

Ella Koskinen

# MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuus eläinlääketieteellisesti merkittävien *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien tunnistuksessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

02.12.2015

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Ella Koskinen MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuus eläinlääketieteellisesti merkittävien <i>Pasteurellaceae</i> -heimon bakteerien tunnistuksessa  61 sivua + 2 liitettä 02.12.2015
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Kirsti Pelkola Lehtori Juha E. A. Knuutila
<p><i>Pasteurellaceae</i>-heimoon kuuluvat lajit ovat gram-negatiivisia, pääosin liikkumattomia bakteereita. Ne ovat muodoltaan sauvoja tai kokkoideja, ja hapen suhteen aerobeja, fakultatiivisia anaerobeja tai mikroaerofiileja.</p> <p>Suuri osa heimon lajeista elää kommensaaleina selkärankaisten, lintujen sekä matelijoiden limakalvoilla, osa taas toimii tuotantoeläinten primäärisinä tai opportunistisina patogeeneinä. Vaikka suurinta osaa <i>Pasteurellaceae</i>-heimon bakteereista tavataan eläinten limakalvoilla luonnostaan löytyy heimosta myös vakavia sairauksia aiheuttavia patogeenejä.</p> <p>Matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria (MALDI-TOF MS) on menetelmä, joka hyödyntää massaspektrometriaa luoden tarkan, nopean sekä kustannustehokkaan tavan luokitella sekä karakterisoida mikrobeja. MALDI-TOF MS -menetelmän avulla tapahtuva mikrobien nopea karakterisointi tarjoaa mahdollisuuden menetelmän hyödyntämisen lääketieteellisen diagnostiikan lisäksi muun muassa ympäristön valvonnassa, bioturvallisuuden ylläpitämisessä sekä elintarvikkeiden laadunvalvonnassa.</p> <p>Insinööriyössä tutkittiin MALDI-TOF MS -menetelmän käyttökelpoisuutta <i>Pasteurellaceae</i>-heimoon kuuluvien, eläinlääketieteellisten merkittävien bakteerien tunnistuksessa laajentamalla laitteen alkuperäistä bakteerikirjastoa sekä tutkimalla heimon eri bakteerisukujen tunnistumista. Tämän lisäksi menetelmää verrattiin käytössä oleviin perinteisiin tunnistusmenetelmiin.</p> <p>Alkuperäisen bakteerikirjaston laajentaminen onnistui ja saadut tulokset osoittavat, että MALDI-TOF MS -menetelmä soveltuu hyvin <i>Pasteurellaceae</i>-heimon bakteerien identifioimiseen. Menetelmän käyttö tiettyjen bakteerilajien identifioimisessa vaatii vielä lisätäystä suuremmalla määrällä varmistettuja bakteerikantoja. MALDI-TOF MS -menetelmän sekä perinteisten biokemiallisten menetelmien vertailussa havaittiin, että MALDI-TOF MS -menetelmä soveltuu biokemiallisia menetelmiä paremmin tiettyjen <i>Pasteurellaceae</i>-heimon bakteerisukujen identifiointiin sen ollessa nopeampi, yksinkertaisempi sekä halvempi vaihtoehto.</p>	
Avainsanat	MALDI-TOF MS, massaspektrometria, eläinlääketiede, <i>Pasteurellaceae</i> , bakteeri

Author(s) Title	Ella Koskinen Suitability of the MALDI-TOF MS for the identification of animal <i>Pasteurellaceae</i> significant in the field of veterinary diagnostics
Number of Pages Date	61 pages + 2 appendices 2 December 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Kirsti Pelkola, Senior Researcher Juha E. A. Knuutila, Senior Lecturer
<p>Species of the family <i>Pasteurellaceae</i> are Gram-negative, rod- or coccoid-shaped aerobic, facultatively anaerobic or microaerophilic bacteria.</p> <p>Most of the species occur as commensals on mucous surfaces of vertebrates, birds and reptiles. Some of the species, however, are opportunistic or primary pathogens in many farm animals. Although most of the species of <i>Pasteurellaceae</i> inhabit the mucosal membranes of many animals naturally, some bacterial species can cause severe diseases.</p> <p>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a method utilizing mass spectrometry to create an accurate, fast and cost-effective way to identify and characterize microbes. The fast identification of microbes using MALDI-TOF MS allows this technology to be used in medical diagnostics as well as environmental monitoring, maintenance of biosafety and in the quality control of food.</p> <p>The aim of this thesis was to determine the potential of MALDI-TOF MS for identification of animal <i>Pasteurellaceae</i> in the field of veterinary diagnostics. The potential of this technology was determined by complementing the existing library of <i>Pasteurellaceae</i> strains and by investigating how well different species of the family are identified with this method. The performance of the MALDI-TOF MS was also compared with different traditional identification methods commonly used for the identification of <i>Pasteurellaceae</i> species.</p> <p>Expansion of the existing library of <i>Pasteurellaceae</i> strains was successful and results indicate that MALDI-TOF MS is a potential identification method for the species of <i>Pasteurellaceae</i>. However, identification of some of the species should be confirmed with a larger set of bacterial strains. MALDI-TOF MS was shown to suit better for the identification for the species of the family <i>Pasteurellaceae</i>, the technology being more rapid, simple and cost-effective compared with traditional identification methods.</p>	
Keywords	MALDI-TOF MS, mass spectrometry, veterinary diagnostics, <i>Pasteurellaceae</i> , bacteria

## Sisällys

### KIRJALLINEN OSIO

1	Johdanto	1
2	<i>Pasteurellaceae</i> -heimo	1
2.1	Yleistä	1
2.2	Eläinlääketieteellisesti merkittävimmät suvut	1
2.2.1	<i>Actinobacillus</i>	2
2.2.2	<i>Pasteurella</i> ja <i>Mannheimia</i>	3
2.2.3	<i>Haemophilus</i> ja <i>Histophilus</i>	5
2.2.4	<i>Bibersteinia</i>	6
2.2.5	<i>Avibacterium</i>	7
3	<i>Pasteurellaceae</i> -heimon bakteerien identifikaatio	8
3.1	Perinteiset menetelmät	8
3.1.1	Bakteeriviljely	8
3.1.2	Gram-värijäys	9
3.1.3	Biokemialliset testit ja testisarjat	10
4	MALDI-TOF MS	12
4.1	Yleistä	12
4.2	MALDI-TOF MS -menetelmä bakteerintunnistuksessa	13
4.2.1	Toimintaperiaate	13
4.2.2	Tulosten analysointi	15
4.3	Näytteen käsittely	17
4.3.1	Matriisi	18
4.3.2	Suora menetelmä	18
4.3.3	Uuttomenetelmät	19
4.4	Tuloksiin vaikuttavia tekijöitä	20
4.4.1	Näytteen käsittely ja inkubaatioaika	21
4.4.2	Kasvatusalusta	22
4.4.3	Kirjaston kattavuus	23
4.4.4	MALDI-TOF MS -laitteisto	24

## KOKEELLINEN OSIO

5	Työn tarkoitus	25
6	Materiaalit	25
6.1	Työssä käytetyt kannat	25
6.2	Kantojen viljely	27
7	Menetelmät	27
7.1	Referenssispektrien luominen	27
7.1.1	Kantojen käsittely	28
7.1.2	BTS:n sekä kantojen ajo	28
7.1.3	BTS-spektrien tarkastaminen	29
7.1.4	Spektrien esikäsittely	29
7.1.5	Spektrien käsittely	31
7.2	<i>Pasteurellaceae</i> -heimon bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysi	32
7.3	MSP-dendrogrammit	33
7.4	<i>Mannheimia</i> -suvun bakteerien identifikaatio perinteisillä menetelmillä	33
7.5	<i>Pasteurella</i> -suvun bakteerien identifikaatio perinteisillä menetelmillä	34
8	Tulokset ja tulosten tarkastelu	35
8.1	MALDI-TOF MS -laitteen kirjastosta löytyvät bakteerikannat	35
8.2	MALDI Biotyper -laitteen kirjastoon itse lisätyt bakteerikannat	36
8.3	<i>Pasteurellaceae</i> -heimon bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysi	37
8.3.1	<i>Actinobacillus</i>	38
8.3.2	<i>Avibacterium</i>	40
8.3.3	<i>Bibersteinia</i>	41
8.3.4	<i>Haemophilus</i>	42
8.3.5	<i>Histophilus</i>	43
8.3.6	<i>Mannheimia</i>	44
8.3.7	<i>Nicoletella</i>	45
8.3.8	<i>Pasteurella</i>	46
8.3.9	Muut	47
8.4	MSP-dendrogrammit	48
8.5	Perinteiset identifikaatiomenetelmät	51
8.5.1	<i>Mannheimia</i> -suku	51
8.5.2	<i>Pasteurella</i> -suku	53
9	Yhteenveto	56

Liitteet

Liite 1. *Mannheimia* -testisarjan työohje

Liite 2. API 20NE -testin työohje

## 1 Johdanto

Insinööriyö toteutettiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran eläintautibakteriologian tutkimusyksikössä Helsingin laboratoriojaostossa.

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli kartoittaa MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuutta eläinlääketieteellisesti merkittävien *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifiointissa, kehittää laitteen tunnistuksen pohjana käytettävää bakteerikirjastoa sekä tarkastella menetelmän soveltuvuutta suhteessa jo olemassa oleviin perinteisiin identifikaatiomenetelmiin.

## 2 *Pasteurellaceae*-heimo

### 2.1 Yleistä

*Pasteurellaceae*-heimoon kuuluvista bakteerilajeista suuri osa on kommensaalisia bakteereita, jotka kolonisoivat pääasiassa ruuansulatuskanavan, genitaalialueiden sekä hengitysteiden limakalvoja muun muassa linnuilla, selkärankaisilla sekä matelijoilla. Osa lajeista on opportunistisia tai primaarisia patogeenejä, jotka aiheuttavat vakavia tauteja esimerkiksi monille tuotantoeläimille. Tästä syystä *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien nopea ja tarkka diagnosointi on erittäin tärkeää. [1, s. 716.]

