontamenetelmillä. Metelemän avulla saadaan samanaikaisesti tietoa sekä tutkittavan yhdisteen antimikrobiominaisuuksista, että sytotoksisuudesta isäntäsolua kohtaan.

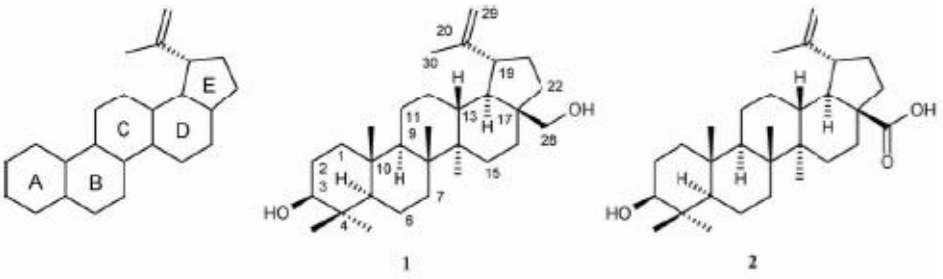
Yhteisviljelmämenetelmä perustuu fluoresenssin intensiteetin (FI) mittaukseen. Fluoresenssiksi kutsutaan tapahtumaa, jossa fluoresoiva yhdiste absorboi fotonin lyhyemmällä aallonpituudella (eksitaatio) ja emittoi sen lyhyen ajan jälkeen pidemmällä aallonpituudella (emissio). Menetelmässä solujen elinkykyä mitattiin fluoreskeiiniasetaatti (FDA, engl. fuorescein diacetate, Kuva 14)-reagenssin avulla. FDA hydrolysoituu solujen epäspesifisen entsyymitoiminnan muun muassa esteraasien, proteaasien ja lipaasien avulla ja ei-fluoresoivasta FDA:sta vapautuu kahden asetaatin hydrolysoituessa fluoresoiva yhdiste. Fluoresenssia voidaan mitata spektrofotometrisesti. Fluoresenssin intensiteetti on

suoraan verrannollinen elinkykyisten solujen määrään. FDA:n ongelmana on sen abioottinen hydrolysoituminen liuoksessa ilman elävien solujen läsnäoloa (Clarke ym. 2001).



Kuva 14. Fluoreskeiinidiasetaatin (FDA) rakenne (Adam ja Duncan 2001)

Betuliini (lup-20(29)-eeni-3β,28-dioli, Kuva 15) on lupaanirunkoinen pentasyklinen triterpeenialkoholi (Alakurtti ym. 2006). Betuliini esiintyy yleisenä komponenttina koivun (*Betula* spp.) kaarnassa ja sitä voidaan kohtuullisen helposti eristää jopa 30 % kaarnan kuivapainosta. Koivun kaarnaa (etenkin tuohi) on käytetty kautta aikojen erilaisten hyötyesineiden valmistuksessa sekä mahlaa juodaan sen maun ja terveysvaikutusten vuoksi.



Kuva 15. Lupaaniranka, betuliini (1) ja betuliinihappo (2) (Alakurtti ym. 2006)

Kokeellinen työ kuului Euroopan Unionin rahoittamaan ForestSpeCs-projektiin (7th Framework Programme). Projektin tarkoituksena on hyödyntää erilaisia puuteollisuuden jäännösmateriaaleja, kuten kaarnaa, bioaktiivisten aineiden, ympäristöystävällisten teollisuuskemikaalien ja polymeerien lähtömateriaalina (ForestSpeCs 2009). Tutkimuksen tarkoituksena on löytää innovatiivisia ja toteuttamiskelpoisia tapoja petrokemiallisten lähtömateriaalien korvaamiseksi. Projektin tarkoituksena on löytää niin korkea-arvoisia

materiaaleja ja valmisteita (farmaseuttiset valmisteet, sienentorjunta- ja kasvisuojelumateriaalit), kuin teknisiä sovellutuksia (adhesiivit, päällysteet, pinta-aktiiviset ja kelatoivat aineet). Yhtenä päätavoitteista on luoda taloudellisesti toteuttamiskelpoisia vaihtoehtoja prosessoidun puun ja turpeen jäännösmateriaalien kokonaiskäytölle.

8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kaikki aseptiikkaa vaativat työvaiheet suoritettiin laminaari-ilmavirtauskaapissa. Työskentelyssä käytettiin suojatakkia, -käsineitä ja suusuojaa. Aseptisessa työskentelyssä käytettävät työvälineet olivat steriloituja ja/tai desinfioitu 70 % etanoliliuoksella. Mueller Hinton (MH)-kasvatusliuosten ja ravintoagarin valmistuksessa käytettiin deionisoitua vettä (Millipore MilliQ). Valmistuksen jälkeen MH-kasvatusliuokset ja ravintoagar autoklavoitiin 120 °C, 20 minuutin ajan. Kasvatusliuosten ja ravintoagarin tarkemmat tiedot löytyvät liitteestä 1. Absorbanssin ja fluoresenssin mittauksiin käytettiin Wallac Victor^2 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer)- sekä Varioskan (Thermo Fisher Scientific)-levylukijoita. Työ suoritettiin pääasiassa 96-kuoppalevyillä. Työssä käytetyt kuoppalevyt olivat perusantibakteerimäärityksessä ja absorbanssin mittauksissa steriilejä Nunclon Delta Surface (Nunc^{TM}) –kuoppalevyjä sekä solutöissä steriilejä mustia View plate -96 TC (PerkinElmer)–kuoppalevyjä.

8.1 Tutkittavat yhdisteet, reagenssit ja antimikrobiset yhdisteet

Betuliinijohdannaiset olivat peräisin professori Jari Yli-Kauhaluoman tutkimusryhmältä farmaseuttisen kemian osastolta sekä Valtion teknillisestä tutkimuskeskuksesta (VTT). Betuliinijohdannaiset ovat betuliinin ja betuliinihapon synteettisiä johdannaisia. Afrikkalaisista kasveista eristetyt puhdasaineet olivat peräisin professori Dulcie Mulhollandilta Surreyn yliopistosta Isosta-Britanniasta. Ne ovat luonnosta peräisin olevia yhdisteitä, jotka on eristetty ja puhdistettu erilaisista afrikkalaisista kasveista. Maaperäuutteet olivat peräisin tohtori Brian Kelleheriltä Dublinin yliopistolta Irlannista. Maaperänäytteet on alun perin kerätty Hampstead-puistosta Dublinista. Uutteet on

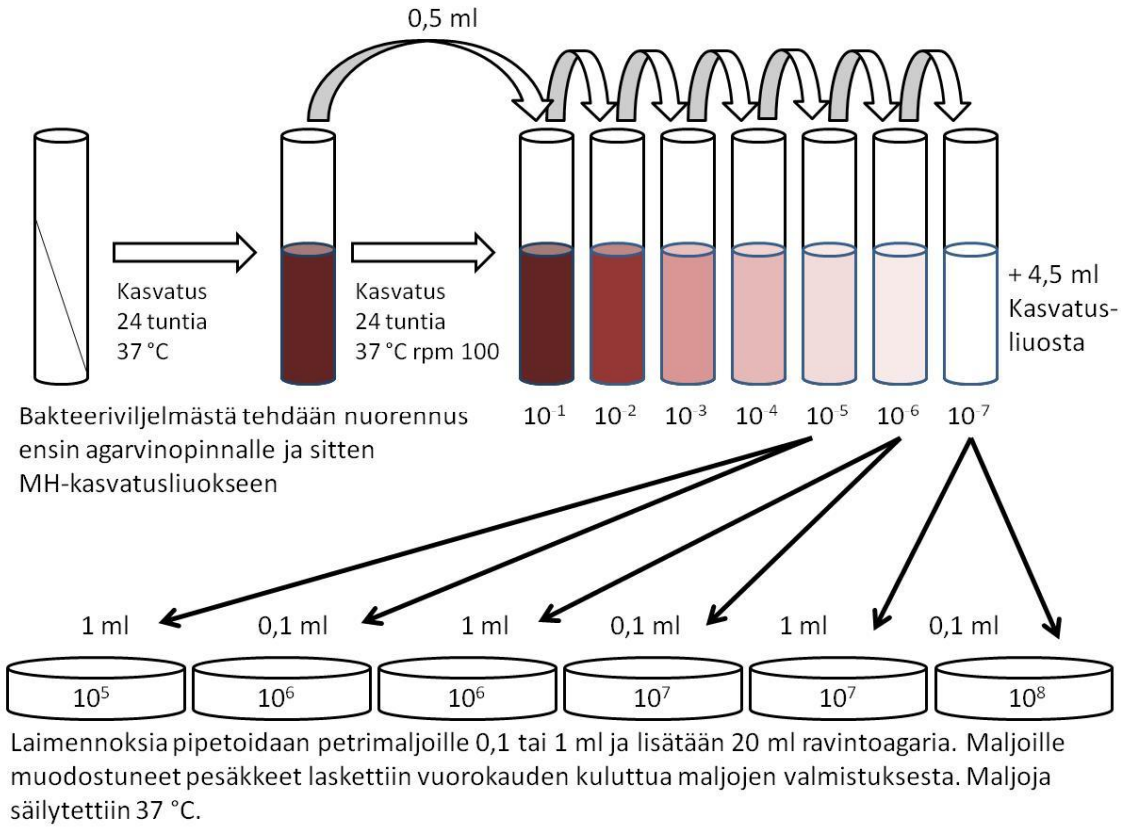
valmistettu maaperän mikrobimassasta, jota on käsitelty ja kasvatettu laboratorio-olosuhteissa. Käsittelyn tarkoituksena on ollut saada mikrobit tuottamaan mielenkiintoisia sekundaarimetaboliitteja, joilla saattaisi olla biologista aktiivisuutta. Muiden reagenssien sekä menetelmän validoinnissa käytettyjen antimikrobiaineiden tarkemmat tiedot on lueteltu liitteessä 2.

8.2 Bakteerikanta ja kasvatusolosuhteet

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) säilytettiin ravintoagarvinopintaviljelmällä jääkaapissa. Viljelmästä tehtiin kerran viikossa nuorennus ravintoagarvinopinnalle, jota inkuboitiin 37 °C yön yli. HL-solujen infektointia sekä pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (PMY) -määrityksiä varten bakteereja siirrostettiin siirrostussilmukallinen Müeller Hinton (MH)-kasvatusliemeen, jota inkuboitiin 4-24 tuntia 37 °C ravistelussa (rpm 100). Inkuboinnin jälkeen MH-bakteerisuspensiosta mitattiin absorbanssi Victor^2 Multilabel Counter -levylukijalla aallonpituudella 620 nm. Absorbanssien keskiarvon perusteella laskettiin bakteerikonsentraatio alkuperäisessä suspensiossa hyödyntämällä maljalaskennan avulla määritettyä korrelaatiota absorbanssin ja pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrän välillä.

8.3 Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrän määrittäminen

Bakteerisuspensiokonsentraation määrittämiseksi tehtiin pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrän selvitys (PMY, Kuva 16). *S. aureus*-viljelmästä tehtiin nuorennos MH-kasvatusliemeen, jota kasvatettiin 37 °C ravistelussa (rpm 100) 4-24 tuntia. 4-24 tuntia kasvatetusta MH-bakteerisuspensiosta tehtiin kymmenkertaiset laimennokset 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ja 10^{-7}. Kolmesta laimeimmasta laimennoksesta (10^{-5}, 10^{-6} ja 10^{-7}) pipetoitiin 0,1 ja 1 millilitra petrimaljalle ja päälle lisättiin 20 millilitraa sulatettua ja stabiloitua (45 °C) ravintoagaria. Maljoille muodostuneet pesäkkeet laskettiin noin vuorokauden jälkeen maljojen valmistuksesta seuraavalla kaavalla: PMY/malja * laimennuskerroin = PMY/ml. Yhden pesäkkeen katsottiin vastaavan yhtä bakteeria.



Kuva 16. PMY-määritysmenetelmä kaaviokuvana.

8.4 Yhteisviljelmämenetelmässä käytetty solulinja ja kasvatusolosuhteet

Työssä käytetty solulinja oli HL (Human Lung) -solulinja. Se on epäspesifinen ja adhesiivinen solulinja, joka on alunperin eristetty ihmisen keuhkokudoksesta. Solujen kasvatusliuoksena käytettiin RN-mediumia, jonka tarkempi koostumus on esitelty liitteessä 3. Solujen pesuun käytettiin fosfaattipuskuriliuosta (PBS, engl. phosphate buffered saline, Biowhittaker) ja irrotukseen 0,25 % trypsiini-PBS-liuosta, joiden tarkemmat tiedot löytyvät liitteestä 3. Solut siirrostettiin uuteen kasvatuspulloon jakosuhteella 1:5 kaksi kertaa viikossa. Siirrostusten välillä HL-soluja kasvatettiin suodatinkorkillisessa kudosviljelypullossa (Cellstar® Tissue culture flask Greiner Bio-one 658175) 37 asteessa ja 5 % CO_2-pitoisuudessa.

8.5 Infektointi

Infektoinnin optimoinnin jälkeen infektoinnissa päädyttiin käyttämään seuraavia olosuhteita: HL-soluja siirrostettiin 96-kuoppalevylle (40000 solua/kuoppa) ja kuoppalevyä inkuboitiin yön yli (37 °C, 5 % CO_2). Inkuboinnin jälkeen HL-solut infektoitiin 2000 pesäkettä muodostavalla yksiköllä (PMY). MOI (engl. Multiplicity of infection) -arvo kertoo bakteerimäärän (PMY) suhteessa isäntäsolujen määrään. Infektoinnin MOI-arvo 0,05 on laskettu kuoppalevylle istutettujen solujen perusteella, eikä siinä ole huomioitu solujen lisääntymistä yön yli kasvatuksen aikana, joten todellinen MOI-arvo on pienempi. Infektoinnissa käytetyt bakteerisuspensiolaimennokset tehtiin antibiootittomaan RN-mediumiin. Infektoinnin yhteydessä lisättiin myös RN-mediumiin liuotetut tutkittavat yhdisteet. Infektoinnin jälkeen bakteeri- ja isäntäsolut saivat kasvaa yhteisviljelmässä kolme päivää (37 °C, 5 % CO_2).

8.6 Isäntäsolujen elinkyvyn mittaaminen

Kolmen päivän kasvatuksen jälkeen (37 °C, 5 % CO_2) HL-solujen elinkyky määritettiin fluoresenssin intensiteetin (FI) mittauksella. Solujen elinkyvyn mittauksessa käytetty reagenssi oli FDA. FDA liuotettiin ensin dimetyylisulfoksidiin (DMSO) ja tätä kantaliuosta (5 mg/ml) laimennettiin PBS-liuokseen niin että lopullinen FDA-konsentraatio liuoksessa oli 10 µg/ml. DMSO-konsentraatio reagenssiliuoksessa oli 0,2 %. FDA-PBS-reagenssi valmistettiin juuri ennen solujen elinkyvyn mittausta FDA:n abioottisen hydrolysoitumisen minimoimiseksi. Reagenssiseosta ei lämmitetty vesihauteessa, vaan se lisättiin kuoppalevylle huoneenlämpöisenä. Kuoppalevyn kuopat pestiin ensin 200 µl 37-asteista PBS-liuosta, jonka jälkeen lisättiin 200 µl reagenssia (FDA-PBS 10 µg/ml). Kuoppalevyn annettiin olla 45 minuuttia huoneenlämmössä foliolla suojattuna, jonka jälkeen mitattiin fluoresenssi Victor^2 Multilabel Counter–levylukijalla (eksitaatio 485 nm ja emissio 538 nm).

8.7 Yhteisviljelmämenetelmän optimointi

Yhteisviljelmämenetelmässä optimoitiin kuoppalevylle istutettavien solujen määrä testaamalla kuoppalevyllä viisi eri solukonsentraatiota (5000-60000 solua/kuoppa). Seuraavaksi optimoitiin infektoinnissa käytetty bakteerikonsentraatio testaamalla neljä bakteerikonsentraatiota (MOI 0,005-0,05). Tutkittavat yhdisteet liuotettiin dimetyylisulfoksidiin (DMSO), joten infektoiduille soluille tehtiin DMSO-altistuskoe. DMSO-altistuksessa testattiin infektoitujen solujen DMSO-sieto kahdeksalla eri DMSO-konsentraatiolla (0-4%). Seuraavaksi tutkittiin tulosten kuoppalevyn sisäinen vaihtelu ja menetelmän toistettavuus kontrollina käytetyllä antimikrobiaineella.

8.8 Yhteisviljelmämenetelmän validointi

Yhteisviljelmämenetelmän validointi suoritettiin tunnettujen antimikrobisten yhdisteiden avulla. Validointia varten kuiva-aine punnittiin ja liuotettiin kullekin antibiootille sopivaan liuottimeen (steriili vesi, 96 % etanoli tai NaOH), jota käytettiin samana pitoisuutena myös maksimi- ja minimikuoppien kasvatusmediumissa. Kantaliuoksesta valmistettiin 4-kertainen laimennossarja. Kuoppalevyllä oli kustakin antimikrobisesta yhdisteestä kahdeksan konsentraatiota, joista kustakin kolme rinnakkaista määritystä. Antimikrobisten yhdisteiden konsentraatioskaala valittiin pääosin NCCLS (National Committee on Clinical Laboratory Standards) -laboratoriostandardien mukaisten *S. aureukselle* (ATCC 29213) annettujen MIC (engl. Minimal inhibitory concentration) -arvojen perusteella (Lorian 2005). Osalle antimikrobiyhdisteistä MIC-arvo jouduttiin etsimään muusta kirjallisuudesta, koska menetelmän validoinnissa haluttiin testata myös epätyypillisempiä antimikrobiyhdisteitä (Sabath ym. 1976).

8.9 Antimikrobisen vaikutuksen primaariseulonta

Tutkittavien yhdisteiden primaariseulonnassa käytettiin turbidimetrista menetelmää. Perusantibakteerimääritystä varten *S. aureusta* siirrostettiin ensin ravintoagarvinopinnalle ja viljelmää kasvatettiin 37 asteessa yön yli. Agarvinopinta-nuorennoksesta siirrostettiin edelleen silmukallinen MH-kasvatusliemeen ja tätä suspensioviljelmää kasvatettiin yön yli 37 asteessa ravistelussa (rpm 100). Yön yli kasvatetusta MH-bakteerisuspensiosta mitattiin absorbanssi Victor^2 Multilabel Counter -levylukijalla aallonpituudella 620 nm. Absorbanssin perusteella laskettiin bakteerikonsentraatio alkuperäisessä bakteerisuspensiossa, jonka perusteella tehtiin laimennos (10^6 PMY/ml). Aloitushetkellä bakteerikonsentraatio kuoppalevyllä oli 500 000 PMY/ml (50 000 PMY/kuoppa). Tutkittavista näytteistä tehtiin laimennokset 10 mM kantaliuoksesta MH(II)-kasvatusliemeen (100 µM; DMSO-pitoisuus 1 %). Kuoppalevyllä tutkittavien yhdisteiden pitoisuus oli 50 µM ja kustakin tutkittavasta yhdisteestä tehtiin kolme rinnakkaista määritystä. Kontrolliantibioottina oli siprofloksasiini pitoisuudella 0,5 µg/ml. DMSO-konsentraatio oli kaikissa kuopissa 0,5 %. Absorbanssin mittaus tehtiin ajanhetkillä 0, 4 ja 24 tuntia. Mittausten välillä kuoppalevyä pidettiin ravistelijassa (37 °C, rpm 100).

8.10 Sekundaariseulonta yhteisviljelmämenetelmällä

Primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet seulottiin sekundaariseulonnassa yhteisviljelmämenetelmällä. Seulottavista yhdisteistä tehtiin 20 mM kantaliuos, josta laimennettiin 4-kertainen laimennossarja dimetyylisulfoksidiin. Osa yhdisteistä jouduttiin laimentamaan huonon liuokoisuuden vuoksi 10 mM kantaliuokseksi dimetyylisulfoksidiin ja siitä tehtiin 4-kertainen laimennossarja. Tutkittujen yhdisteiden antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* kohtaan sekä sytotoksisuus isäntäsolua (HL) kohtaan määritettiin annosvastemäärityksenä. Kuoppalevyllä yhdisteistä testatut pitoisuudet olivat 100; 25; 6,25; 1,563; 0,391; 0,098; 0,024 µM tai huonoliukoisemmilla yhdisteillä 50; 12,5; 3,125; 0,7815; 0,1955; 0,049; 0,012 µM. DMSO-laimennoksista tehtiin edelleen laimennokset antibiootittomaan RN-mediumiin niin, että lopullinen DMSO-konsentraatio kuopassa oli

0,5 %. Tutkittavista yhdisteistä oli kuoppalevyllä kustakin konsentraatiosta kolme rinnakkaista määritystä.

8.11 Tulosten käsittely

Menetelmän optimoinnin apuna käytettiin tilastollisia parametrejä signaali-taustasuhdetta (S/B), signaali-kohinasuhdetta (S/N) ja Z´-tekijää. Tulosten käsittelyssä reunakuopat on jätetty pois laskuista mahdollisten reunavaikutusten vuoksi. Tulosten käsittelyssä käytetyt laskutoimitukset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Tulosten käsittelyssä käytetyt laskutoimitukset, F=fluoresenssi, T=Tutkittava yhdiste, BK=Bakteerikontrolli, SK=Solukontrolli, ABS=absorbanssi, σ=keskihajonta ja μ=keskiarvo.

Antimikrobinen aktiivisuus yhteisviljelmämenetelmässä	$\frac{F_T - F_{BK}}{F_{SK} - F_{BK}} \times 100\,\%$
Antimikrobinen aktiivisuus turbidimetrisessa menetelmässä	$100 - \frac{ABS_{T\ 24\ h} - ABS_{T\ 0\ h}}{ABS_{max\ 24\ h} - ABS_{max\ 0\ h}} \times 100\,\%$
Z´-tekijä	$Z' = 1 - \frac{3\sigma_{kontrolli+} + 3\sigma_{kontrolli-}}{\mu_{kontrolli+} - \mu_{kontrolli-}}$
Signaali-kohinasuhde	$S/N = \frac{\mu_{max} - \mu_{tausta}}{\sqrt{\sigma^2_{max} + \sigma^2_{tausta}}}$
Signaali-taustasuhde	$S/B = \frac{\mu_{max}}{\mu_{tausta}}$

Yhteisviljelmämenetelmällä tutkittujen yhdisteiden pienin bakteerikasvua estävä pitoisuus (MIC, engl. minimal inhibitory concentration) tulkittiin tulosten perusteella konsentraatioksi, joka esti bakteerin kasvua vähintään 80 %. IC_{50}-arvolla (engl. inhibitory

concentration 50) tarkoitetaan tutkittavan yhdisteen pitoisuutta, jolla saadaan estettyä puolet (50 %) bakteerin kasvusta. IC_{50}-arvot määritettiin sovittamalla annosvastemääritysten tulokset sigmoidaaliseen kuvaajaan Origin 7.5 (OriginLab Corporation)-ohjelmaa käyttäen. CC_{50}-arvolla (engl. cytotoxicity concentration 50) tarkoitetaan yhdisteen pitoisuutta, jolla se tappaa puolet isäntäsoluista. Selektiivisyys indeksi (SI, engl. selectivity index) lasketaan IC_{50} ja CC_{50}-arvojen perusteella ja se kertoo yhdisteen selektiivisyydestä bakteeri ja nisäkässoluja kohtaan (CC_{50}/IC_{50}).

9 TULOKSET JA POHDINTA

9.1 Menetelmän optimointi

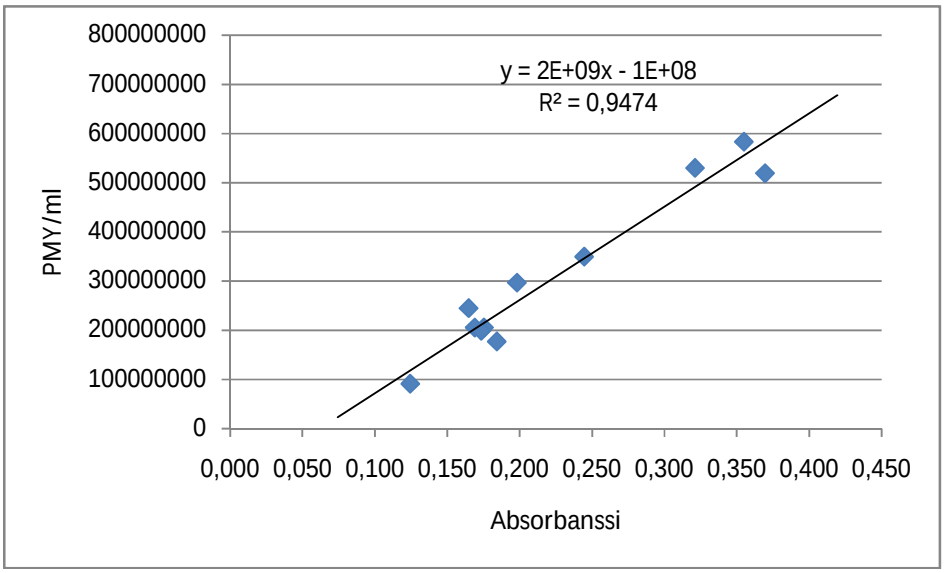
Menetelmän optimoinnin apuna käytettiin tilastollisia parametreja Z´-tekijää, sekä S/B- ja S/N-arvoja. Z´-tekijä huomioi menetelmän signaalin dynaamisen vaihtelualueen sekä näytteen ja kontrollin vaihteluvälin (Zhang ym. 1999). Z´-tekijän avulla voidaan arvioida menetelmän laatua (Taulukko 4). Se lasketaan kontrolliaineiston perusteella. S/N-arvo eli signaalikohinasuhde kertoo maksimisignaalin erottumisesta taustaan nähden. S/N-arvossa huomioon otetaan myös maksimisignaalin ja taustan keskihajonnat, jolloin se kuvaa paremmin signaalin erottumisen taustasta kuin S/B-arvo eli signaalitaustasuhde, jossa signaalin ja taustan keskihajonnat jätetään huomiotta.

Taulukko 4. Z-tekijä (mukaillen Zhang ym. 1999).

Z-tekijän arvo	Menetelmän rakenne	Seulonnan laatu
1	Keskihajonta = 0 (ei hajontaa) tai dynaaminen vaihteluväli → ∞	Ideaali menetelmä
1 > Z ≥ 0,5	Erotusvyöhyke on suuri	Erinomainen menetelmä
0,5 > Z > 0	Erotusvyöhyke on pieni	Kohtalainen menetelmä
0	Ei erottumista, näytteen ja kontrollin hajonnat kosketuksissa toisiinsa	Kyllä/ei tyyppinen menetelmä
< 0	Ei erottumista, näytteen ja kontrollin hajonnat päällekkäin	Seulonta käytännössä mahdotonta

9.1.1 Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä

Maljalaskennassa käytetyistä bakteerisuspensiolaimennoksista mitattu absorbanssi (spektri/620nm) ei eronnut taustasta, joten absorbanssi mitattiin alkuperäisestä 4-24 tuntia kasvatetusta MH-bakteerisuspensiosta. PMY-määritysten perusteella saatiin standardisuoran yhtälö (Kuva 17), jonka avulla laskettiin pitoisuus infektoinnissa käytetyssä 4 tuntia kasvatetussa MH-bakteerisuspensiossa. Suoran korrelaatiokerroin oli noin 0,95. Ravinnepitoisuuden havaittiin vaikuttavan *S. aureuksen* kasvuun oleellisesti. Laimennoksissa ensin käytetyn PBS-liuoksen vaihto RN-mediumiin lisäsi maljan PMY-määrän noin puolella. Tämän perusteella PMY-määrityksissä käytettiin jatkossa RN-mediumia.

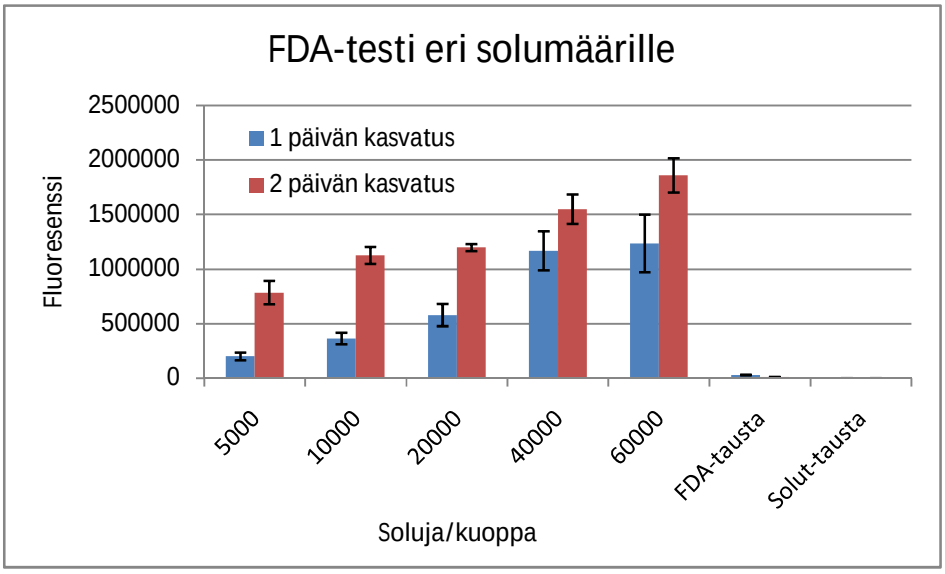


Kuva 17. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (PMY) määritykset laimennoksissa antibiootiton RN-medium, absorbanssin mittaus Victor^2 Multilabel Counter aallonpituudella 620 nm.

9.1.2 Solumäärä

HL-soluja siirrostettiin kuoppalevylle eri konsentraatiossa ja solujen elinkyky mitattiin FDA-testillä yhden ja kahden päivän kasvatuksen jälkeen. Testattavat solumäärät olivat

5000, 10000, 20000, 40000 ja 60000 solua/kuoppa. Kaikilla solumäärillä saatiin suhteellisen hyvä erottuvuus taustaan nähden (Kuva 18). Soluilla ei ollut juurikaan taustafluoresenssia. Myöskään FDA:n abioottinen hydrolysoituminen liuoksessa ei häirinnyt signaalin erottumista. Fluoresenssin intensiteetti on suoraan verrannollinen solumäärään, mikä on havaittavissa hyvin testin perusteella (Kuva 18).

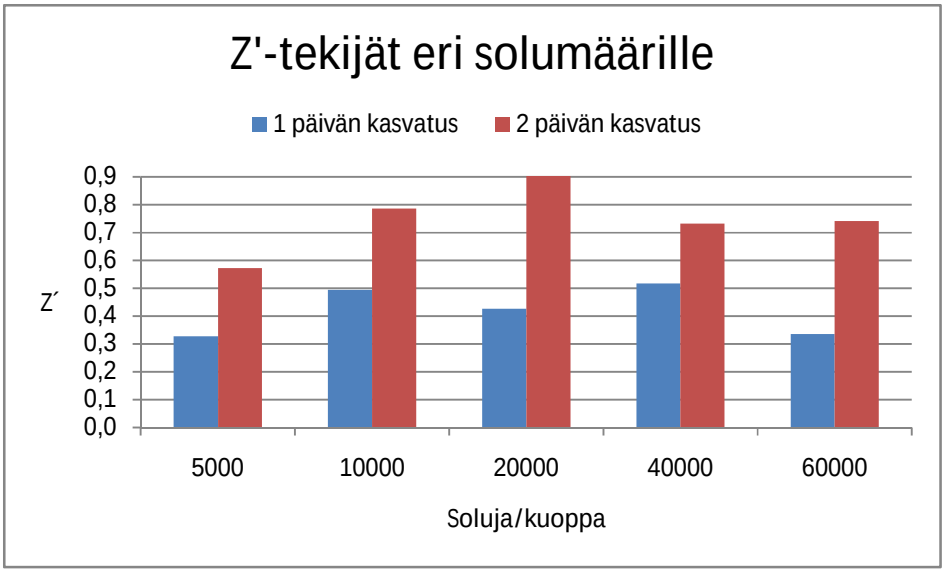


Kuva 18. Solujen elinkykyä mittaava FDA-testi eri solumäärille yhden ja kahden päivän kasvatuksen jälkeen.

Pitkän kasvatusajanjakson vuoksi tulee ottaa huomioon myös kuopan rajallinen kasvutila ja ravinteiden riittävyys. Mikroskoopilla tarkasteltaessa pienemmillä solukonsentraatiolla (5000, 10000 ja 20000) yhden päivän kasvatuksen jälkeen kuopassa oli vielä runsaasti kasvutilaa. Suuremmilla solukonsentraatioilla (40000 ja 60000 solua/kuoppa) kasvutilaa oli huomattavasti vähemmän. Suurimmalla solukonsentraatiolla kuolleiden solujen määrä kuopassa lisääntyi kasvatusajanjakson pidentyessä, mikä viittaa kasvutilan rajallisuuteen ja ravinteiden puutteeseen.

Testin Z'-tekijöiden perusteella yhden päivän kasvatus ei riitä riittävän erottumisen takaamiseksi, mutta kahden päivän kasvatuksella saadaan hyvä erottuminen taustaan nähden kaikilla solumäärillä (Kuva 19). Eri solumäärille tehdyn FDA-testin (Kuva 18)

perusteella on selvästi havaittavissa, että keskihajonnan lisääntyminen vaikuttaa menetelmän Z´-tekijään alentavasti (Kuva 19).

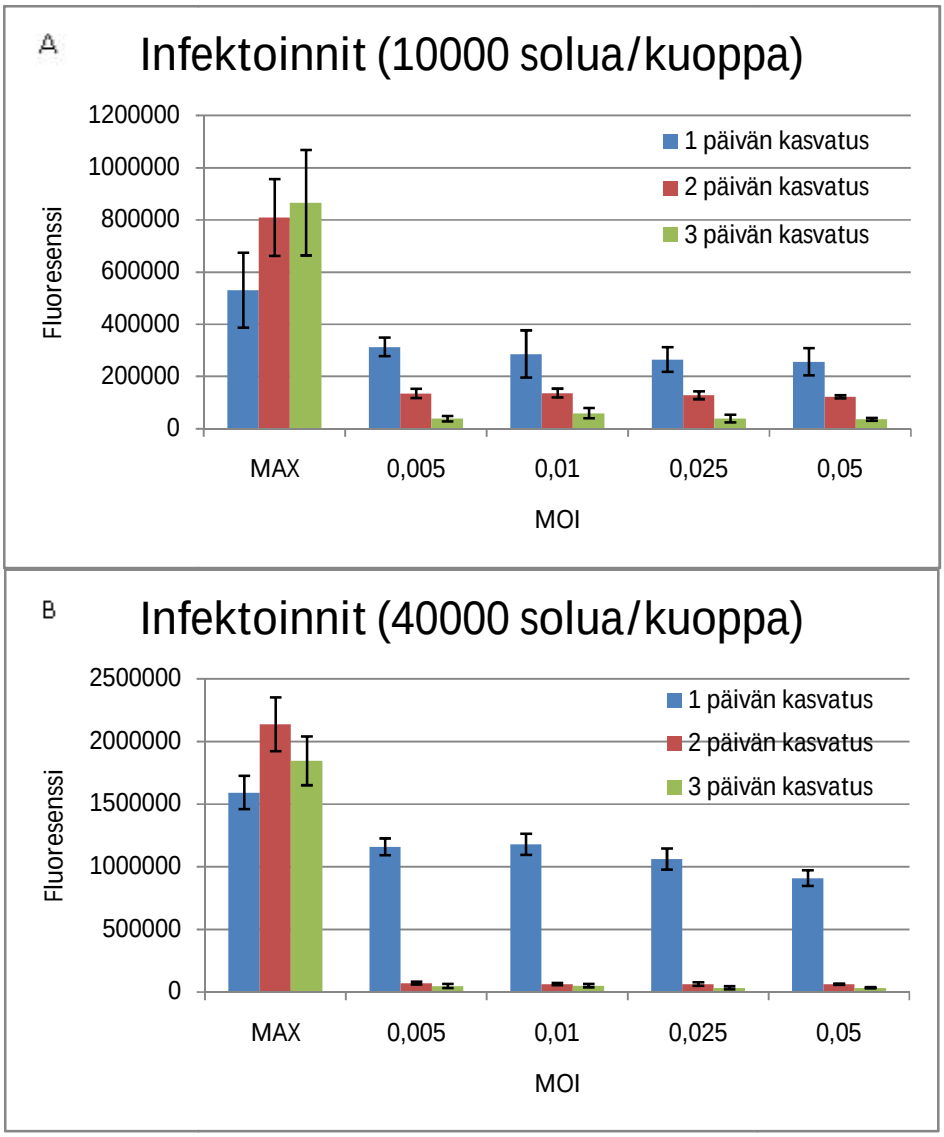


Kuva 19. Menetelmän Z´-arvot eri solumäärille (taustana pelkän reagenssin antama fluoresenssi).