Heimoon kuuluvat bakteerit ovat gram-negatiivisia, liikkumattomia ja muodoltaan yleensä sauvamaisia, filamentteja tai kokkoideja. Hapen suhteen bakteerit ovat aerobeja, fakultatiivisesti anaerobeja tai mikroaerofiileja. [2, s. 666.]

### 2.2 Eläinlääketieteellisesti merkittävimmät suvut

*Pasteurellaceae*-heimo koostuu tällä hetkellä 19:sta bakteerisuvusta, joihin kuuluu yli kuusikymmentä bakteerilajia ja joista löytyy eläinten lisäksi myös ihmiselle patogeenisia lajeja [3]. Vaikka suurin osa *Pasteurellaceae*-heimoon kuuluvista suvuista ja niihin luokitelluista lajeista on suhteellisen harmittomia kommensaalisia bakteereita, jotka elävät

monien eläinten limakalvoilla luonnostaan, löytyy joukosta myös useita lajeja, jotka ovat eläinlääketieteellisesti merkittäviä patogeenisiä taudinaiheuttajia. [4, s. 235.]

### 2.2.1 *Actinobacillus*

Monet *Actinobacillus*-sukuun kuuluvista lajeista ovat kommensaalisia, osa kuuluu eläinten patogeeneihin ja vain harvat aiheuttavat sairauksia ihmisille. Kaikki sukuun kuuluvat lajit ovat gram-negatiivisia, keskikokoisia, sauvamaisia bakteereita. Ne ovat myös liikkumattomia, usein oksidaasi-positiivisia, nitraattia pelkistäviä, fakultatiivisia anaerobeja. [5, s. 297.]

*Actinobacillus*-lajien luonnolliseen elinympäristöön kuuluvat isäntäeliöidensä lähengitysteiden limakalvot sekä suuontelo ja ne tulevat huonosti toimeen isäntäeliönsä ulkopuolella. Monet lajeista aiheuttavat merkittäviä tauteja eläimille. Bakteerit leviävät yleensä ilman välityksellä, läheisessä ihokontaktissa tai esimerkiksi bakteerin päästessä ihosta olevan haavan kautta eläimeen. [5, s. 297.] Taulukossa 1 on esitelty eläinlääketieteellisesti merkittävimpiä *Actinobacillus*-lajeja, niiden aiheuttamia tauteja sekä isäntäeliöinä tyypillisimmin toimivia eläimiä.



Taulukko 1. Eläinlääketieteellisesti merkittävimmät *Actinobacillus*-suvun lajit. [5, s. 298, muokattu]

Bakteerilaji	Isäntäeläin	Yleisimmät taudit
<i>Actinobacillus arthridis</i>	Hevonen	Niveltulehdus, verenmyrkytys
<i>A. capsulus</i>	Jänis	Niveltulehdus, verenmyrkytys
<i>A. equuli ssp. equuli</i>	Hevonen	Verenmyrkytys (sleepy foal disease)
	Sika	Verenmyrkytys
<i>A. equuli ssp. haemolyticus</i>	Hevonen	Kohtutulehdus, abortti, keuhkokuume, aivokalvontulehdus
<i>A. lignieresii</i>	Märehtijät	Actinobasilloosi, timber (wooden) tongue
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Sika	Keuhkotulehdus
<i>A. rossii</i>	Sika	Abortti, kohtutulehdus
<i>A. seminis</i>	Lammas	Hedelmättömyys, kivistulehdus
<i>A. suis</i>	Porsas	Verenmyrkytys, niveltulehdus
	Sika	Pleuropneumonia, aivokalvontulehdus, abortti

*Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteeri on esimerkki Suomessa esiintyvistä *Actinobacillus*-sukuun kuuluvasta taudinaiheuttajasta. Bakteeri aiheuttaa paiseisia keuhko- sekä keuhkokalvontulehduksia sioilla. Tauti ei ole ihmiseen tarttuva. Useat sikojen hengitystietulehduksia aiheuttavista bakteereista esiintyvät terveiden sikojen hengitysteissä luonnollisesti ja aiheuttavat tulehduksia vasta altistavien tekijöiden yhteisvaikutuksesta. Näitä voivat olla esimerkiksi stressi, lämpötilan liian suuret vaihtelut tai toiseen taudinaiheuttajaan liittyvä samanaikainen tulehdus. [6.]

### 2.2.2 *Pasteurella* ja *Mannheimia*

*Pasteurella* ja *Mannheimia* sukujen lajeista suurin osa on kommensaalisia eläinten sekä ihmisten patogeeneja. Lajit ovat gram-negatiivisia, liikkumattomia ja pienikokoisia. Ne ovat muodoltaan yleensä sauvamaisia, usein oksidaasi-positiivisia, fakultatiivisia anaerobeja. [5, s. 307.]

Lajien luonnolliseen elinympäristöön kuuluvat selkärankaisten, lintujen sekä ihmisten ylähengitysteiden sekä suoliston limakalvot. Lajit ovat levittäytyneet laajalle ja niiden isäntäeliöiden kirjo on laaja. Monet lajeista ovat kommensaalisia, toiset taas opportunistisia patogeeneja, jotka aiheuttavat useita sairauksia muun muassa sioille, nautoille, jäniksille sekä siipikarjalle. [7.] Bakteerit leviävät usein hengitysteiden tai esimerkiksi puremien välityksellä eläimestä toiseen. Myös erilaiset stressitekijät altistavat bakteerin tarttumiselle. [5, s. 307.] Taulukossa 2 on esitetty eläinlääketieteellisesti merkittävimpiä *Pasteurella*-lajeja sekä niiden aiheuttamia tauteja.

Taulukko 2. Eläinlääketieteellisesti merkittävimmät *Pasteurella*-suvun lajit. [5, s. 308, muokattu.]

Bakteerilaji	Isäntäeläin	Yleisimmät taudit
<i>Pasteurella multocida</i>		
Tyyppi A	Nauta	Osana kuljetuskuume -kompleksia, enzoottinen pneumonia
	Lammas	Pleuropneumonia, mastiitti (= utaretulehdus)
	Sika	Pneumonia, atrofinen rhiniitti
	Jänis	Pleuropneumonia, paiseet, korvatulehdus, silmätulehdus
	Siipikarja	Kanakolera
Tyyppi B	Nauta, vesipuhveli ja muut märehitijät	Epitsoottinen verenvuoto septikemia
Tyyppi D	Sika	Atrofinen rhiniitti
	Sika ja muut kotieläimet	Pneumonia
	Siipikarja	Kanakolera
Tyyppi E	Nauta ja vesipuhveli	Epitsoottinen verenvuoto septikemia
Tyyppi F	Siipikarja	Kanakolera
	Jänis	Fibrinopurulentti pleuropneumonia
<i>P. canis</i>	Koira	Kommensaali (suoontelo), puremahaava -kontaminaatio
	Nauta ja kissa	Pneumonia
<i>P. dagmatis</i>	Koira ja kissa	Kommensaali (suoontelo, suolisto), puremahaavainfektio
<i>P. stomatis</i>	Koira ja kissa	Kommensaali, puremahaavainfektio
<i>P. caballi</i>	Hevonen	Hengitystieinfektiot (pneumonia)
<i>P. pneumotropica</i>	Laboratorioeläimet	Pneumonia (opportunistinen patogeeni)

*Pasteurella multocida* -bakteeri kuuluu eläinlääketieteellisesti merkittävimpiin lajeihin, sillä sitä tavataan ympäri maailmaa ja se aiheuttaa infektioita suuressa määrässä eliölajeja. Bakteeri jaetaan useaan alalajiin sekä -tyyppiin isäntäeliönsä sekä ympäristövaatimustensa perusteella, ja se kuuluu monien eri eläinlajien hengitysteiden sekä ruoansulatuskanavan normaaliflooraan. Bakteeria tavataan karjan ja kotieläinten (koira, kissa, kani) lisäksi myös esimerkiksi villieläimillä (isot kissaeläimet, simpanssit) sekä merieläimillä (hylje, merileijona). *P. multocida* -bakteerin aiheuttamia infektioita kutsutaan yleisesti pasteurellooseiksi, ja infektioiden oireet voivat vaihdella laajasti lievistä ylähengitysteiden tulehduksista, akuutteihin, usein kuolemaan johtaviin tauteihin. Usein muiden hengitystiepatogeenien samanaikainen esiintyminen edesauttaa *P. multocida* -bakteerin leviämistä. [8, s. 636.]

Taulukossa 3 on kuvattu *Mannheimia*-suvun eläinlääketieteellisesti merkittävimmät lajit.

Taulukko 3. *Mannheimia*-suvun eläinlääketieteellisesti merkittävimmät lajit. [5, s. 309, muokattu.]

Bakteerilaji	Isäntäeläin	Yleisimmät taudit
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Nauta	Osana kuljetuskuume -kompleksia, pneumonia
	Lammas	Enzootinen pneumonia,
<i>M. varigena</i>	Sika	Pneumonia, verenmyrkytys, enteriitti
	Nauta	Pneumonia, verenmyrkytys, mastiitti
<i>M. granulomatis</i>	Nauta	Fibrogranulomaattinen sairaus, pannikuliitti
	Poro ja jänis	Bronkopneumonia, silmätulehdus

*Mannheimia*-suvun merkittävimpiin taudinaiheuttajiin kuuluu *Mannheimia haemolytica* -bakteeri, joka on erittäin patogeeninen ja aiheuttaa hyvin vakavia hengitystiesairauksia pääasiassa märehäijöillä kuten lampaila, vuohilla sekä naudoilla. [9, s. 121.] Suomessa *M. haemolytica* yleisimmin aiheuttamiin sairauksiin kuuluvat erilaiset hengitystietulehdukset, utaretulehdukset sekä yleisinfektiot. Taudin puhkeamista edistävät huonot elinolosuhteet kuten pölyisyys, kosteus sekä eläimiin kohdistuva stressi. [10.]

### 2.2.3 *Haemophilus* ja *Histophilus*

*Haemophilus* sekä *Histophilus* sukujen lajit ovat muiden *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien tapaan kommensaalisia bakteereita niin eläimillä kuin ihmisilläkin. Lajit ovat pieniä, gram-negatiivisia ja muodoltaan usein sauvamaisia. Ne ovat liikkuvia, nitraatteja pelkistäviä, glukoosin avulla happoa tuottavia, fakultatiivisia anaerobeja. [5, s. 349.]