Kaikilla solumäärillä saatiin kahden päivän kasvatuksen jälkeen kohtuullisen hyvä erottuminen taustaan nähden. Tämän testin perusteella ei voitu vielä päättää lopullista solumäärää, vaan infektoinnin optimointia jatkettiin käyttäen kahta solumäärää 10000 ja 40000 solua/kuoppa.

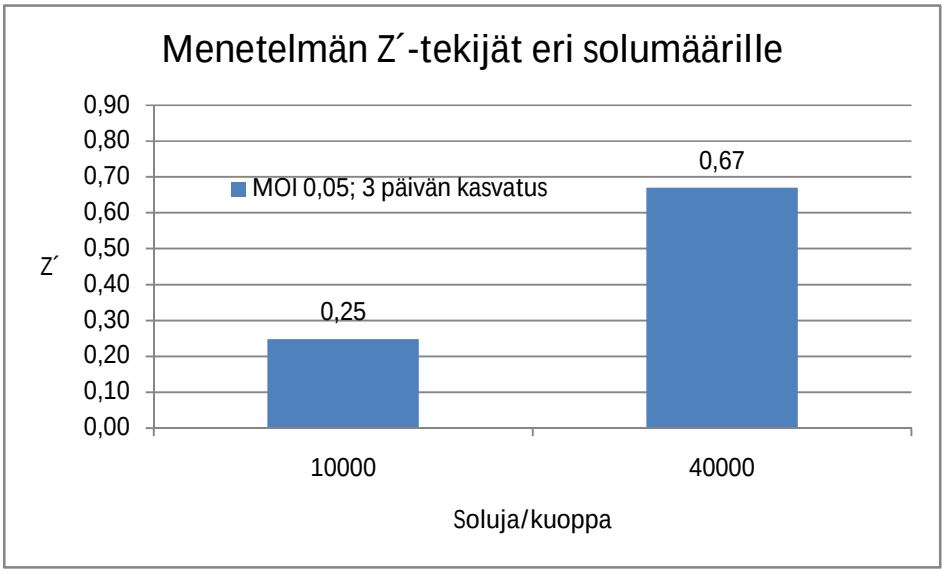
9.1.3 Solujen infektointi

Solujen infektoinnin optimointivaiheessa HL-solut siirrostettiin kuoppalevylle kahtena eri konsentraationa (10000 ja 40000 solua/kuoppa) ja kuoppalevyä kasvatettiin yön yli (37 °C, 5 % CO_2). Solujen infektointi optimoitiin testaamalla eri bakteerikonsentraatioita (MOI 0,005-0,05) eri kasvatusajanjaksoilla (Kuva 20).



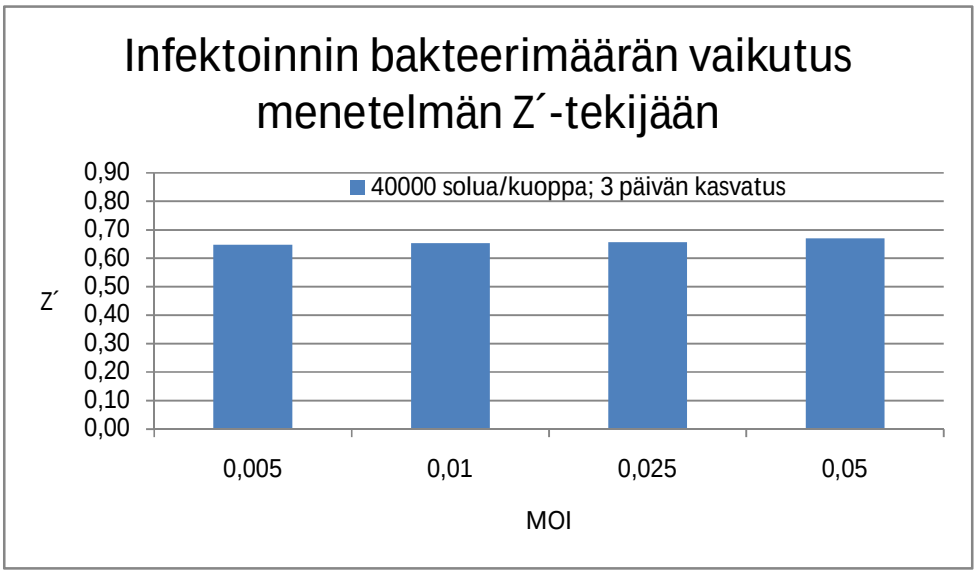
Kuva 20. FDA-testi HL-solujen eri infektointien jälkeen A (10 000 solua/kuoppa) ja B (40 000 solua/kuoppa) eri bakteerikonsentraatioilla (MOI=0,005-0,05), MAX = ei infektoitu näyte.

Pelkille soluille tehdyn FDA-testin perusteella kuoppalevyllä käytettävää solumäärää ei pystytty vielä valitsemaan, mutta infektoinnin tulosten perusteella suuremmalla solumäärällä (40000 solua/kuoppa) saadaan huomattavasti parempi erottuminen taustaan nähden. Solumääräksi valittiin 40000 solua/kuoppa, suuremman Z´-arvon vuoksi (Kuva 21).



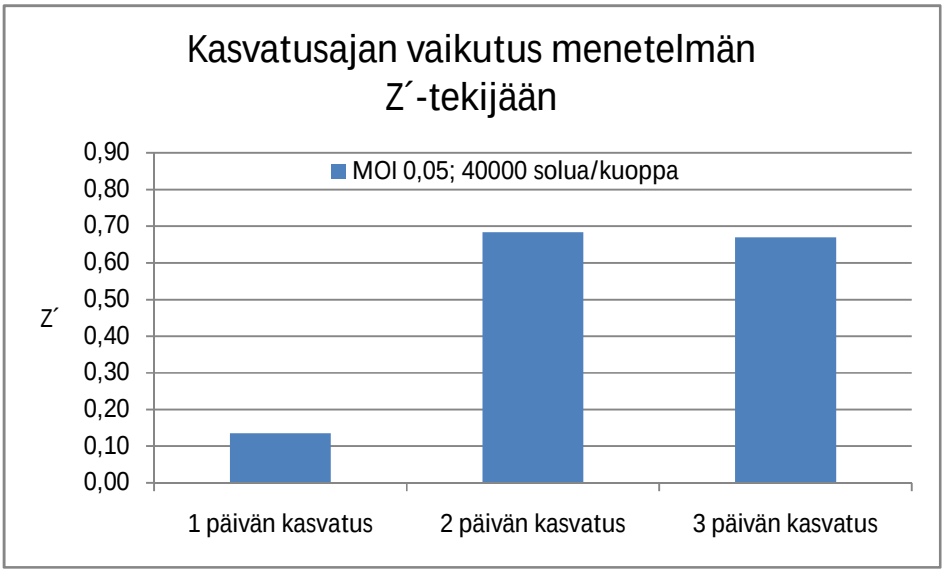
Kuva 21. Z´-tekijät eri solumäärille.

Bakteerikonsentraation vaikutus infektiotapahtumaan testattiin laimentamalla 4 tuntia kasvatettu MH-bakteerisuspensio eri pitoisuuksiin. Kokeessa käytetyt pitoisuudet olivat MOI 0,005; 0,01; 0,025 ja 0,05. Testin perusteella infektoinnin MOI-arvolla ei ollut merkittävää vaikutusta testin tuloksiin (Kuva 22). Infektoinnin MOI-arvoksi valittiin 0,05 infektoitujen kuoppien paremman erottumisen takaamiseksi (Kuva 21).



Kuva 22. Bakteerikonsentraation vaikutus menetelmän Z´-tekijään.

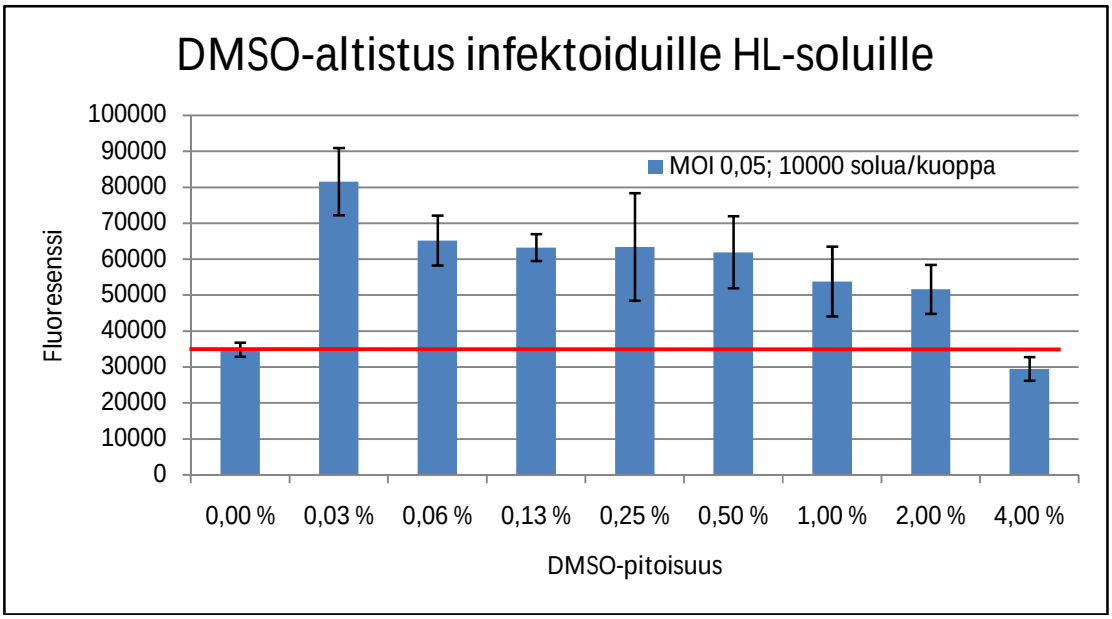
Menetelmän Z´-tekijän perusteella yhden päivän kasvatus ei riitä (Kuva 23), mutta kahden ja kolmen päivän kasvatuksella ei ole merkittävää eroa. Kasvatusajanjaksoksi valittiin 3 päivää käytännön työskentelyn helpottamiseksi.



Kuva 23. Kasvatusajanjakson vaikutus Z´-tekijään (40000 solua/kuoppa, MOI 0,05).

9.1.4 Dimetyylisulfoksidialtistus infektoiduille HL-soluille

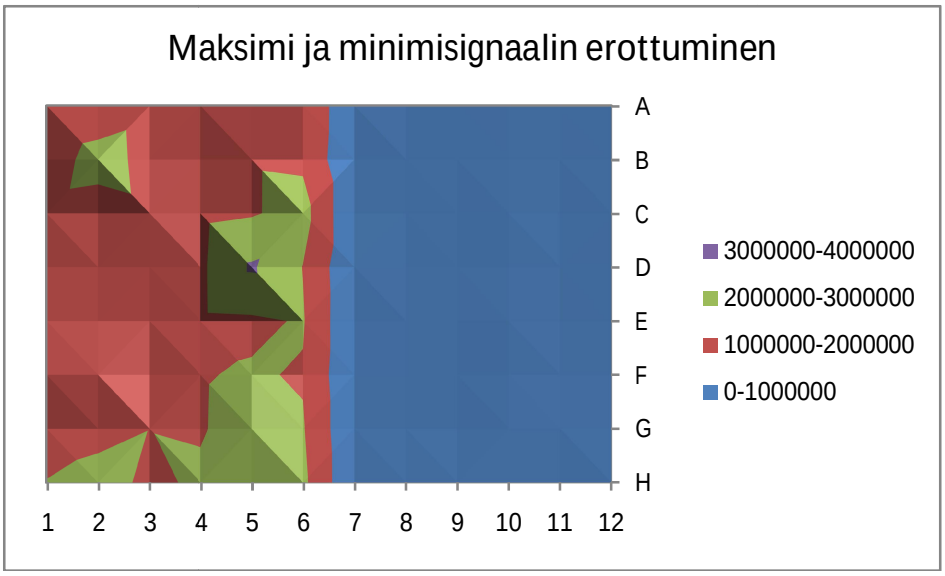
Infektoiduille HL-soluille tehtiin DMSO-altistus, koska tutkittavat näytteet liuotettiin DMSO:n. Kokeen perusteella pienet DMSO-pitoisuudet näyttäisivät vaikuttavan nimenomaan bakteerien infektointikykyyn alentavasti, kun taas suurella (4 %) DMSO-pitoisuudella oli havaittavissa vähäinen isäntäsolujen elinkykyä heikentävä vaikutus (Kuva 24). Koska vaikutus bakteereihin DMSO-pitoisuuksilla 0,06-0,5 % näyttäisi olevan aika samankaltainen ja DMSO:a ei voitu kokonaan välttää päädyttiin yhdisteiden tutkimisessa käyttämään DMSO-pitoisuutena 0,5 %.



Kuva 24. DMSO-altistus infektoiduille HL-soluille (10 000 solua/kuoppa, MOI 0,05).

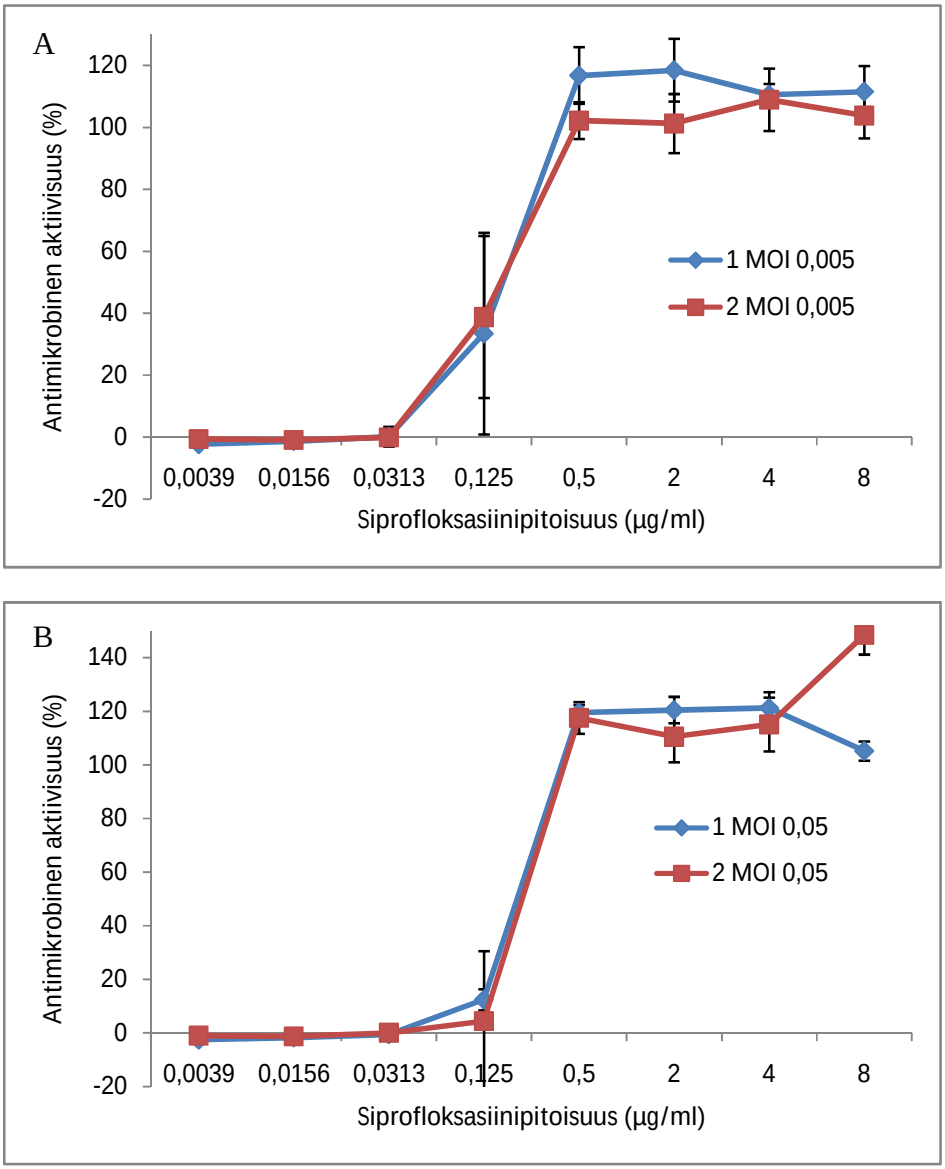
9.1.5 Kuoppalevyn sisäinen tulosten vaihtelu ja menetelmän toistettavuus

Kuoppalevyn sisäinen tulosten vaihtelu testattiin määrittämällä maksimi- ja minimiarvojen toistettavuus kuoppalevyllä, jossa puolet kuopista infektoitiin 2000 pesäkettä muodostavalla yksiköllä (MOI 0,05), jolloin niistä saatiin minimisignaali ja loput kuopat jätettiin infektoimatta eli niistä saatiin maksimisignaali (Kuva 25). Menetelmän Z´-tekijäksi saatiin 0,59. Puhtaiden (max) kuoppien erottuvuus infektoidusta (min) oli erinomainen. Kokeen perusteella oli havaittavissa, että solut kasvavat keskikuopissa ja alimmissa reunakuopissa hieman paremmin (Kuva 25). Samanlaista vaikutusta ei ole havaittavissa infektoiduissa kuopissa.



Kuva 25. Infektoitujen ja puhtaiden kuoppien signaalien erottuminen 96-kuoppalevyllä, jossa puolet kuopista on infektoitu (40000 solua/kuoppa, MOI 0,05).

Menetelmän toistettavuus testattiin myös määrittämällä antimikrobinen aktiivisuus kontrolliantibiootilla kahtena eri päivänä. Antimikrobisen aktiivisuuden testissä bakteriosidisenä kontrolliantibioottina oli siprofloksasiini. Kokeessa testattiin siprofloksasiinin antimikrobinen aktiivisuus pitoisuuksilla 8-0,0039 µg/ml ja kahdella eri bakteeripitoisuudella MOI 0,005 ja MOI 0,05 (Kuva 26). Siprofloksasiinin IC_{50}-konsentraatioksi saatiin kahtena eri määrityskertana 0,14 ja 0,15 µg/ml (MOI 0,005) sekä 0,14 ja 0,28 µg/ml (MOI 0,05). Suuremmalla bakteerikonsentraatiolla (MOI 0,05) saadun kahden erillisen määrityksen keskiarvo 0,21 µg/ml vastaa hyvin Kleymannin ja Werlingin (2004) artikkelissa siprofloksasiinin IC_{50}-arvoksi saatua 0,2 µg/ml. Suuremmalla konsentraatiolla (MOI 0,05) tehtyjen määritysten IC_{50}-konsentraatioiden eron taustalla on luultavasti maksimisignaalin eroavaisuudet kahtena erillisenä määrityskertana (Kuva 13).



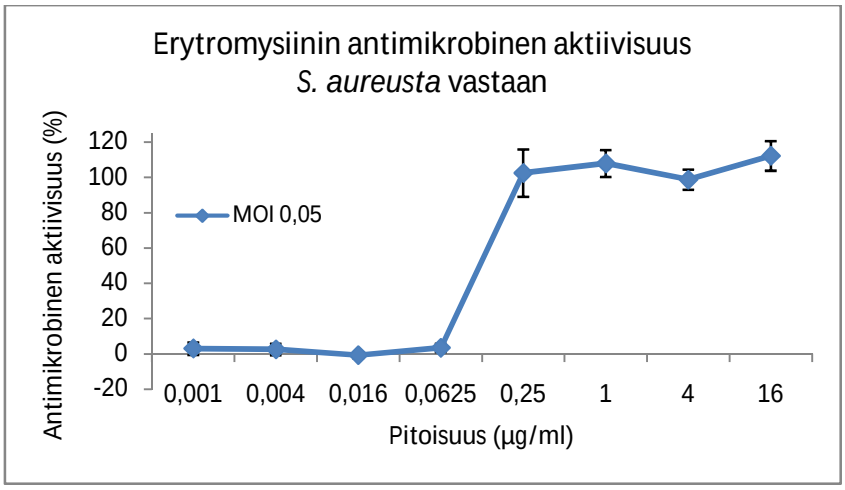
Kuva 26. Siprofloksasiinin antimikrobinen aktiivisuus kahtena eri päivänä testattuna A (MOI 0,005) ja B (MOI 0,05).

9.1.6 Menetelmän validointi

Yhteisviljelmämenetelmä validoitiin *S. aureus*ta vastaan aktiivisiksi tunnettujen antimikrobisten yhdisteiden avulla. Yhteisviljelmämenetelmällä testatut antimikrobiset yhdisteet olivat erytromysiini, kloramfenikoli, gentamysiini, ofloksasiini, penisilliini, ampisilliini, vankomysiini, doksisykliini, polymyksiini B ja spektinomysiini. Antibiootit

testattiin annosvastemäärityksenä kahdeksalla eri konsentraatiolla 4-kertaisena laimennossarjana. Konsentraatioskaala valittiin kullekin antimikrobiaineelle kirjallisuudessa esiintyvän (Lorian 2005, Sabath ym. 1976) MIC-arvon perusteella.

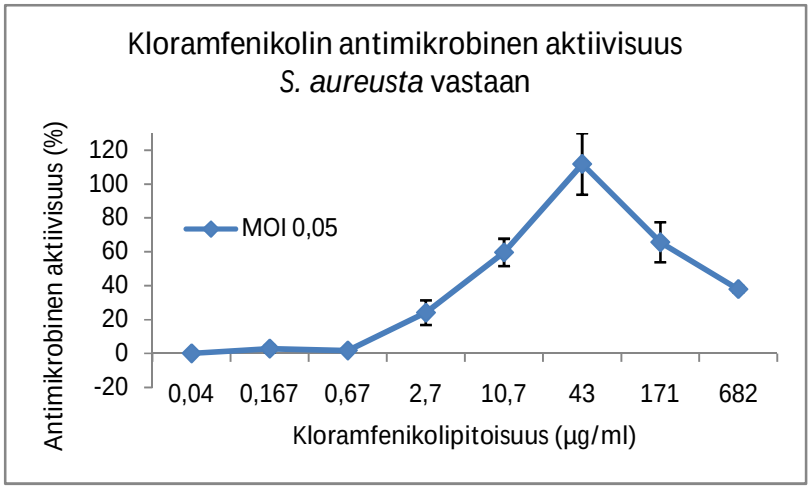
Erytromysiini kuuluu makrolidiantibioottien ryhmään. Se estää bakteereiden proteiinisynteesiä kiinnittymällä bakteeriribosomin 50S-alayksikköön. Vaikutukseltaan erytromysiini on bakteriostaattinen. Vaikutuskirjo käsittää monenlaisia mikrobeja muun muassa grampositiiviset kokkibakteerit, anaerobibakteerit, klamydia ja mykoplasma. Erytromysiinille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetun MIC-arvojen 0,25-1 µg/ml perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,001-16 µg/ml (Lorian 2005). Kokeen perusteella erytromysiinin MIC ja IC_{50}–arvot yhteisviljelmämenetelmällä olivat 0,25 ja 0,12 µg/ml (Kuva 27).



Kuva 27. Erytromysiinin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 0,25 µg/ml ja IC_{50} 0,12 µg/ml.

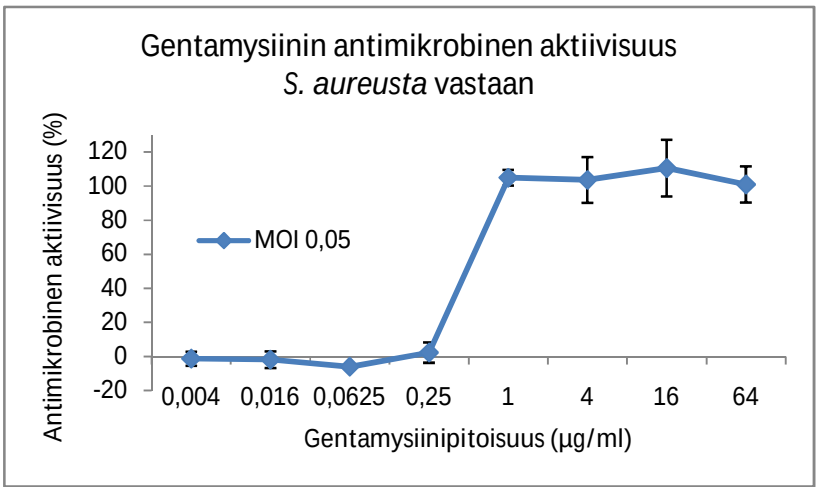
Kloramfenikoli estää bakteerien proteiinisynteesin alkuvaihetta sitoutumalla bakteeriribosomin 50S-alayksikköön ja estämällä NADH-oksidaasia. Kloramfenikolin vaikutus on mikrobista riippuen joko bakteriostaattinen tai bakterisidinen. Stafylokokkeihin vaikutus on bakteriostaattinen. Kloramfenikolille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetut MIC-arvot olivat 2-8 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,016-256 µg/ml (Lorian 2005). Kloramfenikolilla havaittiin ensimmäisessä testissä

sytotoksisuutta isäntäsolua kohtaan, jonka vuoksi testi päätettiin vielä toistaa suuremmilla pitoisuuksilla. Toisessa testissä konsentraatioskaala oli 0,04-682 µg/ml. Suurilla pitoisuuksilla kloramfenikolin sytotoksisuus on havaittavissa selkeästi (Kuva 28). Kokeen perusteella yhteisviljelmämenetelmällä saadut MIC- ja IC_{50}-arvot kloramfenikolille olivat 43 ja 10,59 µg/ml ja CC_{50}-arvo on käytettävissä olevan aineiston perusteella 140,54 µg/ml (Kuva 15). Kloramfenikolin selektiivisyysindeksi (SI) on tulosten perusteella 13,27. CC_{50}-arvoon tulee suhtautua varauksella, koska käytettävissä olevia havaintoarvoja sytotoksisuuspuolelta oli vain kolme. Kloramfenikoli on käytössä ainoastaan paikallislääkkeenä sen harvinaisten, mutta vakavien haittavaikutusten vuoksi (aplastinen anemia).



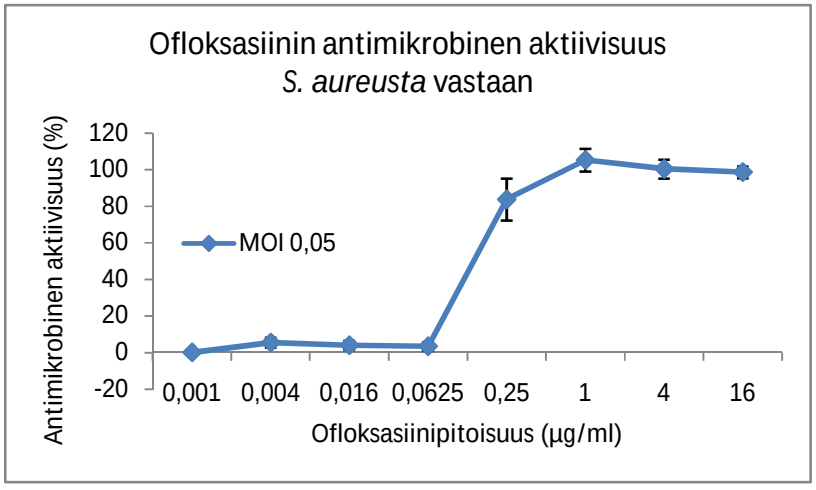
Kuva 28. Kloramfenikolin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 43 µg/ml ja IC_{50} 10,59 µg/ml.

Gentamysiini kuluu aminoglykosidiantibioottien ryhmään. Se estää bakteerien proteiinisynteesiä kiinnittymällä bakteeriribosomin 30S-alaosaan. Vaikutukseltaan gentamysiini on bakterisidinen. Vaikutuskirjo käsittää etenkin gramnegatiiviset bakteerit, streptokokit ovat resistenttejä ja stafylokokit ovat herkkiä *in vitro*. Gentamysiinille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetut MIC-arvot olivat 0,12-1 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,004-64 µg/ml (Lorian 2005). Gentamysiinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 1 ja 0,31 µg/ml (Kuva 29).



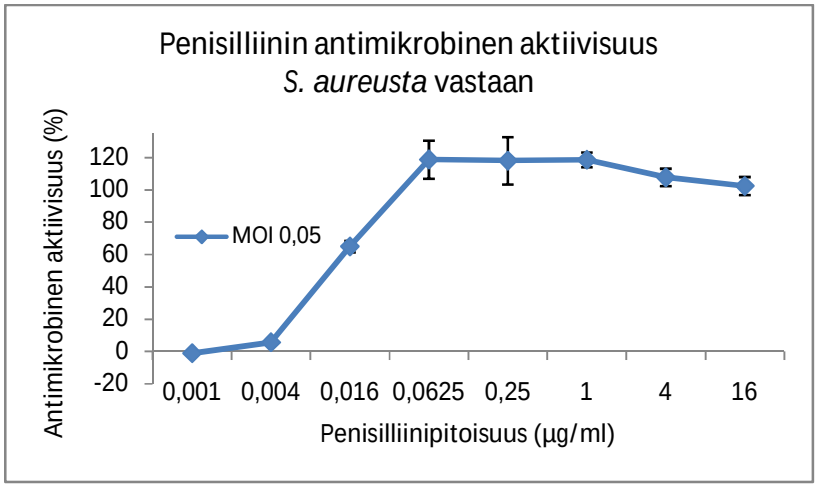
Kuva 29. Gentamysiinin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 1 µg/ml ja IC_{50} 0,31 µg/ml.

Ofloksasiini kuuluu fluorokinolonien ryhmään. Sen vaikutuskirjo käsittää sekä grampositiiviset, että gramnegatiiviset bakteerit. Fluorokinolonien vaikutus perustuu bakteerien DNA-gyraasin (topoisomeraasi II) ja topoisomeraasin IV estoon. Fluorokinolonien vaikutus on bakterisidinen. Ofloksasiinille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetut MIC-arvot olivat 0,12-1 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,001-16 µg/ml (Lorian 2005). Ofloksasiinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 0,25 ja 0,16 µg/ml (Kuva 30).



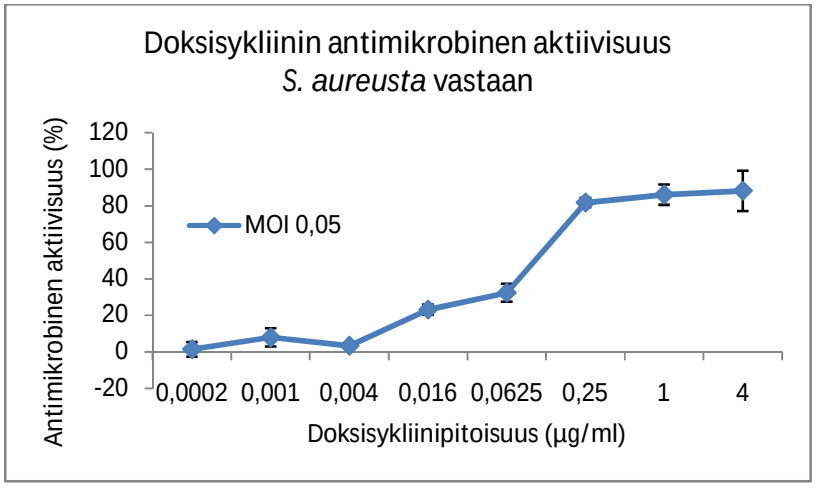
Kuva 30. Ofloksasiinin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan, MIC 0,25 µg/ml ja IC_{50} 0,16 µg/ml.

Penisilliini kuuluu β-laktaamiantibioottien ryhmään. Sen vaikutus perustuu bakteerien soluseinäsynteesin estoon. Vaikutukseltaan penisilliini on bakterisidinen. Vaikutuskirjo käsittää sekä grampositiiviset, että gramnegatiiviset bakteerit, mutta resistenssitilanne vaihtelee. Penisilliinille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetut MIC-arvot olivat 0,25-1 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,001-16 µg/ml (Lorian 2005). Penisilliinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 0,063 ja 0,014 µg/ml (Kuva 31).



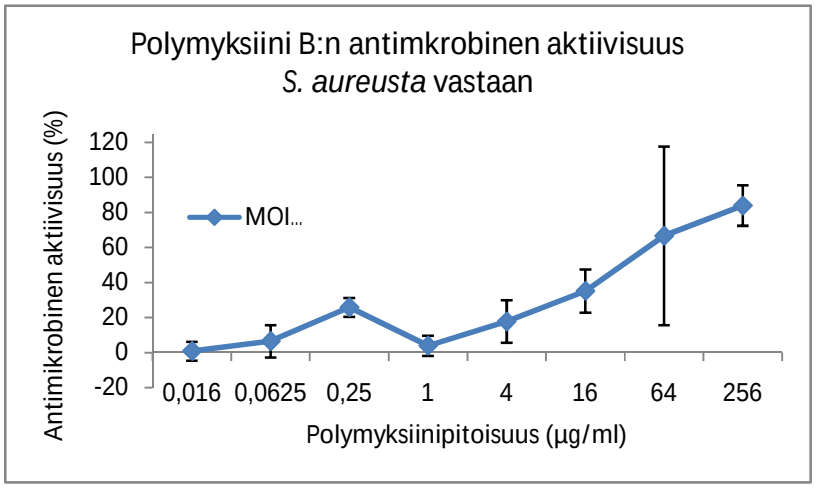
Kuva 31. Penisilliinin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 0,063 µg/ml ja IC50 0,014 µg/ml.

Doksisykliini kuuluu tetrasykliinien ryhmään. Vaikutusmekanismi perustuu bakteerien proteiinisynteesin estoon. Se sitoutuu bakteeriribosomin 30S-alayksikköön. Vaikutuskirjoltaan se on hyvin laaja. Doksisykliinille ei NCCLS-laboratoriostandardeista löytynyt *S. aureukselle* MIC-arvoa, mutta muusta kirjallisuudesta (Sabath ym. 1976) löytyi MIC-arvo 0,04 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,0002-4 µg/ml (Kuva 32). Doksisykliinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 0,25 ja 0,063 µg/ml.



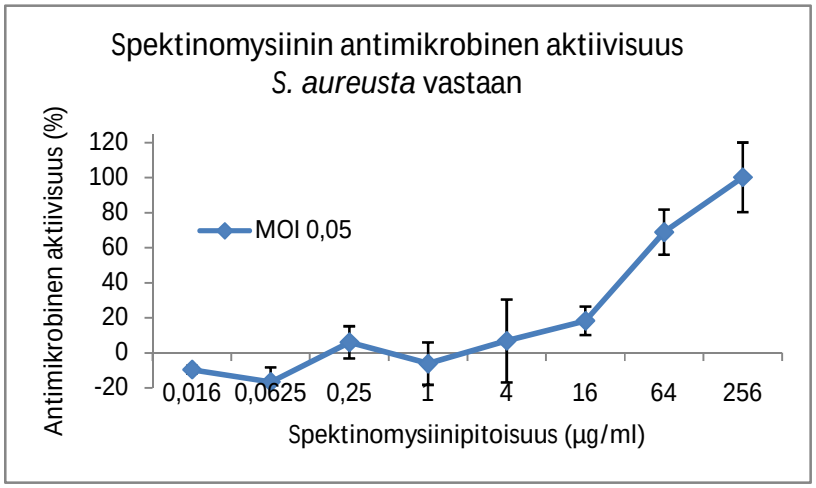
Kuva 32. Doksisykliinin antimikrobinen aktiivisuus S. aureusta vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 0,25 µg/ml ja IC50 0,063 µg/ml.