Lajit kolonisoivat hengitysteiden sekä genitaalialueiden limakalvoja ja tulevat yleisesti huonosti toimeen isäntäeliöidensä ulkopuolella [11, s. 314]. Taulukossa 4 on esitetty merkittävimpiä *Haemophilus* sekä *Histophilus* suvun edustajia.

Taulukko 4. Merkittävimmät *Haemophilus* sekä *Histophilus* suvun edustajat. [5, s. 309, muokattu.]

Bakteerilaji	Isäntäeläin	Yleisimmät taudit
<i>Histophilus somni</i>	Nauta	Silmätulehdus, hengitystiesairaudet, genitaalinfektiot
	Lammas	Kommensaali, pneumonia, mastiitti
<i>Haemophilus parasuis</i>	Sika	Glässerin tauti, polyserosiitti
<i>H. influenzae</i>	Ihminen	Suuri määrä erilaisia tauteja (hengitystieinfektiot, aivokalvontulehdus)
<i>H. parainfluenzae</i>	Ihminen	Ylähengitysteiden normaaliflooraa, yhdistetty mm. virtsaputkentulehdukseen
<i>H. haemoglobinophilus</i>	Koira	Kommensaali, virtsarakontulehdus, neonataali-infektiot
<i>H. paracuniculus</i>	Jänis	Merkitys tuntematon
<i>H. influenzae murium</i>	Hiiri	Hengitystieinfektiot, silmätulehdus

*Haemophilus parasuis* on *Haemophilus* suvun tärkein taudinaiheuttaja eläimillä. Suurin osa muista lajeista toimii kommensaaleina eläinten limakalvoilla harvoin aiheuttaen tauteja. On kuitenkin huomattu, että *H. parasuis* -kantojen välillä löytyy variaatiota virulenssin suhteen. Osa isolaateista elää täysin kommensaaleina, eikä niitä ole koskaan eristetty patologisista näytteistä, kun taas toiset isolaatit ovat hyvin patogeenisia. [11, s. 316.] *H. parasuis* -bakteeri kolonisoi terveiden sikojen nenänielua, mutta patogeeniset kannat voivat aiheuttaa sioilla kuljetustautia (Glässerin tauti) esimerkiksi vastustuskyvyn heikennyttyä. Tauti on tulehdussairaus, joka aiheuttaa sioille esimerkiksi aivokalvon- ja sydänpussintulehduksia sekä niveltulehduksia. [12, s. 169.]

*Histophilus*-suvun tärkeimpiin edustajiin kuuluva *Histophilus somni*, kolonisoii muun muassa terveiden nautojen sekä lampaiden hengitysteitä sekä genitaalialueita. [5, s. 349.] Bakteeri voi aiheuttaa erilaisia systeemisiä sekä paikallisia tulehduksia sekä infektioita genitaalialueella [13]. Infektion saa usein alkunsa ympäristökijöiden vaikutuksesta esimerkiksi eläimeen kohdistuvan stressin aikaansaamana, ja bakteeri voi säilyä hengissä isäntäeläimensä ulkopuolella suotuisissa olosuhteissa useita päiviä. Bakteeri tarttuu suorassa kontaktissa tai aerosolien välityksellä eläimestä toiseen. [11, s. 317.]

#### 2.2.4 *Bibersteinia*

*Bibersteinia trehalosi* on gram-negatiivinen, pienikokoinen ja liikkumaton, pleomorfinen sauvabakteeri. Bakteeri on märehitijöiden patogeeni ja sitä tavataan ympäri maailmaa. *B. trehalosi* aiheuttaa erilaisia systeemisiä infektioita karitsilla sekä verenmyrkytyksiä aikuisilla lampanilla. [14.] Bakteeria esiintyy terveillä eläimillä nielussa, josta se saattaa levitä eläinten verenkiertoon esimerkiksi ympäristöstä aiheutuvan stressin seurauksena [15]. Bakteerin aiheuttamia infektioita todetaan myös naudoilla, mutta ne ovat selvästi harvinaisempia. On myös todettu, että *B. trehalosi* ei luultavasti ole nautojen primaarinen, vaan ennemminkin sekundaarinen tai esimerkiksi opportunistinen patogeeni. [16.] Taulukossa 5 on esitetty *B. trehalosi* -bakteerin yleisimmät isäntäeliöt sekä bakteerin aiheuttamat sairaudet.

**Taulukko 5. *Bibersteinia trehalosi* -bakteerin isäntäeliot sekä yleisimmät aiheuttamat taudit. [5, s. 309, muokattu.]**

Bakteerilaji	Isäntäeläin	Yleisimmät taudit
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	Lammas	Verenmyrkytys
	Märehtijät	Keuhkosairaudet

### 2.2.5 *Avibacterium*

*Avibacterium*-suvun lajeista suurin osa kuuluu kommensaaliin bakteereihin, jotka elävät muiden *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien tapaan isäntäeliöidensä hengitysteiden limakalvoilla luonnostaan. Suvun lajit ovat kooltaan pieniä, liikkuvia, gram-negatiivisia sauvabakteereita. *Avibacterium*-suvun ne lajit, jotka kuuluvat patogeeneisiin taudinaiheuttajiin, aiheuttavat tauteja pääasiassa siipikarjalla kuten esimerkiksi kanoilla. [5, s. 307.] Taulukossa 6 on kuvattu suvun merkittävät taudinaiheuttajat.

**Taulukko 6. *Avibacterium*-suvun eläinlääketieteellisesti merkittävimmät lajit. [5, s. 309, muokattu.]**

Bakteerilaji	Isäntäeläin	Yleisimmät taudit
<i>Avibacterium avium</i>	Kana	Kommensaali
	Vasikka	Poskiontelontulehdus, pneumonia
<i>A. gallinarum</i>	Linnut	Infektiot (sinusiitti, silmätulehdus, keuhkoputken tulehdus)
<i>A. paragallinarum</i>	Kana	Hengitystieinfektiot, silmätulehdus, ödeema

*Avibacterium paragallinarum* -bakteeri on yksi kyseisen suvun bakteereista, jota ei esiinny eläimissä luonnostaan vaan sen olemassaolo voidaan aina yhdistää kliiniseen infektiin. Kyseessä on obligatorinen lintujen patogeeni ja se aiheuttaa kanoilla akuuttia hengitystiesairautta (infectious coryza, IC). Tauti on laajalle levinnyt ja sitä tavataan ympäri maailmaa. Tarttuminen tapahtuu esimerkiksi juomaveden tai ilmassa liikkuvien pisaroiden välityksellä. Tauti on herkästi tarttuva ja sitä tavataan kaiken ikäisissä kanoissa. [17, s. 87.]

### 3 *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifikaatio

#### 3.1 Perinteiset menetelmät

*Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifikaatio perinteisillä menetelmillä saattaa usein osoittautua haastavaksi, sillä bakteerien karakterisointi vaatii usein monien erilaisten entsyymaattisten sekä biokemiallisten menetelmien hyödyntämistä, ja niistä saadut tulokset voivat osoittautua puutteellisiksi tai harhaanjohtaviksi. [18, s. 532.]

Rutiinidiagnostiikassa perinteiset menetelmät ovat kuitenkin edelleen laajasti käytössä, sillä niiden avulla on mahdollista identifioida suuri määrä erilaisia organismeja. Perinteisiin menetelmiin kuuluvat muun muassa bakteeriviljely erilaisille elatusaineille, pesäkemorfologian sekä pesäkkeen hajun arviointi, erilaiset värjäykset sekä biokemialliset testit. Perinteisten menetelmien heikkoutena on usein hitaus sekä niiden tulkinnan haastavuus. [19, s. 564.]

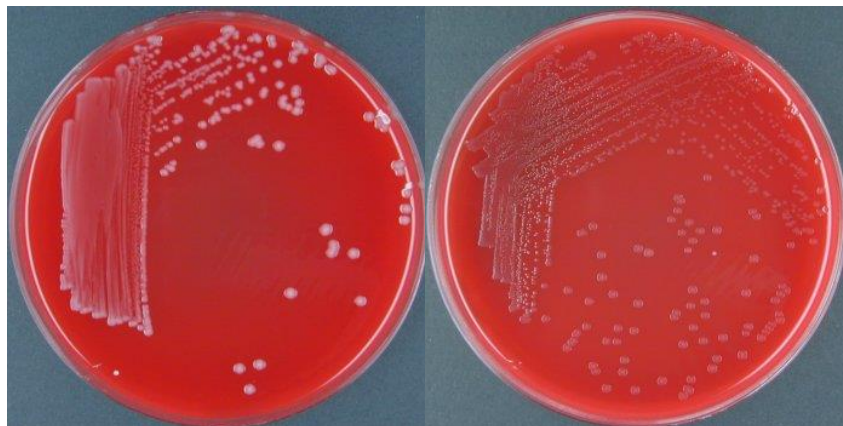
##### 3.1.1 Bakteeriviljely

Bakteeriviljely on bakteerien tunnistuksen perusmenetelmä, jonka etuina ovat sen yksinkertaisuus sekä edullisuus. Bakteereita voidaan kasvattaa nestemäisissä liemiviljelmissä, kiinteillä tai puolikiinteillä maljoilla, jotka sisältävät bakteereiden kasvuun tarvittavia, välttämättömiä ravintoaineita. [20, s. 40–41.] Bakteeriviljelyssä pyritään usein aikaansaamaan puhtasviljelmä, jossa jokainen pesäke on peräisin saman lajin yksilöstä ja joka voidaan saada aikaiseksi esimerkiksi laimennussarjan tai hajotusviljelyn avulla. Näin saadun puhtasviljelmän bakteeripesäkkeen ulkonäköä voidaan käyttää hyödyksi bakteerin tunnistamisessa. Myös erilaiset värjäykset sekä biokemialliset testit suoritetaan vasta onnistuneen puhtasviljelyn jälkeen. [21.]