Polymyksiini B:n vaikutus perustuu bakteerien solumembraanin vahingoittamiseen ja se on myös toksinen eukaryoottisoluille. Polymyksiinille ei NCCLS-laboratoriostandardeista löytynyt *S. aureukselle* MIC-arvoa, mutta muusta kirjallisuudesta (Sabath ym. 1976) löytyi MIC-arvo 100 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,016-256 µg/ml (Kuva 20). Polymyksiinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 256 ja 25,1 µg/ml.



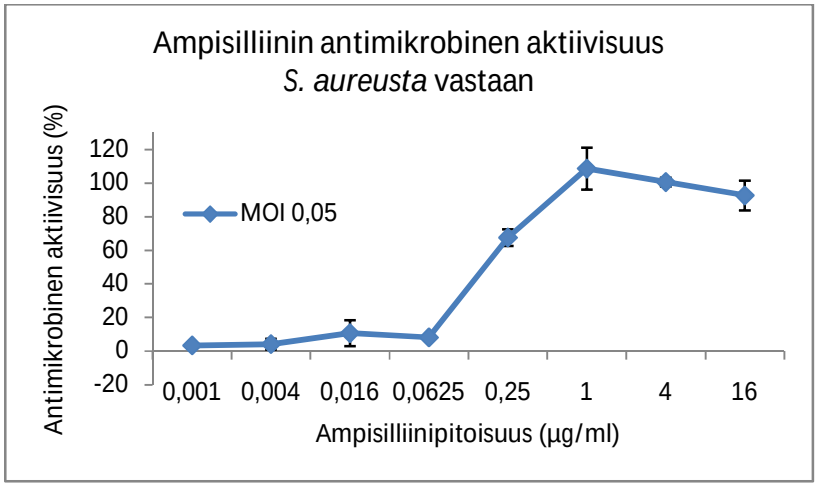
Kuva 33. Polymyksiini B:n antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 256 µg/ml ja IC_{50} 25,1 µg/ml.

Spektinomysiini on *Streptomyces spectabilis* -bakteerin tuottama aminosyklotoliantibiootti. Sen estää bakteerien proteiinisynteesiä sitoutumalla ribosomin 30S-alayksikköön. Vaikutuskirjo käsittää gramnegatiiviset bakteerit, mutta kliinisesti se on riittävän tehokas vain *Neisseria gonorrheaa* vastaan. Spektinomysiinille ei NCCLS-laboratoriostandardeista löytynyt *S. aureukselle* MIC-arvoa, mutta muusta kirjallisuudesta (Sabath ym. 1976) löytyi MIC-arvo 100 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,016-256 µg/ml (Kuva 34). Spektinomysiinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 256 ja 44,04 µg/ml.



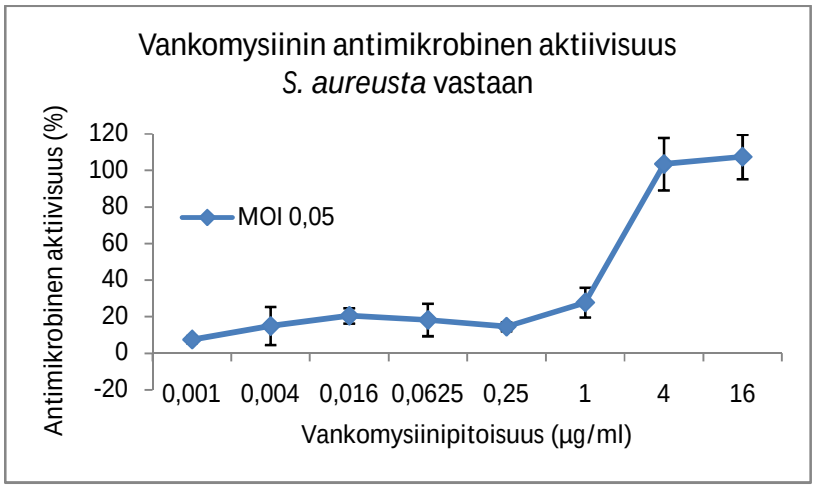
Kuva 34. Spektinomysiinin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 256 µg/ml ja IC_{50} 44,04 µg/ml.

Ampisilliini on laajakirjoinen β-laktaamiantibiootti. Sen vaikutus perustuu myös bakteerin soluseinän synteesin estoon ja vaikutukseltaan se on bakterisidinen. Laajempi vaikutuskirjo perustuu pidempään sivuketjun rakenteeseen, jolloin penetraatio bakteerin soluseinän läpi paranee. Ampisilliinille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetut MIC-arvot olivat 0,5-2 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,001-16 µg/ml (Kuva 35). Ampisilliinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot yhteisviljelmämenetelmälle olivat 1 ja 0,19 µg/ml.



Kuva 35. Ampisilliinin antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 1 µg/ml ja IC_{50} 0,19 µg/ml.

Vankomysiini on glykopeptidiantibiootti. Sen vaikutus perustuu bakteerin soluseinäsynteesin häiriintymiseen. Vaikutukseltaan se on bakterisidinen. Vaikutuskirjo käsittää grampositiiviset bakteerit. Vankomysiinille NCCLS-laboratoriostandardeissa ilmoitetut MIC-arvot olivat 0,5-2 µg/ml, jonka perusteella konsentraatioskaalaksi valittiin 0,001-16 µg/ml (Lorian 2005). Vankomysiinille kokeen perusteella saadut MIC- ja IC_{50}-arvot olivat 4 ja 1,87 µg/ml (Kuva 36).



Kuva 36. Vankomysiinin antimikrobinen aktiivisuus S. aureusta vastaan yhteisviljelmämenetelmällä testattuna; MIC 4 µg/ml ja IC_{50} 1,87 µg/ml.

Menetelmän validoinnissa käytetyt antimikrobiset yhdisteet kuuluivat useisiin erilaisiin mikrobilääkeryhmiin. Mukana oli makrolidi-, aminoglykosidi-, fluorokinoloni-, tetrasykliini-, β-laktaami sekä glykopeptidiryhmän antimikrobiaineita. Lisäksi oli joitakin antibiootteja tämän ryhmittelyn ulkopuolelta (kloramfenikoli, spektinomysiini ja polymyksiini B). Validointiin valittiin myös epätyypillisempiä yhdisteitä, koska mukana testissä olisi toivottu olevan myös jokin sellainen yhdiste, joka ei toimi kyseessä olevaan kantaan. Kokeissa käytettyyn bakteerikantaan (*S. aureus* ATCC 25923) kaikki testatut antimikrobiset yhdisteet tehosivat kuitenkin pääasiassa hyvin, vaikkakin joissakin tapauksissa vaikuttavat konsentraatiot olivat varsin korkeita. Taulukossa 5 on vertailtu yhteisviljelmämenetelmällä saatuja MIC-arvoja muualla kirjallisuudessa esiintyviin. Kirjallisuudesta löytyneet MIC-arvot olivat suurimmaksi osaksi määritetty kliinisesti eristetyille *S. aureus*-kannoille. Kirjallisuudesta löytyneet MIC-arvot olivat useiden kliinisesti eristettyjen isolaattien MIC-keskiarvoja. Jos vertailussa oli mukana sekä antimikrobiyhdisteelle resistenttejä, että herkkiä *S. aureus* -kantoja on taulukkoon valittu herkkien kantojen MIC-keskiarvoa kuvaava MIC-arvo.

NCCLS-standardeissa ilmoitetuista MIC-arvoista suuremmat arvot saatiin kloramfenikolille ja penisilliinille (Lorian 2005). Käytössä ollutta bakteerikantaa voisi tulosten perusteella pitää resistenttinä kloramfenikolille (NCCLS 2-8 µg/ml, kokeellinen 43 µg/ml) ja penisilliinille (NCCLS 0,5-2 µg/ml, kokeellinen 4 µg/ml). Penisilliiniresistenssi on yleistä *S. aureus* kannolla, jopa yli 90 % kliinisesti eristetyistä kannoista on resistenttejä penisilliinille (Lowy 2003). Poikkeavat arvot saatiin doksisykliinille, polymyksiinille ja spektinomysiinille. Polymyksiinin ja spektinomysiinin tapauksissa kokeeseen valittu konsentraatioskaala saattaa olla eron taustalla. MIC-arvoihin vaikuttavia seikkoja ovat muun muassa bakteerimäärä, kasvatusliuos ja pH. Menetelmässä käytetty bakteerimäärä on huomattavasti pienempi kuin esimerkiksi turbidimetrisessä perusantibakteerimäärityksessä tai agardiffuusiokokeissa. Myös kasvatusliuos on poikkeava, koska isäntäsolu vaatii huomattavasti rikkaamman kasvatusliuoksen kuin bakteeri. Menetelmän eroavaisuuksista huolimatta kokeellisesti saadut MIC-arvot vastaavat hyvin kirjallisuudessa esiintyviä.

Taulukko 5. Antimikrobisten yhdisteiden kokeellisesti yhteisviljelmämenetelmällä saadut MIC-arvot ja vertailu kirjallisuudessa esitettyihin.

	MIC μg/ml						
Antimikrobi-yhdiste	**Fluit ym. 2001**	**Jones ym. 1999**	**Nishujima ja Kurokawa 2002**	**Hope ym. 2008**	**Sabath ym. 1976**	**NCCLS***	**Kokeellinen**
Siprofloksasiini	1	0,12-1	0,39	0,5		0,12-0,5	0,5
Erytromysiini	>8		0,78	0,12	0,2	0,25-1	0,25
Kloramfenikoli	8				3,1	2-8	**43**
Gentamysiini	1	≤0,06-128	6,2	0,5	0,4	0,12-1	1
Ofloksasiini		0,12-1	0,39			0,12-1	0,25
Ampisilliini	16		0,1		1,6	0,25-1	0,063
Vankomysiini	1	0,5-2	0,78	1	1,6	0,5-2	1
Penisilliini	32			128	0,4	0,5-2	**4**
Doksisykliini	1				0,04		0,25
Spektinomysiini					100		256
Polymyksiini B					100		256

*** Kirjassa Antibiotics in laboratory medicine (Lorian 2005)**

9.1.7 Menetelmän laadun arviointi

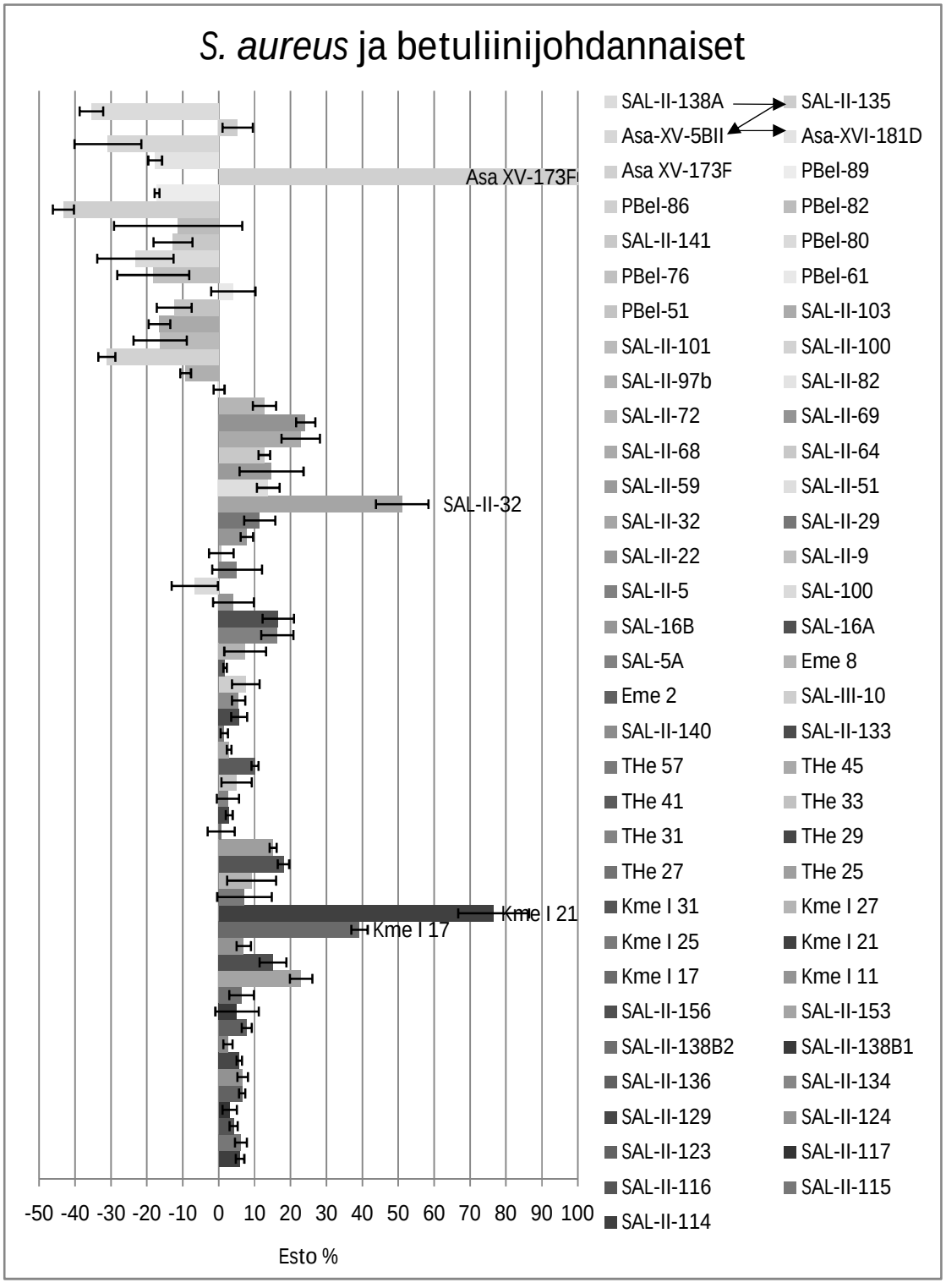
Menetelmän Z´-tekijät olivat pääosin alueella 0,61-0,80 eli menetelmän erotuskyky on erinomainen. Signaali-taustasuhde oli testeissä keskimäärin 15,94 ja signaali-kohinasuhde keskimäärin 12,77. Osa testeistä olisi vaatinut vielä toiston, koska menetelmän Z'-tekijä jäi alle 0,5 (kloramfenikolilevyssä 0,40 sekä polymyksiini ja spektinomysiini –levyssä 0,21), johtuen suuresta hajonnasta maksimi- tai minimisignaalissa. Menetelmän toteuttamisessa tärkeäksi osoittautui bakteerikannan nuorennos. Bakteerin infektointikyky heikkeni selvästi, jos kantaa ei nuorennettu ensin vinopinnalle ja siitä edelleen MH-liemeen.

9.2 Antimikrobisen aktiivisuuden primaariseulonta

Kaikille seulotuille yhdisteille tehtiin ensin perusantibakteerimääritys turbidimetrisellä menetelmällä. Primaarivaiheen seulonnassa aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet tutkittiin vielä yhteisviljelmämenetelmällä annosvastemäärityksenä aktiivisuuden varmentamiseksi.

9.2.1 Betuliinijohdannaiset

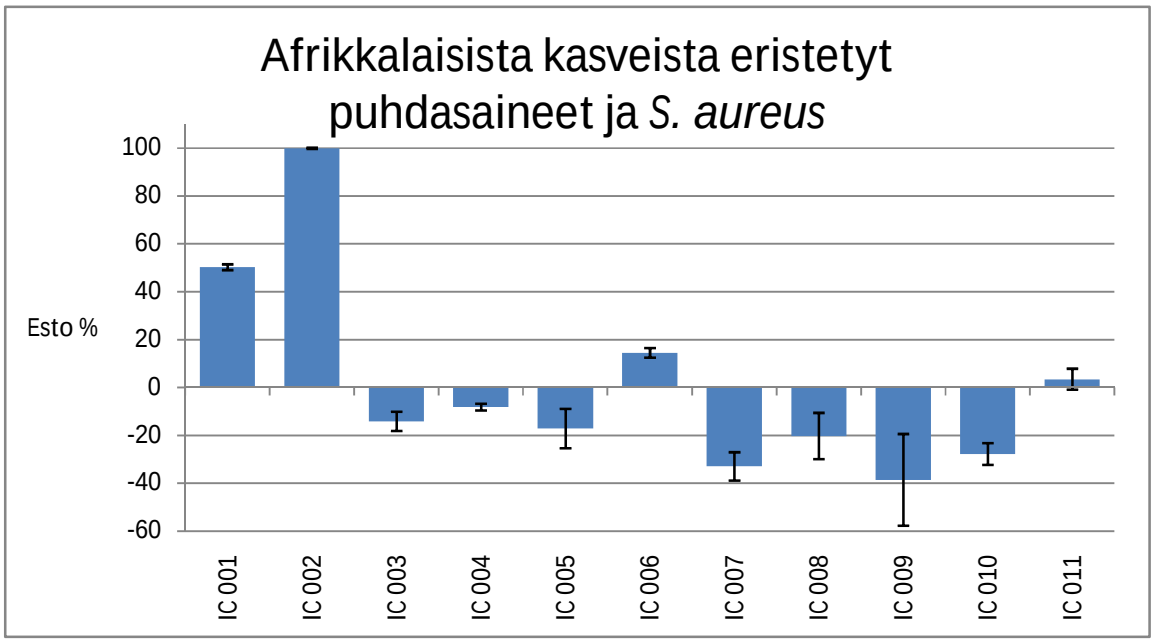
Kaikille yhdistekirjaston betuliinijohdannaisille (65 kpl, ks. LIITE 4) tehtiin perusantibakteerimääritys turbidimetrisellä menetelmällä. Perusantibakteerimäärityksessä testatut yhdisteet testattiin yhdellä konsentraatiolla (50 µM) kolmella rinnakkaisella näytteellä. Perusantibakteerimäärityksessä käytettiin olemassa olevan yhdistekirjaston 10 mM DMSO-kantaliuoksia. Testatulla konsentraatiolla (50 µM) aktiiviseksi osoittautuivat yhdisteet Asa XV-173F, Kme I 21, SAL-II-32 (betulonihappo) ja Kme I 17 (Kuva 37). Yhdisteiden *S. aureuksen* kasvun estoprosentit 24 tunnin kasvatuksen jälkeen olivat 100,2; 76,6; 51,1 ja 39,2 %. Kontrolliantimikrobiyhdisteenä toimineella siprofloksasiinilla estoprosentit olivat näissä määrityksissä 81,4; 97,6; 86,7 ja 97,7 %.