*Pasteurellaceae*-heimo on suuri ja se koostuu suuresta määrästä bakteereita, joista suurin osa elää isäntäeliöstään riippuvaisesti. Useat lajit ovat myös hyvin isäntäspesifisiä ja tulevat huonosti toimeen joutuessaan ympäristöön. Monet bakteereista ovatkin hyvin tarkkoja kasvuolosuhteidensa suhteen ja vaativat juuri oikeanlaisen kasvualustan kasvaakseen optimaalisesti. [22, s. 795.]

*Pasteurellaceae*-heimon lajit ovat gram-negatiivisia, pääasiassa liikkumattomia ja muodoltaan sauvoja, filamentteja tai kokkoideja. Lajit ovat aerobisia, mikroaerofiilisiä tai fakultatiivisesti anaerobeja. [13.] Rutiinidiagnostiikassa lajeja kasvatetaan usein aerobisissa olosuhteissa 35–37 °C:een lämpötilassa ja hiilidioksidiatmosfäärissä (5-10 %), joka parantaa bakteerien kasvua huomattavasti useiden lajien kohdalla. Inkubointiaika on bakteerilajista riippuen yleensä 24–48 tuntia. [1, s. 716.] Lajien bakteeriviljelyssä käytettävät elatusaineet riippuvat pitkälti diagnostiikkaa harjoittavista laboratorioista sekä näissä vakiintuneista käytännöistä. *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien viljelyssä paljon käytettyjä elatusaineita ovat muun muassa veriagar (esimerkiksi naudan- tai lampaanveri), MacConkey -agar sekä suklaa -agar. [5.]

Heimon bakteerit ovat pesäkemorfologialtaan suhteellisen pieniä, väriltään vaaleita, harmahtavia tai kellertäviä, kun niitä on kasvatettu 24–48 tuntia 37 °C:een lämpötilassa veriagarilla. Osa lajeista on myös hemolyttisiä. [2, s. 673.] Hemolyttiset bakteerit muodostavat veriagarilla pesäkkeitä, joita ympäröi hemolyyttivyöhyke eli alue, jonka ympäriltä verisolut ovat hajonneet [23, s. 1]. Kuvassa 1 on esitetty tyypillisiä *Pasteurella multocida*- sekä *Actinobacillus equuli*-bakteerien muodostamia pesäkkeitä veriagarilla.



Kuva 1. *Pasteurella multocida* (vasemmalla) ja *Actinobacillus equuli* (oikealla) veriagarilla. [<http://atlas.sund.ku.dk/>]

### 3.1.2 Gram-värijäys

Gram-värijäys kuuluu bakteriologian yleisimpiin menetelmiin, jossa bakteerit jaotellaan niiden värjäytyvyyden mukaan joko gram-positiivisiin tai gram-negatiivisiin lajeihin. Värjäytyvyyden lisäksi saadaan tietoa bakteerin muodosta. Värjäytyvyyteen vaikuttaa gram-positiivisilla bakteereilla paksu peptidoglykaanikerros ja gram-negatiivisilla bak-

teereilla ohuen peptidoglykaanikerroksen ulkopuolella oleva ulkokalvo, joka gram-positiivisilta bakteereilta puuttuu. [24, s. 16–17.]

### 3.1.3 Biokemialliset testit ja testisarjat

Onnistuneen puhtasviljelyn jälkeen tutkittavalle bakteerille voidaan tehdä erilaisia biokemiallisia testejä sekä testisarjoja. Testit perustuvat bakteerien biokemiallisiin ominaisuuksiin, joita voivat olla esimerkiksi kyky tuottaa tiettyä entsyymiä tai kyky hajottaa tiettyjä aineita. Tällaisia testejä ovat esimerkiksi katalaasi-, oksidaasi- ja indolitestit sekä nitraatti- ja ureatestit. Biokemiallisia testejä on olemassa suuri määrä ja kulloinkin käytettävät testit valitaan tutkittavan bakteerin mukaan. [25, s. 9.] Biokemiallisiin testisarjoihin kuuluvat muun muassa API® -testit (bioMérieux), joilla osoitetaan bakteerien aikaansaamaa sokerien fermentaatiota sekä bakteerien entsyymiaktiivisuuksia erilaisten entsyymireaktioiden avulla. Käytettävä API -testi valitaan aina tutkittavan bakteerilajin mukaan. [26, s. 13.]

*Pasteurellaceae*-heimon lajien identifikaatio perinteisten biokemiallisten testien sekä testisarjojen avulla on usein haastavaa, sillä bakteerien identifikaatio vaatii usein hyvin monien biokemiallisten sekä entsyymaattisten testien suorittamista ja tulokset saattavat usein olla harhaanjohtavia tai vaikeasti tulkittavia. Tämä johtuu siitä, että heimo koostuu useasta bakteerisuvusta, joiden sisään mahtuu paljon erilaisia lajeja, jotka eroavat biokemiallisten ominaisuuksiensa puolesta. [18, s. 532.] Biokemiallisten testien suorittaminen ja onnistunut identifikaatio on myös riippuvainen onnistuneesta puhtasviljelystä. Useat testit ovat nopeita suorittaa, mutta ne saattavat vaatia tietyn inkubaatioajan, esimerkiksi 24–48 tuntia, ja ne tunnistavat ainoastaan rajatun määrän bakteerilajeja. Testisarjat tunnistavat yleensä suuremman määrän eri lajeja, mutta niiden haittapuoleina ovat usein testikittien ja tarvikkeiden korkeat hinnat. [19, s. 564.] Yleisesti ottaen API -testit eivät ole täysin luotettavia *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifikaatiossa, sillä testi ei kata montaa heimon lajia eikä näin sovellu kuin muutamalla lajille, eikä sitä usein voida käyttää ainoana identifikaatiomenetelmänä. Esimerkiksi API20 NE -testi antaa luotettavan tuloksen *Pasteurella multocida* -bakteerille noin 95 prosentissa tapauksista. [13.]

Taulukossa 7 on esitetty joukko erilaisia biokemiallisia testejä, jotka ovat yleisesti käytössä *Pasteurellaceae*-heimon bakteerilajien identifikaatiossa, ja joiden avulla kyseisiä lajeja pystytään erottelemaan toisistaan.



**Taulukko 7. *Pasteurellaceae*-heimon bakteerisukujen tunnistuksessa yleisesti käytettyjä biokemiallisia testejä. [2, s. 57, muokattu.]**

Testi	Bakteerisuku				
	<i>Actinobacillus</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Mannheimia</i>	<i>Histophilus</i>
Katalaasi	D	D	D	D	–
NAD -riippuvuus	–	–	+	–	–
Porfyriini	+	+	– / +	+	ND
Voges-Proskauer	–	–	ND	–	–
Ureaasi	+	–	+	–	–
Indoli	–	+	D	–	+
Fosfataasi	+	+	+	+	+
Haponmuodostus:					
(–)-D -Arabinoosi	–	D	ND	D	ND
Dulsioli	–	D	–	–	ND
(–)-D -Mannitoli	+	D	–	+	ND
(–)-D -Fruktoosi	+	+	–	+	–
(+)-D -Galaktoosi	D	+	+	+	ND
(+)-D -Mannoosi	D	+	– / +	–	ND
Maltoosi	+	–	+	D	–
Sukroosi	+	+	–	+	–
(+)-D -Trehaloosi	D	D	–	–	–
ONPG	D	D	–	D	ND

(+) 90 % kannoista positiivisia 1-2 päivän kuluttua

(–) alle 10 % kannoista on positiivisia 14 päivän kuluessa

(D) 11–89 % kannoista positiivisia

Kaikkia testejä ei tarvita jokaisen lajin identifikaatiossa, mutta edeltävä taulukko antaa suuntaa siitä, kuinka hankalaa ja aikaa vievää heimon lajien identifikaatio saattaa olla. Kulloinkin käytettävät menetelmät riippuvat laboratorioista ja näissä vakiintuneista käytännöistä, joilla kyseisen heimon bakteereita tunnistetaan. [1, s. 717.]

## 4 MALDI-TOF MS

### 4.1 Yleistä

MALDI-TOF MS (matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria) on massaspektrometriaa hyödyntävä menetelmä, jota käytetään mikrobin identifiointissa sekä karakterisoinnissa. Massaspektrometrian hyödyntäminen mikrobin (bakteerit, hiivat, sienet, mykobakteerit) tunnistuksessa ei ole uusi menetelmä, sillä sitä on käytetty jo vuonna 1975 mikrobin biomarkkereiden tunnistamisessa ja sitä kautta bakteerien identifiointissa. [27, s. 419.] MALDI-TOF MS -menetelmä on kehitetty vuonna 1987 ja se on saanut Nobel-palkinnon vuonna 2002. Kuitenkin vasta viime vuosina MALDI-TOF MS -menetelmä on yleistynyt rutiinidiagnostiikassa mikrobiologian laboratorioissa. Menetelmän etuja ovat nopeus, tarkkuus, kustannustehokkuus sekä helppokäyttöisyys. [28, s. 550.]

Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Helsingin laboratorion MALDI-TOF MS -menetelmää hyödyntävä MALDI Biotyper -laite (kuva 2) on laitevalmistaja Bruker Daltonics:in valmistama. Brukerin laitteeseen kuuluvat microflex -massaspektrometri sekä MALDI Biotyper Real Time Classification- (RTC, versio 3.1) sekä flexControl (versio 3.4) -tietokoneohjelmat, jotka ovat käytössä rutiiniajoissa. Näiden lisäksi datan analysoinnissa käytetään MALDI Biotyper Offline Classification- (OC, versio 3.1) sekä flexAnalysis (versio 3.4) -ohjelmia.



Kuva 2. Eviran MALDI Biotyper -laite.

## 4.2 MALDI-TOF MS -menetelmä bakteerintunnistuksessa

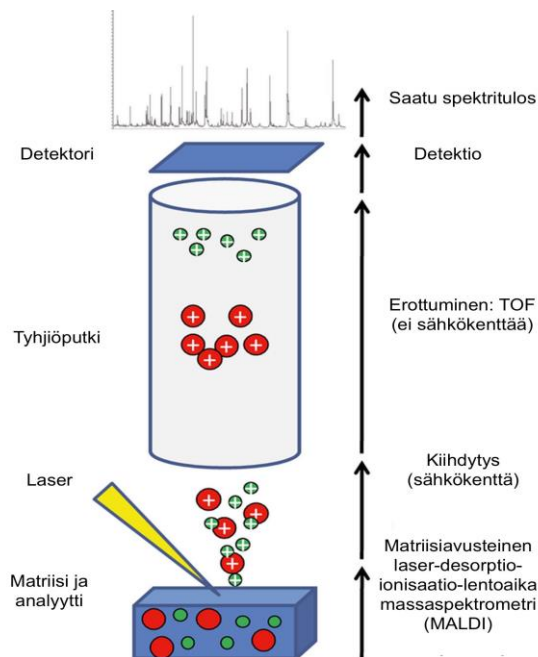
### 4.2.1 Toimintaperiaate

Massaspektrometri rakentuu kolmesta toiminnallisesta osasta; ionilähteestä, massa-analysaattorista sekä detektion suorittavasta laitteesta. Ionilähteen tehtävänä on ionisoida sekä saattaa näytteen molekyylit kaasufaasiin. Massa-analysaattori erottelee syntyneet ionit niiden massa-varaus ( $m/z$ ) -suhteen perusteella, jonka jälkeen detektori analysoi erottuneita ioneja. [29, s. 381.]

MALDI-TOF MS -menetelmässä analysoinnin kohteena ovat bakteerien biomolekyylit sekä suuret orgaaniset molekyylit. Menetelmä hyödyntää niin sanottua pehmeää ionisaatiotekniikkaa (soft ionization), joka tekee mahdolliseksi edellä mainittujen molekyyliden analysoimisen niiden ollessa hyvin hauraita. Tästä johtuen kyseisten molekyyliden analysoiminen perinteisillä ionisaatiotekniikoilla on haastavaa. Menetelmässä analysoitavat molekyylit ovat suurimmaksi osaksi proteiineja ja niistä suurin osa kuuluu bakteerien ribosomaalisiin proteiineihin. Nämä proteiinit ovat hyvin yksinkertaisia ja niitä on bakteereilla runsas määrä, jopa yli 20 % koko solun kaikista proteiineista, ja niiden biokemialliset ominaisuudet tekevät niistä tehokkaasti ionisoituvia. Laite mittaa pääasiassa bakteerien konservoitunutta, ribosomaalista proteomia massa-alueella 2000–20 000 Da. Muita mitattavia molekyylejä ovat usein esimerkiksi DNA:ta ja RNA:ta sitovat proteiinit sekä erilaiset kylmähokkiproteiinit. [30, s. 258.]

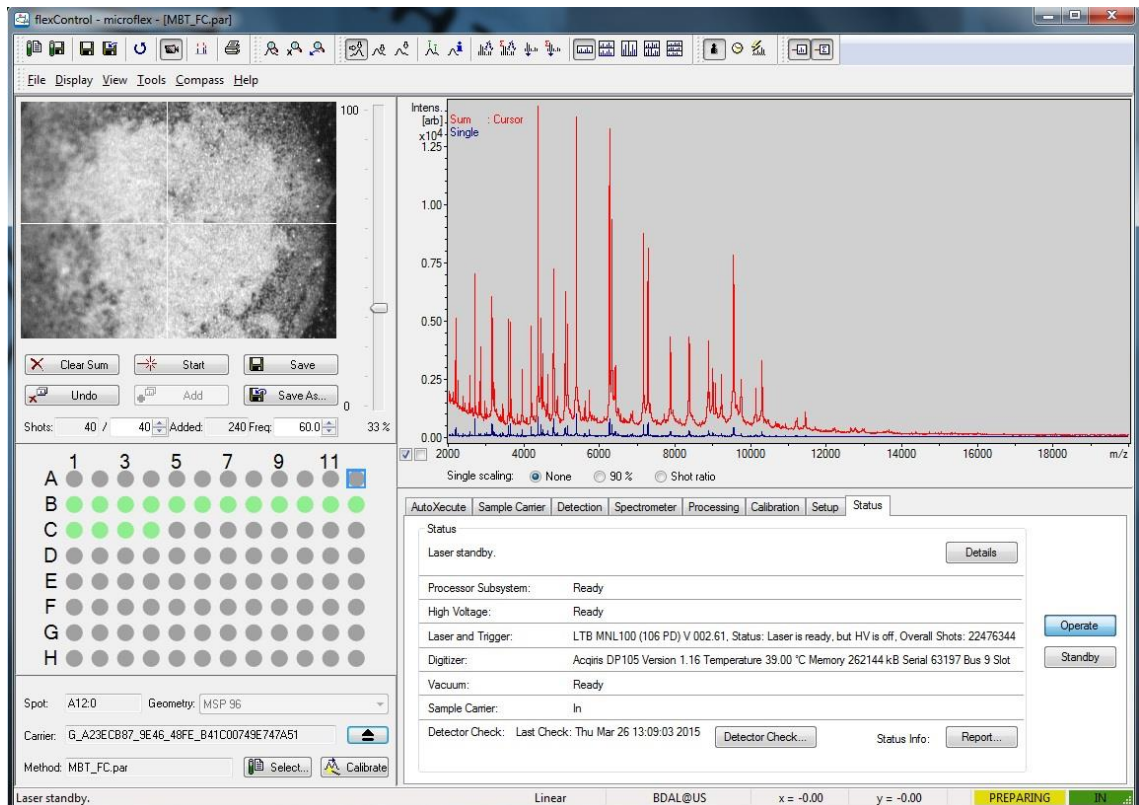
MALDI-TOF MS -menetelmässä näytteet valmistellaan sekoittamalla ne matriisiin kanssa näytelevyllä. Matriisin tehtävänä on edesauttaa proteiinien ionisoitumista. Tämä aiheuttaa näytteen kiteytymisen matriisiin. Näytteen käsittelyn jälkeen näytelevy vietään laitteen sisään ja näytespotteja pommitetaan lyhyillä laserpulsseilla, joiden aikaansaama energia sitoutuu matriisiin. Tämä johtaa näytteiden desorptioon sekä kaa-suuntumiseen, jonka jälkeen ne ionisoituvat kaasufaasiin ja tämän seurauksena syntyy suurimmaksi osaksi positiivisesti varautuneita ioneja. [29, s.382.]

Seuraavaksi ionisoidut molekyylit kiihdytetään sähkökentän avulla ja hiukkaset siirtyvät putkeen, jonka sisällä on vakuumi ja lentävät putken toisessa päässä sijaitsevaan detektoriin nopeudella, joka on riippuvainen ionin massasta; pienet ionit kulkeutuvat nopeasti, raskaat hitaammin. Ionien lentoaika (TOF, time-of-flight), jonka aikana ne liikkuvat putken alkupäästä detektorille, määräytyy ionin massan ( $m$ ) sekä varauksen ( $z$ ) perusteella. [29, s. 382.] Kuvassa 3 on esitetty MALDI-TOF MS -menetelmän toimintaperiaate.



**Kuva 3. MALDI-TOF MS -menetelmän toimintaperiaate. [29, s. 382, muokattu.]**

Lopuksi bioanalyytit joista näyte koostuu ja joilla on toisistaan vaihtelevat massa-varaus-suhteet, erotellaan niiden lentoaikojen perusteella. Tämän avulla jokaiselle tutkittavalla spotille muodostuu massaspektri, jossa on piikkejä yleensä välillä 1000–20000  $m/z$  ja joiden intensiteetit vaihtelevat. Intensiteetti kuvaa detektorille osuneiden ionien määrän aina tietyn massa-varaus -suhteen kohdalla. [29, s.382.] Spektrien muodostumista voidaan seurata reaaliajassa flexControl -ohjelmassa (kuva 4), jossa samanaikaisesti muodostuu jokaiselle spotille useampi yksittäinen spektri ja niiden pohjalta ohjelma laskee kumuloituvan summaspektrin [31].



**Kuva 4. flexControl -ohjelma, jossa ajon aikana muodostuu yksittäisiä massaspektrejä (sininen) ja joiden pohjalta muodostuu kumuloituva summaspektri (punainen). Vasemmassa yläkulmassa on näkyvissä kulloinkin käsiteltävä spotti, jota ajon aikana pommitetaan laserpulsseilla.**

Kaupallisia MALDI-TOF MS -järjestelmiä on saatavilla kahdelta eri valmistajilta (Bruker Daltonics Inc sekä bioMérieux Inc). Alustat eroavat toisistaan muun muassa tietokannoiltaan, ohjelmistoiltaan sekä bakteerien identifiointiin käytettäviltä algoritmeiltaan, jonka takia laitteiden numeeriset tulokset on esitetty erilaisilla asteikoilla eivätkä näin ole täysin verrattavissa keskenään. Brukerin MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon on mahdollista lisätä omia kantoja laitteen ohjelmiston avustuksella ja näin laajentaa olemassa olevaa kirjastoa esimerkiksi itse eristämällä kannoilla. Näin laboratoriot voivat kasvattaa omaa kirjastoaan alueellisesti tärkeillä kannoilla sekä kannoilla, jotka saattavat olla laitteessa huonosti edustettuina. [19, s. 567.]

#### 4.2.2 Tulosten analysointi

Saatu massaspektri on hyvin spesifinen bakteerin suvun, lajin, alalajin tai jopa tyypin mukaan, joten sitä voidaan pitää bakteerin niin kutsuttuna molekyylijälkeenä.

Tällä tavoin tuntemattomat bakteerit voidaan tunnistaa vertaamalla näytteen tuntematonta sormenjälkeä tietokannan tunnettuihin jälkiin. [32, s. 16.]