Kuva 37. Betuliinijohdannaisten *S. aureuksen* kasvua estävä vaikutus perusantibakteerimäärityksessä.

9.2.2 Afrikkalaisista kasveista eristetyt puhdasaineet

Afrikkalaisista kasveista eristettyjen puhdasaineiden antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* kohtaan testattiin perusantibakteerimäärityksellä turbidimetrisella menetelmällä. Puhdasaineita oli yhteensä 11 kappaletta ja niistä oli 10 mM kantaliuokset DMSO:ssa. Yhdisteet testattiin 50 µM konsentraatiolla ja kustakin näytteestä oli kuoppalevyllä kolme rinnakkaista määritystä. Primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuivat yhdisteet IC 001 ja IC 002 (Kuva 38). Ne estivät *S. aureuksen* kasvua 50,2 ja 99,9 %. Muilla testatuilla yhdisteillä ei havaittu olevan antibakteerista vaikutusta *S. aureusta* kohtaan. Kontrolliantimikrobiyhdisteenä toiminut siprofloksasiini esti bakteerin kasvua 80 %.

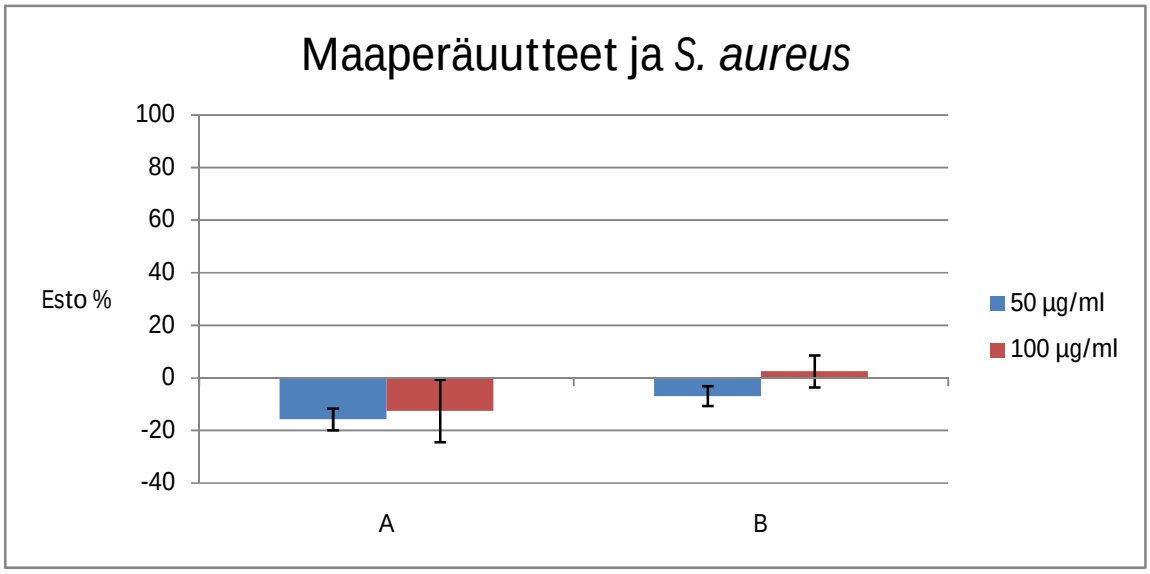


Kuva 38. Afrikkalaisista kasveista eristettyjen puhdasaineiden *S. aureuksen* kasvua estävä vaikutus 24 tunnin kasvatuksen jälkeen.

9.2.3 Maaperäuutteet

Maaperäuutteet testattiin turbidimetrisellä menetelmällä kahdella eri konsentraatiolla 50 ja 100 µg/ml. Kummallakaan näytteellä ei havaittu aktiivisuutta *S. aureusta* vastaan testatuilla

konsentraatioilla (Kuva 39). Konrolliantimikrobiyhdisteenä toiminut siprofloksasiini esti bakteerin kasvua 80 %.



Kuva 39. Maaperäuutteiden vaikutus *S. aureuksen* kasvuun kahdella eri konsentraatiolla testattuna (näytteet A ja B).

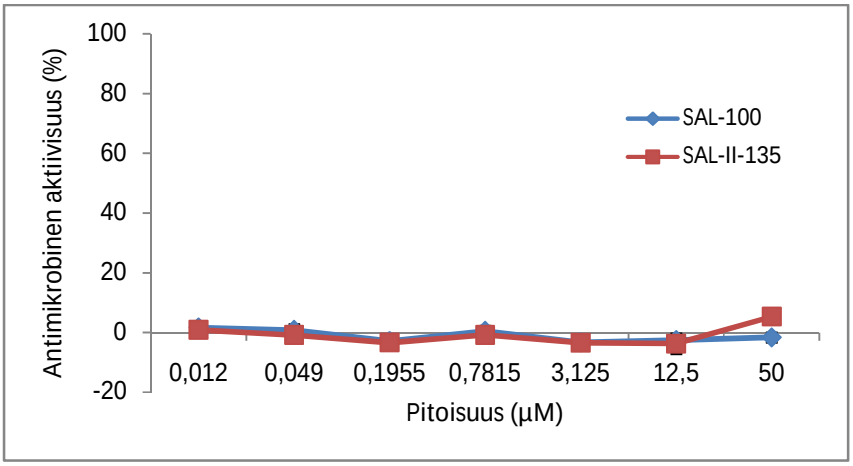
9.3 Sekundaariseulonta yhteisviljelmämenetelmällä

Primaariseulonnassa aktiiviseksi *S. aureus* ATCC 25923 –kantaa vastaan osoittautuivat betuliinijohdannaisista yhdisteet: Asa-XV-173F, Kme I 21, SAL-II-32 (betulonihappo) ja Kme I 17 sekä afrikkalaisista kasveista eristetyistä puhdasaineista yhdisteet: IC 001 ja IC 002. Betuliinilla ja sen biologisesti aktiivisemmilla johdannaisilla, kuten betuliinihapolla on useissa *in vitro* -tutkimuksissa todettu olevan muun muassa antiviraalisia (Pohjala ym. 2009) anti-inflammatorisia (Yun ym. 2003; Honda ym. 2006), antiplasmodiaalisia (Steele ym. 1999) ja antituumorisia (Kommera ym. 2009) vaikutuksia. Betuliinijohdannaisilla on myös lupaavia HI-viruksen vastaisia vaikutuksia. Betuliinijohdannainen [3β-(3-karboksi-3-metyyli-butanoloksi)lup-20(29)-eeni-28-oikohappo] kauppanimeltä Bevirimat® on tällä hetkellä faasi II tutkimuksissa ja sillä on saatu lupaavia tuloksia HIV-potilaiden hoidossa (Smith ym. 2007). Betuliinin ja sen johdannaisten antibakteerista aktiivisuutta on tutkittu vähemmän. Betuliinihapolla ei ole tutkimusten mukaan antibakteerista aktiivisuutta

(Chandramu 2003, Horiuchi ym. 2007, Fontanay ym. 2008), mutta betuliinihappojohdannaisilla on. Schühlyn tutkimusryhmän (1999) tekemässä tutkimuksessa kolmella uudella betuliinihappojohdannaisella: 7β-(4-hydroksibentsoyylioksi)-betuliinihapolla, 7β-(4-hydroksi-3′-metoksibentsoyylioksi)-betuliinihapolla ja 27-(4-hydroksi-3′-metoksibentsoyylioksi)-betuliinihapolla havaittiin merkittävä antibakteerinen aktiivisuus grampositiivisia bakteereja vastaan. Afrikkalaisista kasveista eristetyistä puhdasaineista aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet IC 001 ja IC 002 olivat molemmat eristetty kasvista nimeltä *Fadogia tetraquetra*, joka kuuluu matarakasvien (*Rubiaceae*) heimoon.

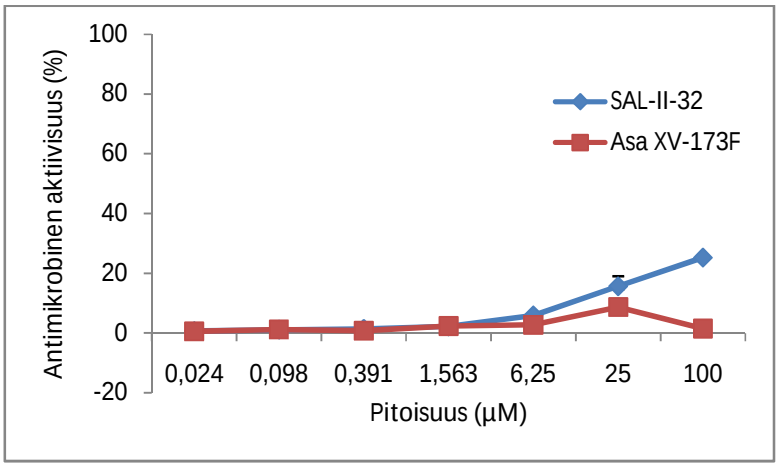
9.3.1 Betuliinijohdannaiset

Betuliinijohdannaisista yhteisviljelmämenetelmällä testattiin perusantibakteeri-määrityksessä *S. aureusta* vastaan aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet Asa XV-173F, Kme I 21, SAL-II-32 ja Kme I 17. Lisäksi testattiin yhdisteet, joilla aikaisempien määritysten perusteella oli havaittu olevan sytotoksisuutta nisäkässoluja kohtaan: SAL-II-135, SAL-II-138A ja SAL-II-141. Millään testatuista yhdisteistä ei kuitenkaan yhteisviljelmämenetelmällä havaittu olevan juurikaan antimikrobista aktiivisuutta *S. aureusta* vastaan. SAL-100 ja SAL-II-135 aktiivisuus jäi suurimmallakin konsentraatiolla alle 6 % (Kuva 40).



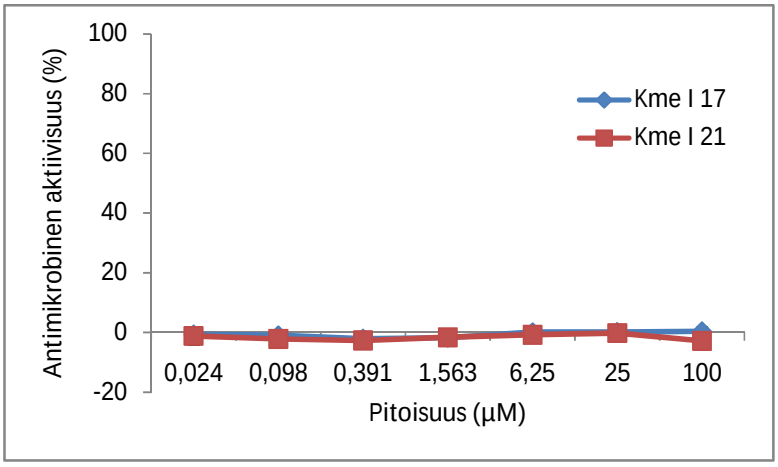
Kuva 40. Yhdisteiden SAL-100 ja SAL-II-135 antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan.

Suurin antibakteerinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan oli yhdisteellä SAL-II-32, joka esti bakteerin kasvua suurimmalla pitoisuudella 25 % (Kuva 42). Primaariseulonnassa lupaava yhdiste Asa XV-173F osoitti vähäistä aktiivisuutta pitoisuudella 25 µM (8,7 %), mutta suuremmalla pitoisuudella yhdiste on mahdollisesti sytotoksinen (Kuva 41). Sytotoksisuuden varmentaminen vaatii vielä jatkotutkimuksia.



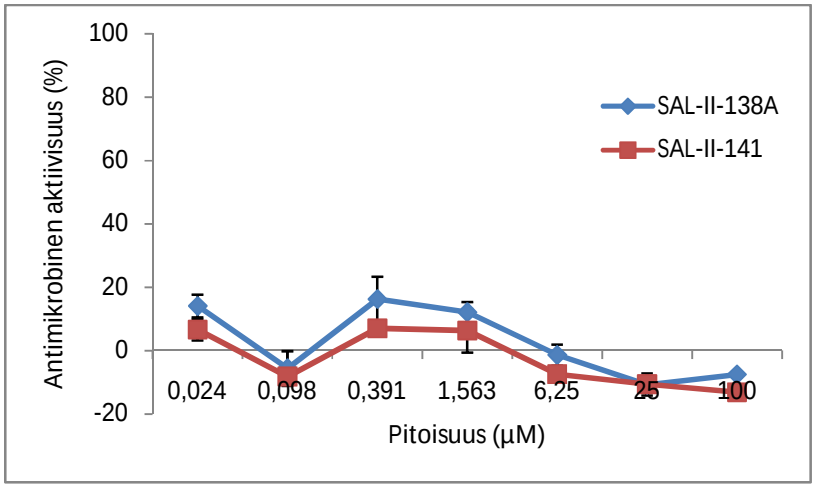
Kuva 41. Yhdisteiden SAL-II-32 ja Asa XV-173F antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan.

Primaariseulonnassa myös lupaaviksi osoittautuneet yhdisteet Kme I 17 ja Kme I 21 eivät olleet aktiivisia yhteisviljelmämenetelmällä testattuna (Kuva 42).



Kuva 42. Yhdisteiden Kme I 17 ja Kme I 21 antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan.

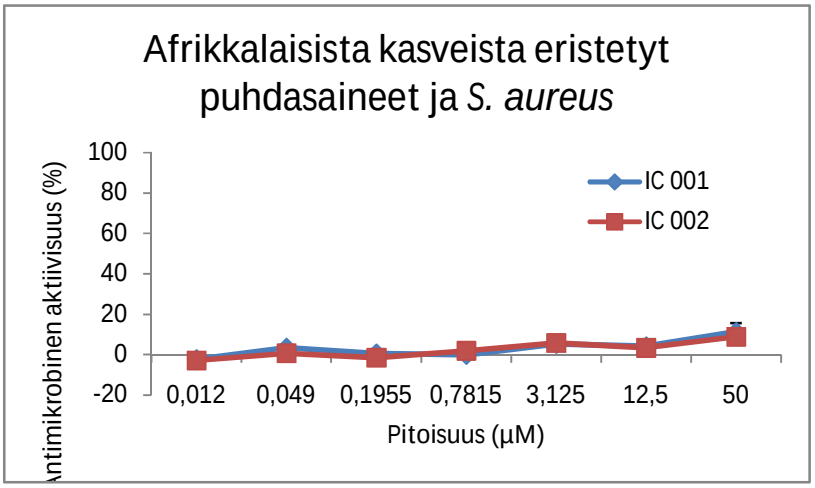
Aikaisemman tiedon perusteella sytotoksiset yhdisteet SAL-II-138A ja SAL-II-141 eivät myöskään olleet aktiivisia *S. aureusta* vastaan (Kuva 43), jolloin myöskään sytotoksisuutta ei menetelmällä saada näkyviin. Yhdisteen ollessa aktiivinen pienillä pitoisuuksilla ja sytotoksinen suurilla pitoisuuksilla sytotoksisuus näkyisi fluoresenssin alenemisena maksimiin verrattuna. Yhdisteen ollessa sytotoksinen kaikilla pitoisuuksilla sytotoksisuus näkyisi kuten kuvassa 43, mutta mikroskoopilla tarkasteltuna bakteerikasvu oli havaittavissa kaikissa infektoiduissa kuopissa.



Kuva 43. Yhdisteiden SAL-II-138A ja SAL-II-141 antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan.

9.3.2 Afrikkalaisista kasveista eristetyt puhdasaineet

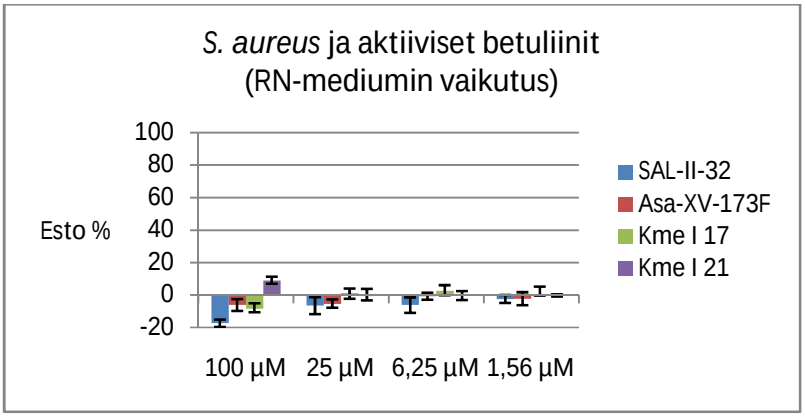
Perusantibakteerimäärityksessä *S. aureusta* vastaan aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet IC 001 ja IC 002 testattiin yhteisviljelmämenetelmällä. IC 001 ja IC 002 eivät pystyneet estämään bakteerin kasvua yhteisviljelmämenetelmässä (Kuva 44).



Kuva 44. Primaariseulonnassa aktiivisiksi osoittautuneet afrikkalaisista kasveista eristettyjen puhdasaineiden testaus annosvastemäärityksenä yhteisviljelmämenetelmällä.

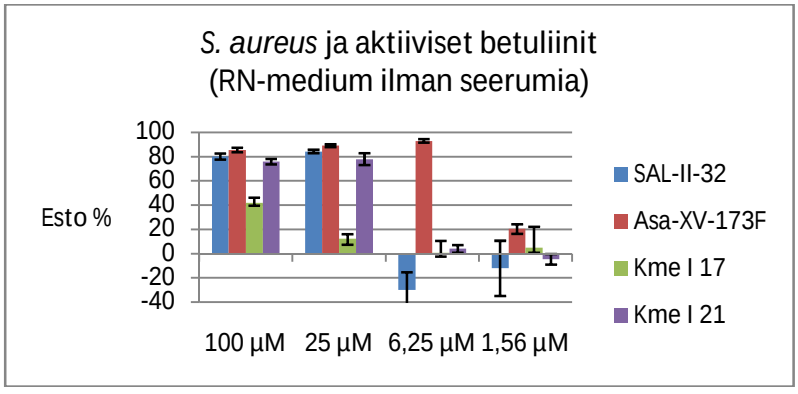
9.3.3 RN-mediumin vaikutus tutkittujen yhdisteiden aktiivisuuteen

Koska yhteisviljelmämenetelmällä ei onnistuttu näkemään aktiivisuutta millään primaariseulonnassa *S. aureusta* vastaan aktiiviseksi osoittautuneella yhdisteellä haluttiin tutkia RN-mediumin vaikutus yhdisteiden aktiivisuuteen. RN-mediumin vaikutus testattiin käyttäen primaariseulonnassa käytettyä turbidimetristä menetelmää, mutta MH-kasvatusliemen tilalla käytettiin RN-mediumia. Tulosten perusteella havaittiin RN-mediumin vaikutus yhdisteiden aktiivisuuteen (Kuva 45). Millään antimikrobisen aktiivisuuden primaariseulonnassa aktiiviseksi havaitulla yhdisteellä ei ollut aktiivisuutta *S. aureusta* vastaan RN-mediumissa. Bakteerin kasvu oli kuitenkin selkeästi havaittavissa, kuten myös kontrolliantibioottina toimineen siprofloksasiinin (0,5 µg/ml) bakteerin kasvua estävä vaikutus (91,3 %).