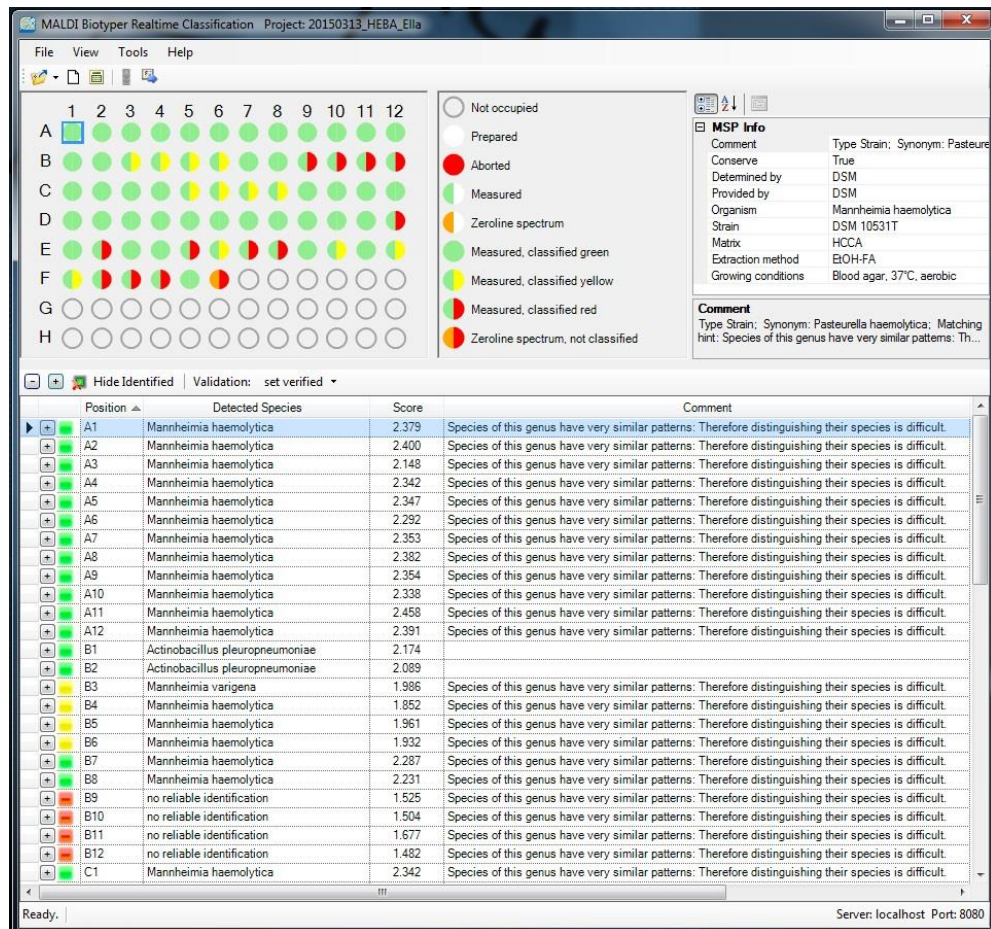
Laite vertaa saatua massaspekttriä kirjastossa oleviin spektreihin, jonka jälkeen MALDI Biotyper RTC -ohjelma antaa kussakin näytespotissa olevalle bakteerille mahdollisen nimen sekä vastaavuuspisteet (score value). Vastaavuuspisteet vaihtelevat välillä 0-3. Mitä korkeamman vastaavuuspisteen bakteeri saa, sitä paremmin se on tunnistunut ja sitä todennäköisempää on, että tunnistuminen on luotettava. [32, s. 17.]

Taulukossa 8 on esitetty vastaavuuspisteet sekä niihin liittyvät tunnistustulokset. Yleisesti ottaen, mikäli vastaavuuspisteet ovat  $\geq 2.0$ , voidaan tätä pitää todennäköisesti luotettavana tuloksena [32, s. 17].

**Taulukko 8. Vastaavuuspisteet ja niiden tulkinta [31.]**

Vastaavuuspisteet	Tunnistustulos
2.300 - 3.000	Hyvin todennäköinen lajintunnistus
2.000 - 2.299	Varma sukutunnistus, todennäköinen lajintunnistus
1.700 - 1.999	Todennäköinen sukutunnistus
0.000 - 1.699	Epäluotettava tunnistus

Kuvassa 5 on esitetty MALDI Biotyper RTC -ohjelman näkymä spottien ajon jälkeen. Vasemmassa yläkulmassa on nähtävillä ajatut spotit, joiden väri kertoo tunnistumisen onnistumisesta; mikäli vastaavuuspisteet kyseiselle spotille ovat  $\geq 2.0$ , näkyy näyteympyrä vihreänä ja mikäli tunnistuminen on epävarmempaa, näkyy ympyrässä tämän lisäksi keltaista väriä. Epäluotettava tunnistus nähdään näyteympyränä, jossa puolet ympyrästä on punaista. Kokonaan onnistumaton tunnistus nähdään punaisena näyteympyränä. Ajettujen spottien alapuolella on näkyvissä tunnistetun bakteerin nimi, vastaavuuspisteet sekä mahdolliset muut bakteeriin liittyvät kommentit.



Kuva 5. MALDI Biotyper RTC -ohjelma.

### 4.3 Näytteen käsittely

Brukerin MALDI-TOF MS -menetelmässä bakteerinäytteiden käsittelyssä voidaan käyttää kolmea vaihtoehtoista tapaa; suoraa siirrostusta, muurahaishappo-pikauuttoa tai muurahaishappo-asetonitrilliuuttoa. Käytettävä tapa valitaan tutkittavan bakteerin mukaan. Suurin osa bakteereista saadaan lyysaantumaan altistamalla ne esimerkiksi vahvalle hapolle tai orgaaniselle liuottimelle. Resistentimmät bakteerikannat, esimerkiksi itiöivät tai kovaseinäiset bakteerit, vaativat usein esikäsittelyn vahvoilla hapoilla ja/tai alkoholilla. [29, s. 382.] Myös luokan 3 patogeeneille käytetään inaktivoivaa uuttomenetelmää [33]. Suora siirrostus on rutiinimenetelmä, joka on sopiva suurimmalle osalle tutkittavista bakteereista, uuttomenetelmiä taas usein hyödynnetään, mikäli suora menetelmä ei anna luotettavaa tulosta. [33, s. 3–4.]

#### 4.3.1 Matriisi

Matriisi koostuu pienistä ja happamista molekyyleistä, joille on ominaista absorboida tehokkaasti valoa kulloinkin käytetyn laserin aallonpituudella. Rutiinisovelluksissa laserin aallonpituus on yleensä noin 337 nanometriä ja käytetty laser on usein typpilaser (N<sub>2</sub>). Matriiseja löytyy useita erilaisia ja niiden koostumus vaihtelee tutkittavan biomolekyylin sekä käytettävän laserin mukaan. Oikean matriisin valinta vaikuttaa ratkaisevasti tunnistustulokseen [29, s. 381.] Matriisin tulisi absorboida tehokkaasti laserin valoa, niillä aallonpituuksilla, joita molekyylin ionisaation helpottamiseksi käytetään sekä matriisin tulisi olla tarpeeksi stabiili tyhjiössä. Matriisi ei myöskään saisi reagoida kemiallisesti tutkittavien molekyylin kanssa, jotta molekyyleissä ei pääsisi tapahtumaan ei-haluttuja muutoksia tai hajoamista. [28, s. 552.]

Proteiinien identifiointiin soveltuvia matriiseja ovat muun muassa bentsoe- sekä kanelihapon johdannaiset sekä erilaiset aromaattiset yhdisteet [34, s. 13]. Brukerin laitteessa käytettävä matriisi on kyllästetty  $\alpha$ -syano-4-hydroksikanelihappo (HCCA), joka soveltuu proteiinien sekä peptidien mittaamiseen massavälillä 0.7 – 20 kDa [35, s. 4].

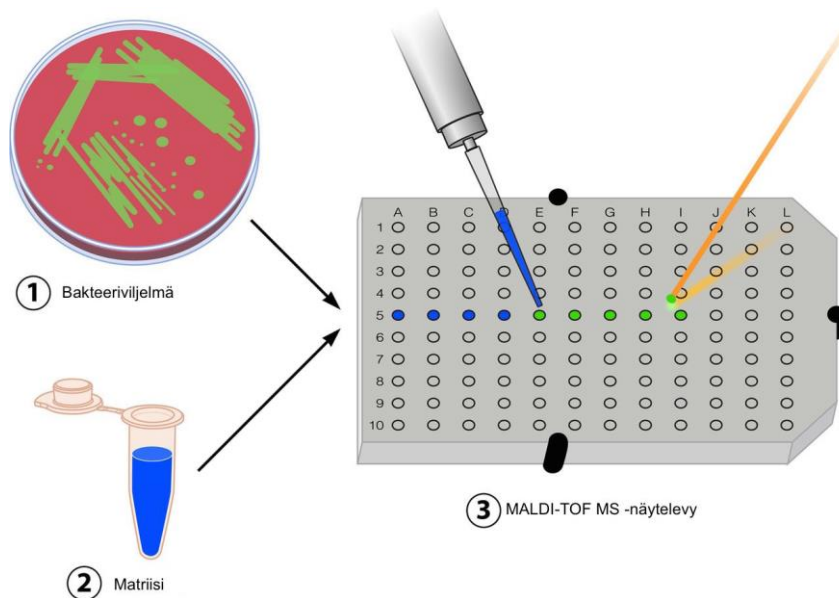
Näytteen valmistelussa näyte sekoitetaan näytelevylle ylimäärään matriisia. Matriisin tehtävänä on avustaa näytettä haihtumaan ja ionisoitumaan. Tyypillisesti matriisia lisätään ylimäärin suhteessa näytteeseen, usein suhteessa 100:1 tai 10 000:1, sillä matriisin tärkeimpänä tehtävänä on absorboida UV-laserin tuottamaa säteilyä ja näin suojella tutkittavia analyyttejä hajoamiselta. Matriisin ylimäärä myös vähentää analysoituvien molekyylin keskinäistä vuorovaikutusta ja saa aikaan näiden tehokkaan ionisoitumisen. MALDI-TOF MS -menetelmässä tapahtuvaa ionisaatiota kutsutaan pehmeäksi ionisaatioksi, sillä analyytit eivät absorboi laserin synnyttämää energiaa, vaan sen tekee matriisi. Tämä tekee mahdolliseksi suurten ja monimutkaisten biomolekyylin tutkimisen. [34, s. 13.]