Kuva 45. Primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneiden yhdisteiden antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan RN-mediumissa.

Tämän perusteella pääteltiin yhdisteiden hajoavan mediumin komponenttien vaikutuksesta tai mahdollisesti sitoutuvan mediumin komponentteihin. Koska RN-medium sisältää naudan sikiöseerumia (FBS, engl. fetal bovine serum) haluttiin yhdisteiden aktiivisuus testata vielä RN-mediumissa, johon ei lisätty seerumia. Testi toistettiin samalla tavalla kuin edellä, mutta käytettyyn RN-mediumiin ei lisätty FBS:a. Tulosten perusteella havaittiin seerumin vaikuttavan yhdisteiden aktiivisuuteen oleellisesti (Kuva 46). Seerumin proteiinit mahdollisesti sitovat/hajottavat tutkittavat yhdisteet. Absorbanssin perusteella oli havaittavissa, että seerumi myös lisäsi bakteerin kasvua huomattavasti. Bakteerin vapaan kasvun absorbanssi oli kaksinkertainen seerumin läsnäollessa. Kontrolliantibioottina toiminut siprofloksasiini (0,5 µg/ml) esti bakteerin kasvua 65 %.



Kuva 46. Primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneiden yhdisteiden antimikrobinen aktiivisuus *S. aureusta* vastaan RN-mediumissa, joka ei sisällä naudan siköseerumia.

9.4 Pohdinta

Yhteisviljelmämenetelmä soveltuu hyvin primaariseulonnassa lupaaviksi osoittautuneiden yhdisteiden jatkotestaukseen. Menetelmän etuja ovat kokosolupohjaisuus ja menetelmällä saatavan informaation määrä. Kokosolupohjaisena menetelmänä se sisältää kaikki mahdolliset antibakteeriset vaikutuskohteet. Lisäksi menetelmällä saadaan paljon tietoa yhdellä testillä sekä tutkittavan yhdisteen antibakteerisista ominaisuuksista (MIC, IC_{50}), että sytotoksisuudesta isäntäsolua kohtaan (CC_{50}). IC_{50} ja CC_{50} -arvojen perusteella voidaan myös laskea selektiivisyys bakteerin ja nisäkässolun välillä (SI).

Menetelmän rajoituksena on sen hidas toteuttaminen. Menetelmän pitkän kasvatusajanjakson seurauksena lyhytkestoisesti vaikuttavien yhdisteiden tehoa ei välttämättä havaita. Toisaalta hyvin lyhytkestoisesti vaikuttava yhdiste tuskin sellaisenaan ilman minkäänlaisia modifikaatioita kelpaisikaan uudeksi antimikrobiyhdisteeksi. Menetelmässä korostuu myös tutkittavien yhdisteiden stabiilisuus, kun ne joutuvat olemaan useita päiviä liuoksessa ja lämpimässä ympäristössä. Menetelmässä käytetyn mediumin komponentit saattavat myös vaikuttaa tutkittavien yhdisteiden aktiivisuuteen, kuten kokeellisen työn perusteella oli selvästi havaittavissa.

Menetelmän toimivuus osoitettiin tunnettujen antimikrobisten yhdisteiden avulla sekä bakterisidisilla että bakteriostaattisilla yhdisteillä. Menetelmän validoinnissa käytettyjen antimikrobiyhdisteiden avulla saadut MIC-arvot vastasivat hyvin kirjallisuudessa esiintyviä, joskin eri menetelmillä saatuja MIC-arvoja. Menetelmällä löydettyjä antibakteerisia yhdisteitä voidaankin pitää hyvin lupaavina yhdisteinä, koska niiden aktiivisuus on osoitettu simuloidussa biologisessa ympäristössä (infektiomallissa), jossa myös seerumin komponentit ovat läsnä. Menetelmä on hyvänä apuna rationaalisessa lääkekehityksessä, jossa johtolankamolekyylien modifioinnilla pyritään löytämään uusia lääkeaineita. Uuden antimikrobisen yhdisteen selektiivisyys on tärkeää, jotta markkinoille saadaan turvallisia antimikrobiaineita. Menetelmällä havaittiin selvästi kloramfenikolin sytotoksisuus isäntäsolua kohtaan, mikä on johdonmukaista aikaisemman tiedon valossa

yhdisteen vakavista haittavaikutuksista. Antimikrobisten yhdisteiden seulontamenetelmien kehittäminen on tärkeää, jotta lääkekehityksen kliiniseen vaiheeseen pääsevät yhdisteet epäonnistuisivat entistä harvemmin ja uudet antimikrobiaineet olisivat käyttäjille turvallisia ja tehokkaita.

10 YHTEENVETO

Kokeellisen työn tarkoituksena oli perustaa isäntäsolun ja patogeenin yhteisviljelmä sekä tutkia alustavassa seulonnassa aktiivisiksi havaittujen näytteiden antimikrobista aktiivisuutta perustetulla yhteisviljelmällä. Yhteisviljelmämenetelmä on kuvattu Kleymannin ja Werlingin kirjoittamassa artikkelissa 2004 ja se toimi kokeellisen työn pohjana. Isäntäsoluna yhteisviljelmässä oli HL (Human Lung)-solulinja ja patogeeninä *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Kokeellinen työ aloitettiin bakteerin pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (Colony forming units, CFU) määrän ja absorbanssin välisen korrelaation selvittämisellä. CFU-määritysten perusteella saatiin standardisuoran yhtälö, jonka avulla laskettiin bakteerikonsentraatio kasvatusliuoksessa absorbanssin perusteella (PMY/ml). Seuraavaksi suoritettiin yhteisviljelmämenetelmän optimointi ja validointi. Optimoinnin apuna käytettiin tilastollisia parametrejä S/B-, S/N-arvoja ja Z´-tekijää. Yhteisviljelmämenetelmässä optimoitiin kuoppalevylle istutettavien solujen määrä, infektoinnissa käytettävä bakteerimäärä (MOI) ja inkubointiaika. Menetelmä validoitiin tunnettujen antimikrobiyhdisteiden avulla.

Tutkittavien yhdisteiden seulonta suoritettiin kaksivaiheisesti. Ensin kaikille tutkittaville yhdisteille tehtiin perusantibakteerimääritys turbidimetrisellä menetelmällä. Seulottavia yhdisteitä olivat betuliinijohdannaiset (65 kpl), afrikkalaisista kasveista eristetyt puhdasaineet (11 kpl) ja maaperäuutteet (2 kpl). Primaariseulonnassa *S. aureusta* vastaan aktiiviseksi osoittautuivat betuliinijohdannaisista Kme I 17, Kme I 21, SAL-II-32 ja Asa-XV-173F sekä afrikkalaisista kasveista eristetyistä puhdasaineista yhdisteet IC 001 ja IC

002. Primaariseulonnassa aktiiviseksi osoittautuneet yhdisteet jatkotestattiin annosvastemäärityksenä yhteisviljelmämenetelmällä, mutta millään tutkituista yhdisteistä ei havaittu antimikrobista aktiivisuutta *S. aureusta* vastaan. Tämän vuoksi haluttiin testata yhteisviljelmämenetelmässä käytetyn RN-mediumin vaikutus tutkittujen yhdisteiden aktiivisuuteen. Havaittiin, että mediumilla oli heikentävä vaikutus yhdisteiden aktiivisuuteen.

Yhteisviljelmämenetelmällä saadaan paljon informaatiota (MIC, IC_{50}, CC_{50} ja SI) yhdellä testillä ja se soveltuu hyvin lupaavien yhdisteiden jatkotestaukseen. Menetelmän rajoituksena ovat pitkät inkubaatioajat, jonka seurauksena lyhytkestoisesti vaikuttavien yhdisteiden tehoa ei välttämättä havaita. Menetelmän erityispiirteiden, kuten mediumin sisältämien komponenttien, mahdollinen vaikutus tutkittavien yhdisteiden stabiiliuteen on myös syytä huomioida tulosten arvioinnissa.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Adam G, Dunkan H: Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Soil Biol Biochem 33: 943-951, 2001

Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J: Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. Eur J Pharm Sci 29: 1-13, 2006

Albus A, Arbeit RD, Lee JC: Virulence of *Staphylococcus aureus* Mutants Altered in Type 5 Capsule Production. Infect Immun 59(3): 1008-1014, 1991

Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB: Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus.* Diagn Micr Infec Dis 2(2): 85-91, 1984

Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L: Presence of icaA and icaD Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. J Clin Microbiol 39(6): 2151–2156, 2001

Arvidson S: Extracellular enzymes. Kirjassa Gram-Positive Pathogens, ss. 463, 1. painos. Toim. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, ASM Press, Washington DC 2000

Bates DM, von Eiff C, McNamara PJ, Peters G, Yeaman MR, Bayer AS, Proctor R: *Staphylococcus aureus* menD and hemB Mutants Are as Infective as the Parent Strains, but the Menadione Biosynthetic Mutant Persist within the Kidney. J Infect Dis 187: 1654-1661, 2003

Baumert N, von Eiff C, Schaaf F, Peters G, Proctor RA, Sahl H-G: Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants. Microb Drug Resist 8(4): 253-260, 2002

Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR: Identification of Genes Involved in Polysaccharide-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. PLoS ONE 5(4): e10146, 2010

Bronner S, Monteil H, Prévost G: Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microbiol Rev 28: 183–200, 2004

Burian M, Rautenberg M, Kohler T, Fritz M, Krismer, B, Unger C, Hoffmann WH, Peschel A, Wolz C, Goerke C: Temporal Expression of Adhesion Factors and Activity of Global Regulators during Establishment of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. J Infect Dis 204(9): 1414-1421, 2010

Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA: Aminoglycoside-Resistance Mechanisms in Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. Curr Microbiol 56: 558-562, 2008

Chandramu C, Manohar RD, Krupadana DGL, Dashavantha RV: Isolation, Characterization and Biological Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid from Vitex negundo L. Phytother Res 17: 129–134, 2003

Cheung AL, Zhang G: Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. Front Biosci 7: 1825-1842, 2002

Choi Y, kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J: Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8941-8945, 1989

Clarke JM, Gillings MR, Altavilla N, Beattie AJ: Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. J Microbiol Meth 46: 261–267, 2001

Coates A, Hu Y, Bax R, Page C: The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. Nat Rev Drug Disc, 1: 895-910, 2002

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ,1 Karchmer AW, Carmeli Y: Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. Clin Infect Dis 36: 53–9, 2003

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF: Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 375: 1557–1568, 2010

Dingens MM, Orwin PM, Schlievert PM: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 13(1): 16-34, 2000

Donadio S, Carrano L, Brandi L, Serina S, Soffientini A, Raimondi E, Montamini N, Sosio M, Gualerzi CO: Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. J Biotechnol 99: 175-185, 2002

Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy M-E, Vandenesch F, Thomas L, Etienne J: Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. J Compilation 157: 1161–1167, 2007

Eidhin DE , Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ: Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 30(2): 245 – 257, 2002

von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G: Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. New Engl J Med 344(1): 11-16, 2001

von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Götz F: A site-directed *Staphyococcus aureus hem*B mutant is a small-colony variant which persists intracellulary. J Bacteriol 179: 4706-12, 1997

EMEA: Technical report, The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. EMEA/576176/2009, Stockholm, 10.2900/2518, 2009

Fluit AC, Wielders CLC,Verhoef J, Schmitz F-J: Epidemiology and Susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* Isolates from 25 University Hospitals Participating in the European SENTRY Study. J Clin Microbiol 39(10): 3727-3732, 2001

Fontanaya S, Grare M, Mayer J, finance C, Duval RE: Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. J Ethnopharmacol 120: 272-276, 2008

Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M: Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibrinonectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β1 integrins. Eur J Cell Biol 79: 672-679, 2000

ForestSpeCs: About FORESTSPECS. Haettu 16.12.2009 internetistä: http://www.forestspecs.eu/

Foster TJ, Höök M: Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus.* Trends Microbiol 6(12): 484-488, 1998

Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Tranum-Jensen J, Kranz T, Wellensiek H-J: On the mechanism of Membrane Damage by *Staphylococcus aureus* α-Toxin. J Cell Bio 91: 83-94, 1981

Gillespie MT, Lyon BR, Messerotti LJ, Skurray RA: Chromosome- and plasmid-mediated gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus* encoded by Tn4001. J Med Microbiol 24: 139-144, 1987

Giraudo AT, Cheung AL, Nagel R: The sae locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch Microbiol 168: 53–58, 1997

Gordon RJ, Lowy FD: Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis 46: 350–9, 2008

Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP: Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contibutes to Infection. J Immunol 164: 3713-3722, 2000

Grundmeier M, Tuchscherr L, Brück M, Viemann D, Roth J, Wilscher E, Becker K, Peters G, Löffler B: Staphylococcal Strains Vary greatly in Theis Ability to Induce an Inflmmatory Response in Endothelial Cells. J Infect Dis 201: 871-880, 2010

Haggar A, Flock J-I, Norrby-Teglund A: Extracellular adherence protein (Eap) from *Staphylococcus aureus* does not function as a superantigen. Clin Microbiol Infect,10.1111/j.1469-0691.2009.03058.x, 2009

Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, Vemachio JH, Syribeys PJ, Gorovits EL, Johnson MA, Ross JM, Hutchins JT, Patti JM: Characterization of a Protective Monoclonal Antibody Recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM Protein Clumping Factor A. Infect Immun 71(12): 6864–6870, 2003

Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal SG, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M: Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. Blood 96(6): 2149-2156, 2000

Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S: *Staphylococcus aureus* α-Toxin Dual mechanism of Binding to Target Cells. J Biol Chem 266(26): 17198-17200, 1991

Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NJP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG, Spratt BG, Parkhill J: Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. PNAS 101(26): 9786 –9791, 2004

Honda T, Liby KT, Su X, Sundararajan S, Honda Y, Suh N, Risingsong R,Williams CR, Royce DB, Spornb MB, Gribblea GW: Design, synthesis, and anti-inflammatory activity both *in vitro* and *in vivo* of new betulinic acid analogues having an enone functionality in ring A. Bioorg Med Chem Letters 16: 6306–6309, 2006

Hope R, Livermore DM, Brick G, Lillie M, Reynolds R: Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteremias in the UK and Ireland, 2001–06. J Antimicrob Chemother 62(2): ii65-ii74, 2008

Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. Antimicrobial Activity of Oleanic Acid from *Salvia officinalis* and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). Biol Pharm Bull 30(6): 1147-1149, 2007

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesh F: Relationships between Staphylococcus aureus Genetic Background, Virulence Factor, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. Infect Immun 70(2): 631-641, 2002

Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A: *Staphylococcus aureus* Resists Human Defensins by Production of Staphylokinase, a Novel Bacterial Evasion Mechanism. J Immunol 172: 1169-1176, 2004

Jones M, Visser MR, Klootwijk M, Heisig P, Verhoef J, Schmitz F-J: Comparative Activities of Clinafloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, and Trovafloxacin and Nonquinolones Linozelid, Quinupristin-Dalfopristin, Gentamicin, and Vancomycin against Clinical Isolates of Ciprofloxacin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. Antimicrob Agents Ch 43(2):421-421, 1999

Jonsson I-M, von Eiff C, Proctor RA, Peters G, Ryden C, Tarkowski A: Virulence of a hemB mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. Microb Pathogenesis 34: 73-79, 2003

Kahl B, Herrman M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor R, Peters G: Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. J Infect Dis 177: 1023-1029, 1998

Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K: A Novel Gene, fudoh, in the SCCmec Region Supresses the Colony Spreading Ability and Virulence of *Staphylococcus aureus*. Plos One, 3(2): e3921, 2008

Karakawa WW, Fournier JM, Vann WF, Arbeit R, Schneerson RS, Robbins JB: Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. J Clin Micrbiol 22(3): 445-447, 1985

Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF: Capsular Antibodies Induce Type-Specific Phagocytosis of Capsulated *Staphylococcus aureus* by Human Polymorphonuclear Leukocytes. Infect Immun 56(5): 1090-1095, 1988

Karden-Lilja M, Ibrahem S, Vuopio-Varkila J, Salmelinna S, Lyytikäinen O, Siira L, Virolainen A: Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal chromosomal cassette *mec* types amongst Finnish community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, 1997–1999. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26: 729–733, 2007

Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H: Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. J Biochem 98(6): 1603-1614, 1985

Kerttula A-M, Lyytikäinen O, Virolainen-Julkunen A, Vuopio-Varkila J: Perimätutkimukset valaisevat Suomen huonontuneen MRSA-tilanteen taustaa. Suomen Lääkärilehti 61: 21–22, 2006

Khatib R, Johnson LB, Fakih MG, Riederer K, Khosrovaneh A, Thabriz MS, Sharma M, Saeed S: Persistence in *Staphylococcus aureus* bacteremia: Incidence, characteristics of patients and outcome. Scand J Infect Dis 38: 7-14, 2006

Kleymann G, Werling H-O: A generally applicable, high-throughput screening-compatible assay to identify, evaluate, and optimize antimicrobial agents for drug therapy. J Biomol Screen 9(7): 578-587, 2004

Kommera H, Kaluderović G, Kalbitz J, Paschke R: Lupane triterpenoids – Betulin and betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells. Invest New Drugs DOI 10.1007/s10637-009-9358-x, 2009

Kraus D, Herbert S, Kristian SA, Khosravi A, Nizet V, Götz F, Peschel A: The GraRS regulatory sytem controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses. BMC Microbiol 8:85, 2008

KTL: Veriviljelypositiiviset sairaalainfektiot vuosina 1999–2006. Haettu internetistä 10.5.2010: http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_b/2007/2007b20.pdf

Kuklin NA, Clark DJ, Secore S, Cook J, Cope LD, McNeely T, Noble L, Brown MJ, Zorman JK, Wang XM, Pancari G, Fan H, Isett K, Burgess B, Bryan J, Brownlow M, George H, Meinz M, Liddell ME, Kelly R, Schultz L, Montgomery D, Onishi J, Losada M, Martin M, Ebert T, Tan CY, Schofield TL, Nagy E, Meineke A, Joyce JG, Kurtz MB, Caulfield MJ, Jansen KU, McClements W, Anderson AS: A Novel *Staphylococcus aureus* Vaccine: Iron Surface Determinant B Induces Rapid Antibody Responses in Rhesus Macaques and Specific Increased Survival in a Murine S. aureus Sepsis Model. Infect Immun 74(4): 2215–2223, 2006

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, kobayasha I, Cui L, Oguchi A, Aoki K-I, nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R-I, Kaito C, Sekimizu S, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K: Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 357: 1225-1240, 2001

Ladhani S: Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphyloccus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 39: 181-189, 2003

Landy M: Increased Synthesis of p-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*. Science 97(2516): 265-267, 1943

Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, Vandenesh F, Etienne J: Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clin Infect Dis 29: 1128–32, 1999

Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V: *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. JEM 202(2): 209–215, 2005

Lorian V: Antibiotics in laboratory medicine. 5. painos, Lippincott Williams & Wilkins. 2005

Lowy FD: *Staphylococcus aureus* infections. New Engl J Med 339(8): 520-532, 1998

Lowy FD: Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 111: 1265–1273, 2003

Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, Novick RP, Barbe J, Penades JR: β-Lactam Antibiotics Induce the SOS Response and Horizontal Transfer of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 188(7): 2726–2729, 2006

Mandell G: Catalase, Superoxide Dismutase,and Virulence of *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo Studies with Emphasis on Staphylococcal-Leukocyte Interaction. J Clin Invest 55: 561-566, 1975

Marty FM, Yeh WW, Wennersten CB, Venkataraman L, Albano E, Alyea EP, Gold HS, Baden LR, Pillai SK: Emergence of a Clinical Daptomycin-Resistant Staphylococcus aureus Isolate during Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Osteomyelitis. J Clin Microbiol 44(2): 595–597, 2006

Massey RC, Kantzanou MN, Fowler T, Day NPJ, Schofield K, Wann ER, Berendt AR, Höök M, Peacock SJ: Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. Cell Microbiol 3(12): 839-851, 2001

Matsubara K, Fukaya T, Miwa K, Shibayama N, Nigami H, Harigaya H, Nozaki H, Hirata T, Baba K, Suzuki T, Ishiguro A: Development of serum IgM antibodies against superantigens of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol, 143: 427–434, 2006

Mesak LR, Davies J: Phenotypic changes in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus.* Res Microbiol 160: 785-791, 2009

Naimi T, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne j, Johnson Sk, Vandenesch F, Fridkin S, O´Boyle C, Danila Rn, Lynfield R: Comparison of community- and health Care-Assosiated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. JAMA 290(22): 2976-2984, 2003

Nishijima S, Kurokawa I: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from skin infections. Int J Antimicrob Agents 19: 241–243, 2002

Nordström T, Lannegård J, Hughes D: Genetic and Phenotypic Identification of Fusidic Acid-Resistant Mutants with the Small-Colony-Variant Phenotype in *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Ch 51(12): 4438-4446, 2007

Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S: Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. The EMBO J 12(10): 3967-3975, 1993

O'Riordan K, Lee JC: *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. Clin Microbiol Rev 17(1): 218–234, 2004

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M: MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. Annu Rev Microbiol 48: 585-617, 1994

Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL: Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. Nature Rev Drug Disc 6: 29-40, 2007

Peacock SJ, Moore CE, Kantzanou AJM, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NPJ: Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus.* Infect Immun 70(9): 4987–4996, 2002

Peterson PK, Wilkinson BJ, Kim Y, Schmeling D, Quie PG: Influence of Encapsulation on Staphylococcal Opsonization and Phagocytosis by Human Polymorhonuclear Leukocytes. Infect Immun 19(3): 943-949, 1978

Pillar CM, Draghia DC, Sheehanb DJ, Sahma DF: Prevalence of multidrug-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: findings of the stratified analysis of the 2004 to 2005 LEADER Surveillance Programs. Diagn Micr Infect Dis 60: 221–224, 2008

Plata K, Rosato AE, Węgrzyn G: *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochim Pol 56(4): 597–612, 2009

Pohjala L, Alakurtti S, Ahola T, Yli-Kauhaluoma J, Tammela P: Betulin-derived compounds as inhibitors of alphavirus replication. J Nat Prod 72: 1917-1926, 2009

Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L, Fournier M: Prevalence of Capsular Polysaccharide Types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* Isolates from Cow, Goat, and Ewe Milk. J Clin Microbiol 26(1):38-40, 1988

Proctor RA: Respiration and Small-Colony Variants of Staphylococcus aureus. Kirjassa Gram-Positive Pathogens, ss. 463, 1. painos. Toim. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, ASM Press, Washington DC 2000

Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G: Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nature Rev Microbiol 4: 295-305, 2006

Projan SJ: Antibiotic resistance in the Staphylococci. Kirjassa Gram-Positive Pathogens, ss. 463, 1. painos. Toim. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, ASM Press, Washington DC 2000

Projan SA, Shlaes DM: Antibacterial drug discovery: is it all downhill from her? Clin Microbiol Infect 10(4): 18-22, 2004

Pujol M, Pena C, Pallares R, Ariza J Ayats J, Dominguez MA, Gudiol F: Nosocomial Staphylococcus aureus Bacteremia among Nasal Carriers of Methicillin-resistant and Methicillin susceptible Strains. Amer J Med 100: 509-516, 1996

Robinson JO, Pearson JC, Christiansen KJ, Coombs GW, Murray RJ: Community-associated versus healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a 10-year retrospective review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28: 353–361, 2009

Rogers BA, Drake AK, Spelman D: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Endocarditis in an Australian Tertiary Hospital: 1991–2006. Heart, Lung and Circulation, 18: 208–213, 2009

Rowland SJ, Dyke KG: Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol 4(6): 961-75, 1990

Sabath LD, Garner C, Wilcox C, Finland M: Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to 65 Antibiotics. Antimicrob Agents Ch 9(6): 962-969, 1976

Schaaff F, Bierbaum G, Batrmann P, Sahl H-G: Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 293: 427-435, 2003

Schühly W, Heilmann J, Çalis I, Sticher O: New Triterpenoids with Antibacterial Activity from Zizyphus joazeiro. Planta Med 65(8): 740-743, 1999

Sendi P, Proctor RA: *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. Trends in Microbiology 17(2): 54-58, 2008

Shinefield H, Black S, Fattom A, Horswith G, Rasgon S, Ordonez J, Yeoh H, Law D, Robbins JB, Schineerson R, Muenz L, Nso R: Use of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. N Engl J Med 346(7): 491-496, 2002

Smith PF, Ogundele A, Forrest A, Wilton J, Salzwedel K, Doto J, Allaway GP, Martin DE: Phase I and II Study of the Safety, Virologic Effect, and

Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Single-Dose 3-O-(3´,3´-Dimethylsuccinyl) Betulinic Acid (Bevirimat) against Human Immunodeficiency Virus Infection. Antimicrob Agents Ch 51(10): 3574–3581, 2007

Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE: Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the future. Clinical Infectious Diseases, 38:1279-86, 2004
Steele JCP, Warhurst DC, Kirby GC, Simmonds MSJ: In Vitro and In Vivo Evaluation of Betulinic Acid as an Antimalarial. Phytother Res 13: 115–119, 1999

Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R: Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Ch 61: 26–38, 2008

Thakker M, Park J-S, Carey V, Lee JC: *Staphylococcus aureus* Serotype 5 Capsular Polysaccharide Is Antiphagocytic and Enhances Bacterial Virulence in a Murine Bacteremia Model. Infect Immun 66(11): 5183-5189, 1998

Steele JPC, Warhurst DC, Kirby GC, Simmonds MSJ: In vitro and in vivo evaluation of batulinic acid as an antimalarial. Phytother res 13: 115-119, 1999

Thakker M, Park J-S, Carey V, Lee JC: *Staphylococcus aureus* Serotype 5 Capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. Infect Immun 66(11): 518-5189, 1998

Tiemersma EW, Bronzwaer S, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundmann H: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. Emerging Infectious Diseases, 10(9):1627-1634, 2004

Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering Jr RC, Ferraro MJ: Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus.* Lancet 358: 207–08, 2001

Vaara M, Saxén H: Uudet bakteerilääkkeet. Duodecim, 115: 2259–64, 1999

Vaudaux P, Francois P, Bisognano C ym: Increased expression of clumbing factor and fibrinonectin-binding proteins by small colony variants of *Staphylococcus aureus.* Infect Immun, 70:5428-37, 2002

Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, Boubekri I, Vogel CP, Badiou C, Bes M, Vandenesch M, Tazir M, Hooijkaas H, Verbrugh H, Belkum A, Etienne J, Lina G, Ramdani-Bouguessa N, Wamel WA: Immunogenity of Toxins during *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis 50: 61-8, 2010

Wann ER, Gurusiddappa S, Höök M: The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* Is a Bifunctional Protein That Also Binds to Fibrinogen*. J Biolog Chem 275:18(5): 13863–13871, 2000

Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neuemeister B, Mond JJ, Peschel A: Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. Nature Med 10(3): 243-245, 2004

Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, Mcdougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 302(28): 1569-1571, 2003

Werhtheim HF, Melles DC, Vos MC, Leeuwen W, Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 5: 751-762, 2005

Werner G, Cuny C, Schmitz F-J, Witte W: Methicillin-Resistant, Quinupristin-Dalfopristin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Sensitivity to Glycopeptides. J Clin Microbiol 39(10): 3586–3590, 2001

Wilkinson BJ, Sisson SP,2 Kim Y, Peterson PK. Localization of the Third Component of Complement on the Cell Wall of Encapsulated *Staphylococcus aureus* M: Implications for the Mechanism of Resistance to Phagocytosis. Infect Immun 26(3): 1159-1163, 1979

Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai1 M: Identification of the Staphylococcus aureus etd Pathogenicity Island Which Encodes a Novel Exfoliative Toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun 70(10): 5835–5845, 2002

Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D: Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. J Infect Chemother DOI 10.1007/s10156-010-0045-9, 2009

Yun Y, Han S, Park E, Yim D, Lee S, Lee C-K, Cho K, Kim K: Immunomodulatory Activity of Betulinic Acid by Producing Pro-Inflammatory Cytokines and Activation of Macrophages. Arch Pharm Res 26(12): 1087-1095, 2003

Zhang J-H, Chung T, Oldenburg K: A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High-Throughput Screening Assays. J Biomol Screen 4(2): 67-73, 1999

Zoll S, Pätzold B, Schlag M, Götz F, Kalbacher H, Stehle T: Structural Basis of Cell Wall Cleavage by a Staphylococcal Autolysin. PLoS Pathogens, 6(3): e1000807, 2010

LIITE 1

Bakteerien kasvatuksessa käytettyjen kasvatusliuosten ja ravintoagarin koostumukset.

MH-liemi

Müeller Hinton Broth I/II	BBL™	2011-11-30 2012-07-31	21 g 22 g
Tislattu vesi	Millipore MilliQ		1 l

Ravintoagar

Nutrient agar	LabM		28 g
Tislattu vesi	Millipore MilliQ		1 l

LIITE 2

Kokeellisessa työssä käytetyt reagenssit ja antimikrobiset yhdisteet.

Yhdiste	**Valmistaja**	**Tuotenumero**
Fluoreskeiinidiasetaatti (FDA)	Sigma Chemicals	209-877-6
Siprofloksasiini	ICN Biomedicals	1-800-854-0530
Erytromysiini	Sigma Chemicals	204-040-1
Kloramfenikoli	Sigma Chemicals	200-287-4
Gentamysiini	Fluka BioChemical	2157789
Ofloksasiini	ICN Biomedicals	1-800-854-0530
Penisilliini	Fluka BioChemical	13752-5G-F
Ampisilliini	Sigma Chemicals	200-708-1
Vankomysiini	Sigma	V2002-1G
Polymyksiini B	Sigma Chemicals	215-774-7
Spektinomysiini	Sigma Chemicals	-
Doksisykliini	ICN Biomedicals	1-806-854-0530

LIITE 3

Solujen kasvatuksessa ja irrotuksessa käytettyjen liuosten koostumukset.

RN-medium

RPMI 1640	BioWhittaker	BE23-167F	500 ml
naudan sikiöseerumi (FBS, engl fetal bovine serum)	BioWhittaker, South American origin	DE14-801F	37,5 ml
L-glutamiini	BioWhittaker	17-605E	6 ml
Penisilliini-streptomysiiniliuos (10 000 IU)	BioWhittaker	DE17-602E	5 ml

Solujen irrotuspuskuri 0,25 % Trypsiini-PBS

2,5 % trypsiini	BioWhittaker	17-160E	3 ml
Fosfaattipuskuri (PBS, engl. phosphate buffered saline)	BioWhittaker	BE17-516F	27 ml

LIITE 4

Primaariseulonnassa seulotut betuliinijohdannaiset.

Synteesikoodi	M (g/mol)	Molekyylikaava	Alkuperä
SAL-II-114	744,0	$C_{43}H_{57}N_3O_8$	Sami Alakurtti
SAL-II-115	740,0	$C_{45}H_{61}N_3O_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-116	714,0	$C_{43}H_{59}N_3O_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-117	730,0	$C_{43}H_{59}N_3O_7$	Sami Alakurtti
SAL-II-123	718,0	$C_{42}H_{56}FN_3O_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-124	744,9	$C_{42}H_{56}N_4O_8$	Sami Alakurtti
SAL-II-129	734,4	$C_{42}H_{56}ClN_3O_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-134	468,7	$C_{31}H_{48}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-135	470,7	$C_{31}H_{50}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-136	444,8	$C_{30}H_{52}O_2$	Sami Alakurtti
SAL-II-138A	440,7	$C_{30}H_{48}O_2$	Sami Alakurtti
SAL-II-138B1	468,7	$C_{30}H_{48}N_2O_2$	Sami Alakurtti
SAL-II-138B2	455,7	$C_{30}H_{49}NO_2$	Sami Alakurtti
SAL-II-141	493,8	$C_{32}H_{48}N_2O_2$	Sami Alakurtti
SAL-II-153	514,8	$C_{33}H_{54}O_4$	Sami Alakurtti
SAL-II-156	456,7	$C_{30}H_{48}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-5A	975,7	-	Sami Alakurtti
SAL-16A	695,1	-	Sami Alakurtti
SAL-16B	568,9	-	Sami Alakurtti
SAL-100	442,7	-	Sami Alakurtti
SAL-II-5	484,8	$C_{32}H_{52}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-9	482,8	$C_{32}H_{50}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-22	424,7	$C_{30}H_{48}O$	Sami Alakurtti
SAL-II-29	466,8	$C_{32}H_{50}O_2$	Sami Alakurtti

SAL-II-32	454,7	$C_{30}H_{46}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-51	526,8	$C_{34}H_{54}O_4$	Sami Alakurtti
SAL-II-59	526,8	$C_{34}H_{54}O_4$	Sami Alakurtti
SAL-II-64	699,9	$C_{42}H_{57}N_3O_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-68	456,7	$C_{30}H_{48}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-69	542,8	$C_{34}H_{54}O_5$	Sami Alakurtti
SAL-II-72	597,8	$C_{36}H_{55}NO_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-82	438,7	$C_{30}H_{46}O_2$	Sami Alakurtti
SAL-II-97b	526,9	$C_{35}H_{58}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-100	569,0	$C_{36}H_{60}O_4$	Sami Alakurtti
SAL-II-101	484,8	$C_{32}H_{52}O_3$	Sami Alakurtti
SAL-II-103	526,9	$C_{33}H_{54}O_5S$	Sami Alakurtti
PBeI-51	1143,8	$C_{74}H_{126}O_8$	Sami Alakurtti
PBeI-61	639,0	-	Sami Alakurtti
PBeI-76	793,2	-	Sami Alakurtti
PBeI-80	592,9	$C_{40}H_{64}O_3$	Sami Alakurtti
PBeI-82	545,7	-	Sami Alakurtti
PBeI-86	633,0	-	Sami Alakurtti
PBeI-89	633,0	$C_{42}H_{64}O_4$	Sami Alakurtti
Asa XV-173F	603,9	-	Sami Alakurtti
Asa-XVI-181D	547,8	$C_{36}H_{53}NO_3$	Sami Alakurtti
Asa-XV-5BII	572,8	$C_{39}H_{56}O_3$	Sami Alakurtti
Kme I 11	643,0	$C_{40}H_{70}N_2O_4$	Sami Alakurtti
Kme I 17	827,0	$C_{48}H_{58}O_{12}$	Sami Alakurtti
Kme I 21	811,1	$C_{44}H_{58}O_{10}S_2$	Sami Alakurtti
Kme I 25	554,8	$C_{36}H_{58}O_4$	Sami Alakurtti
Kme I 27	657,1	$C_{48}H_{90}Cl_2N_2O_4$	Sami Alakurtti
Kme I 31	811,4	$C_{54}H_{102}Cl_2N_2O_2$	Sami Alakurtti

THe 25	762,0	$C_{47}H_{59}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 27	665,9	$C_{39}H_{59}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 29	694,0	$C_{41}H_{63}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 31	694,0	$C_{41}H_{63}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 33	774,1	$C_{47}H_{71}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 41	824,1	$C_{52}H_{61}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 45	651,9	$C_{38}H_{57}N_3O_6$	Sami Alakurtti
THe 57	680,0	$C_{40}H_{61}N_3O_6$	Sami Alakurtti
SAL-II-133	615,9	-	Sami Alakurtti
SAL-II-140	506,8	$C_{32}H_{49}NO_2$	Sami Alakurtti
SAL-III-10	816,2	$C_{50}H_{77}N_3O_6$	Sami Alakurtti
Eme 2	638,9	$C_{40}H_{62}O_6$	Sami Alakurtti
Eme 8	588,4	$C_{38}H_{52}O_5$	Sami Alakurtti