#### 4.3.2 Suora menetelmä

Suora siirrostus on yksinkertainen siirrostusmenetelmä, joka on laajalti käytössä rutiinidiagnostiikassa, sillä se on käyttökelpoinen ja toimiva menetelmä suurimmalle osalle rutiinisti kohdattavista bakteerilajeista. Menetelmä soveltuu ei-patogeenisille bakteereille tai korkeintaan luokan 2 patogeeneille. [33, s. 3.]



Näyttemateriaalina käytetään elatusaineella kasvavaa, mahdollisimman tuoretta bakteerikasvustoa. Alustalta valitaan erillispesäke, joka poimitaan maljalta esimerkiksi hammastikun avulla ja levitetään mahdollisimman ohuena kerroksena näytelevyn yhdelle näytealueella (spotille) yleensä kahtena rinnakkaisena siirrostuksena. Bakteerimassan annetaan kuivua huoneenlämmössä, jonka jälkeen näyte peitetään 1 $\mu$ l:lla matriisiliuosta. Myös matriisiin annetaan kuivua huoneenlämmössä, jonka jälkeen näytelevy on valmis analysoitavaksi. [29, s. 385.] Kuvassa 6 on esitetty suora siirrostusmenetelmä.



Kuva 6. Suora siirrostus [28, s. 551, muokattu.]

Valmistajan ohjeiden mukainen näytteen ja matriisin valmistus sekä näytelevyn valmistelu yleensä riittää aikaansaamaan tyydyttävän bakteerien identifikaation MALDI-TOF MS -menetelmällä. Yleensä oikein valittu matriisi riittää varmistamaan solujen tehokkaan hajoamisen, mikä on edellytyksenä onnistuneella MALDI-TOF MS -analyysille. [29, s. 390.]

#### 4.3.3 Uuttomenetelmät

Mikäli suoralla menetelmällä ei päästä haluttuun tulokseen, voidaan näyte esikäsitellä happopohjaisella liuottimella, joka tehostaa tutkittavien bakteerisolujen hajoamista ja sitä kautta parantaa identifikaation tulosta. Uuttomenetelmät auttavat irrottamaan näytteestä haluttuja proteiineja, jolloin ionisaatio on tehokkaampaa ja bakteerien identifikaatio

tio luotettavampaa [36]. Brukerin MALDI-TOF MS -menetelmää käytettäessä uuttomenetelmiä on kaksi erilaista; muurahaishappo-pikauutto sekä muurahaishappo-asetonitriliuutto. Näistä ensimmäinen menetelmä on suoran siirrostuksen tapaan nopea ja yksinkertainen toteuttaa ja uutto tapahtuu suoraan näytelevyllä. Näyte siirrostetaan näytelevylle kuten suorassakin menetelmässä ja näytteen annetaan kuivua, jonka jälkeen sen päälle pipetoidaan 1 µl 70 % muurahaishappoa (formic acid, FA). Näytelevyn annetaan kuivua, jonka jälkeen matriisi lisätään näytelevylle kuten suorassa menetelmässä. [33, s. 3–4.]

Muurahaishappo-asetonitriliuutto on pikauuttoa hieman työläämpi menetelmä, jossa näyttemateriaalin uutto suoritetaan Eppendorf-putkessa. Bakterikasvustosta siirrostetaan 1 µl:n siirrostussilmukalla näytettä Eppendorf-putkessa olevaan ultrapuhtaaseen veteen (300 µl), sekoitetaan tasaiseksi, jonka jälkeen putkeen pipetoidaan 900 µl 99,6 % etanolia. Seosta sentrifugoidaan 2 minuuttia (13 000 rpm), jonka jälkeen supernatantti kaadetaan pois, sentrifugointi toistetaan ja supernatantti poistetaan pipetoimalla. Lopun etanolin annetaan haihtua avonaisesta putkesta ja syntyneen bakteeripelletin koon perusteella putkeen pipetoidaan 10–30 µl 70 % muurahaishappoa (FA) ja sekoitetaan hyvin. Suspensiota inkuboidaan 2 minuuttia, jonka jälkeen muurahaishappoa vastaava määrä 100 % asetonitriliä pipetoidaan putkeen, sekoitetaan ja näyte sentrifugoidaan. Lopuksi saatua supernatanttia pipetoidaan näytelevylle 1 µl ja kuivumisen jälkeen peitetään 1 µl:lla matriisia. [33, s. 4.]

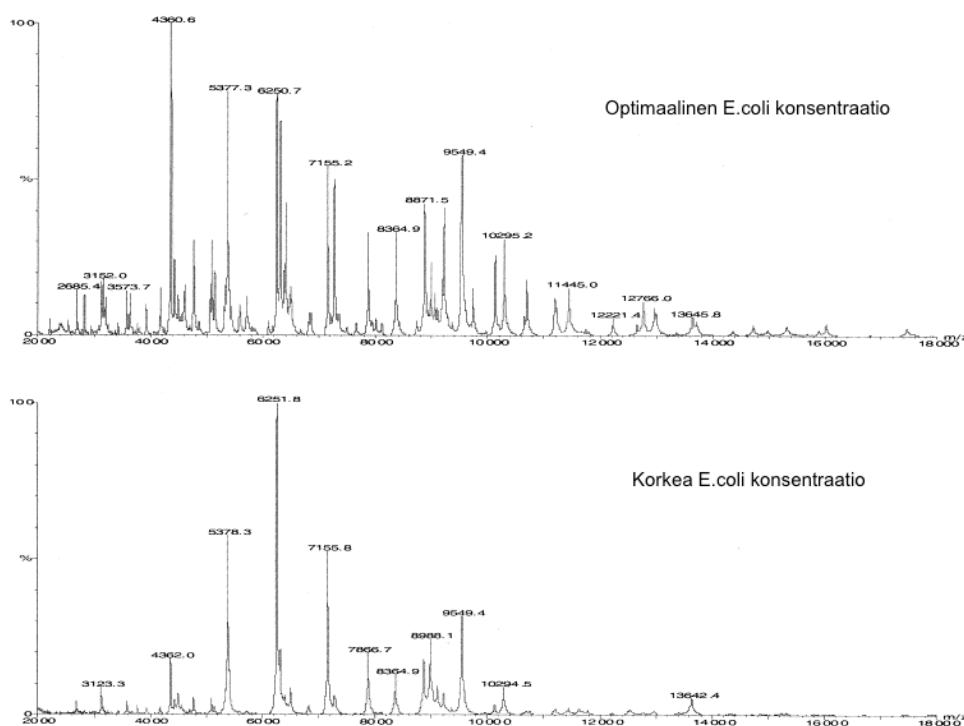
Vaikka tutkimuksissa on huomattu, että uuttomenetelmät parantavat bakteerien identifikaatiota monien lajien kohdalla, ei menetelmää usein suositella käytettäväksi rutiinidiagnostiikassa vaan ainoastaan sellaisten bakteerikantojen kohdalla, joille suora menetelmä ei riitä antamaan tyydyttävää tulosta. [29, s. 390.]

#### 4.4 Tuloksiin vaikuttavia tekijöitä

MALDI-TOF MS -menetelmällä saatuihin proteiinispektreihin ja sitä kautta mikrobien identifiointiin vaikuttavat monet tekijät. Useissa tutkimuksissa on huomattu, että spektrien laatuun vaikuttavat niin massaspektrometrin parametrit, näytteen valmistelu sekä mahdollinen esikäsitely. Saatuihin tuloksiin on huomattu vaikuttavan muun muassa MALDI-TOF -instrumentti, käytetyn matriisin ominaisuudet, mikrobien kasvuolosuhteet sekä käytetyn kasvatusalustan koostumus. [38, s. 342.]

#### 4.4.1 Näytteen käsittely ja inkubaatioaika

Identifikaation onnistuminen on MALDI-TOF MS -menetelmässä hyvin paljon riippuvainen tutkittavasta bakteeriviljelmästä sekä näytemateriaalin riittävydestä. Menetelmässä analysoitavia komponentteja ovat yleensä kokonaiset bakteerisolut, jonka vuoksi näytemateriaalin riittävyys voi muodostua ongelmaksi esimerkiksi sellaisilla lajeilla, jotka ovat vaikeasti kasvatettavia. [30, s. 262.] Tutkimuksissa on havaittu, että saatujen spektrien laatu ja sitä kautta onnistunut bakteerien identifikaatio on suuresti kiinni näytelevylle levitetystä näytemäärästä [29, s. 391]. Kuvassa 7 on esitetty bakteerikonsentraation vaikutusta MALDI-TOF MS -menetelmällä saatuun spektriin *E.coli* -bakteerilla. Optimaalinen konsentraatio on etsitty laimennossarjojen avulla.



**Kuva 7. MALDI-TOF MS -menetelmällä saadut *E.coli* -bakteerin proteiinispektrit käyttäen optimaalista sekä korkeaa *E.coli* konsentraatiota. [38, s. 349, muokattu.]**

Näytteen levitystä näytelevylle on käytännössä kuitenkin hyvin hankala optimoida, sillä sopivanpaksuisen bakteerimassan levitys tehdään aina silmämääräisesti. Näin ollen näytteen levitystekniikalla on merkitystä tunnistustulokseen, sillä liian suuri tai vastavasti liian pieni määrä bakteerimassaa usein hankaloittaa bakteerien tunnistusta. Tämän vuoksi oikeanlaisen ”käsialan” harjoittelu on kannattavaa. Usein myös bak-

teeripesäkkeen koostumus vaikuttaa bakteerien tunnistumiseen. Esimerkiksi limaiset, hyvin pienet tai tiukasti elatusaineessa kiinni kasvat pesäkkeet saattavat vaikeuttaa bakteerimassan siirtämistä sekä levitystä näytelevylle. [31.]

Näytemateriaalin riittävyyden lisäksi myös bakteeriviljelmän iällä on suuri merkitys proteiinispektreihin ja bakteerien identifikaation onnistumiseen. Yleisesti ottaen, mitä tuorempi viljelämä, sitä parempaan tulokseen yleensä päästään [31]. Useissa tutkimuksissa on havaittu, että alle neljän tunnin inkubaatioaika antaa huonoja identifikaatiotuloksia, ja että tarvitaan vähintään kuuden tunnin inkubaatio, jotta bakteerikonsentraatio on riittävän suuri ja on mahdollista päästä tyydyttäviin tuloksiin. Tässä tosin on otettava huomioon tutkittava bakteeri ja sen kasvunopeus. [29, s. 390–391.] Riittämättömän tai liian pitkän inkubaatioajan on huomattu vaikuttavan voimakkaastikin bakteerien proteiinispektrien suurimpien piikkien intensiteetteihin ja sitä kautta tunnistustulokseen [39, s. 512].

MALDI-TOF MS -menetelmällä tutkittavan bakteerikannan olisi myös oltava puhdasviljelämä ja analysoimiseen tulisi käyttää mielellään näytemateriaalia ainoastaan yhdestä pesäkkeestä, sillä sekaviljelmien analysointi on MALDI-TOF -laitteella hankalaa eikä kovinkaan luotettavaa. [30, s. 262.] Myös bakteeriviljelmän mahdollinen säilytys ennen MALDI-TOF -analyysiä tulisi tehdä huoneenlämmössä, sillä säilytys jääkaappilämpötilassa usein vaikuttaa negatiivisesti tunnistustuloksiin [31].

#### 4.4.2 Kasvatusalusta

Bakteerien kasvatusalustat koostuvat yleensä suuresta määrästä erilaisia komponentteja, joita ovat muun muassa suolat, antibiootit sekä pH-indikaattorit. Näistä esimerkiksi suolojen tiedetään vaikuttavan massaspektrometriassa inhiboivasti, ja erilaiset kasvatusalustan komponentit voivat häiritä bakteerien biomolekyylien ionisaatiota sekä aiheuttaa muutoksia bakteerien proteiiniekspressiossa. [36, s. 1008.]

Tutkimuksissa on huomattu, että esimerkiksi MacConkey-agarin sisältämät pigmentit saattavat vaikuttaa vaimentavasti ionisaatioon [36, s. 1012]. Toisaalta myös esimerkiksi TSA-agarina (Trypticase Soy Agar) käytettäessä on huomattu, että syntyvät piikit eivät ylitä 3000:tta Da, kun taas tavallisella veriagarilla päästään yli 15 000 Da kokoisiin piikkeihin. Tämän on arveltu johtuvan veriagarin sisältämistä proteiineista. Yleensä kasvatusalustana neuvotaan käyttämään ei-selektiivista alustaa, jotta sen vaikutus baktee-

rien identifikaatioon olisi mahdollisimman pieni. Kuitenkin joitakin bakteerilajeja ei ole mahdollista kasvattaa yksinkertaisilla kasvatusalustoilla, vaan ne vaativat joskus hyvinkin selektiivisiä agareita kasvaakseen optimaalisesti. [39, s. 511.]

Vaikka kasvatusalusta joissain tapauksissa saattaakin vaikuttaa bakteerien proteiinispektreihin, on tutkimuksissa havaittu, että spektrien muutokset eivät vaikuta bakteerien identifikaatioon lajitasolla, vaan saattavat vaikuttaa ainoastaan kantatason tunnistukseen. [40, s. 1536.]

#### 4.4.3 Kirjaston kattavuus

Nykyiset MALDI-TOF MS -laitteiden kirjastot on alun perin suunniteltu ihmispatogeenien diagnostiikkaan eikä kirjastoja ole varsinaisesti kohdennettu eläinlääketieteellisiin patogeeneihin. Kirjastot kuitenkin tunnistavat tyypillisimmät aerobiset gram-positiiviset kokit ja sauvat sekä gram-negatiiviset basillit. Näistä gram-negatiiviset bakteerit ovat yleisesti paremmin tunnistuvia, sillä niiden rakenne on helpommin hajotettavissa ja sitä kautta proteiinit helpommin analysoitavissa. [19, s. 567.]

Tutkimuksissa on osoitettu, että hankalia identifioitavia ryhmiä ovat esimerkiksi pneumokokit, viridans -ryhmän streptokokit sekä monet anaerobiset bakteerit. Ongelmallista pneumokokkien identifikaatiossa on niiden rakenne, sillä kyseisille bakteereille tyypillinen kapseli on hankala hajottaa. Streptokokkien kohdalla ongelmaksi nousee MALDI-TOF -laitteen kirjastot, joissa monien lajien referenssispektrien määrä on hyvin pieni ja näin ollen kyseisten lajien tunnistuminen ei ole kovin luotettavaa. [29, s. 389.]

Brukerin MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoa (Bruker Taxonomy) on mahdollista päivittää valmistajan säännöllisesti tarjoamilla päivityksillä ja tällä tavalla parantaa laitteen tunnistuskykyä. Laite tunnistaa ainoastaan sellaiset bakteerilajit, jotka ovat kirjastossa edustettuina vähintään yhdellä kannalla. Tunnistustulos kuitenkin paranee huomattavasti, mikäli kirjasto koostuu yhden kannan sijasta useammasta lajin kannasta, sillä saman lajin edustajat eroavat myös kantatasolla toisistaan. Tällä tavoin kirjasto, jossa on edustettuna saman lajin monta eri kantaa, kattaa paremmin kantatason vaihtelun lajin sisällä ja sitä kautta mahdollistaa lajien paremman tunnistuksen. Kannat eroavat usein toisistaan myös paikallisesti, jolloin kirjastoa on kannattavaa päivittää alueellisilla isolaateilla. [41.]

Yksi suurimmista syistä tiettyjen bakteerilajien- tai ryhmien vaikeaan tunnistettavuuteen johtuu puutteista nykyisissä tietokannoissa. Vaikka monet bakteerilajeista kyetään tunnistamaan suku- tai lajitasolle, harvoin on mahdollista kyetä tunnistamaan bakteeri alalajitasolle. Joidenkin sukujen lajit ja sitä kautta lajien spektrit ovat kuitenkin niin samantaisia, että jopa lajitason tunnistus on hankalaa tai käytännössä lähes mahdotonta. Yleisesti monien lähisukuisten bakteerien tunnistaminen MALDI-TOF MS -analyysillä on hankalaa ja saattaa johtaa vääriin tuloksiin, ja tämän takia kattavien tietokantojen luominen ja ylläpitäminen on erittäin tärkeää bakteerien luotettavan identifikaation aikaansaamiseksi. [30, s. 261.]

#### 4.4.4 MALDI-TOF MS -laitteisto

Myös MALDI-TOF -laitteen toimivuuden seuranta, säännöllinen huolto sekä tarvittaessa tehtävä laserin tehon nosto sekä detektorin toiminnan tarkastaminen on tärkeää luotettavien tuloksien saamiseksi. Laite tulisi kalibroida ja huoltaa säännöllisesti valmistajan ilmoittamalla tavalla. Laitteen toimivuutta seurataan säännöllisesti bakteeristandardin (Bacterial Test Standard, BTS) avulla suoritettavien kalibrointien avulla. [42.] Standardi on eräs *E.coli* -bakteerin kylmäkuivattu kanta (DH5 $\alpha$ ), johon on lisätty painokontrollimolekyylejä. Kalibrointiajossa 1  $\mu$ l sulatettua ja liuotettua bakteeristandardia pipetoidaan näytteen tapaan näytelevyn yhdelle spotille. Kuivumisen jälkeen päälle pipetoidaan 1  $\mu$ l matriisia ja spotin kuivumisen jälkeen näytelevy viedään laitteen sisään. Kalibrointi tapahtuu joko MALDI Biotyper RTC -ohjelmassa analyysiajon alussa tai erillisenä ajona flexControl -ohjelmassa. Kalibrointi suositellaan tehtäväksi vähintään kerran viikossa. Laite ilmoittaa kalibrointiajon onnistumisesta ja mikäli ajo ei onnistu, täytyy laitetta säätää ennen laitteen käytön jatkamista. [33, s. 3.]

Mikäli kalibrointi ei mene läpi, voidaan MALDI-TOF MS -laitteen detektorin toiminta tarkastaa. Tarkistus tehdään myös, mikäli korkeimmat spektrien intensiteetit jäävät mataliksi. Spektrien korkeimpien piikkien optimi-intensiteetti on noin 1–2 x 10<sup>4</sup>. Detektorin toiminnan tarkastus suositellaan tehtäväksi muutaman kuukauden välein tai tarvittaessa. Samalla voidaan myös optimoida laserin tehoa. Muihin MALDI-TOF MS -laitteen huoltotoimenpiteisiin kuuluu ionilähteen puhdistus, joka tulisi suorittaa säännöllisesti, sillä massaspektrometrin ionilähteen likaantuessa spektrien intensiteetit laskevat ja tunnistusteho kärsii. Muut huolto- ja säätötoimenpiteet tapahtuvat laitteen valmistajan kautta joko lähi- tai etähuoltona. Laitteen oikeaoppinen ja säännöllinen huolto takaa

sen, että laite toimii optimaalisesti ja bakteerien identifikaatio on mahdollisimman tehokasta. [42.]

## 5 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia MALDI-TOF MS -menetelmällä suoritettavan bakteerintunnistuksen soveltuvuutta *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifioimisessa, selvittämällä, miten kyseisen heimon eri bakteerisuvut tunnistuvat laitteen avulla. Ensimmäisessä vaiheessa MALDI Biotyper -laitteen tietokantaa laajennettiin lisäämällä sinne *Pasteurellaceae*-heimon bakteerilajien uusia kantoja. Kirjaston laajentamisen jälkeen, lisättyjen bakteerikantojen sekä muiden *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikantojen toimintaa tarkasteltiin työtä varten valittujen bakteerikantojen avulla. *Pasteurellaceae*-heimon lajien tunnistusta verrattiin ennen ja jälkeen kirjaston laajennuksen. Myös heimon lajien sukulaisuuksia tutkittiin MALDI Biotyper -laitteella luotujen dendrogrammien avulla. Toisessa vaiheessa *Pasteurellaceae*-heimosta valittiin *Mannheimia* sekä *Pasteurella* bakteerisuvut, joiden tunnistumista verrattiin Evirassa käytettäviin perinteisiin biokemiallisiin menetelmiin, ja saatuja tunnistustuloksia verrattiin keskenään.

## 6 Materiaalit

### 6.1 Työssä käytetyt kannat

Opinnäytetyötä varten *Pasteurellaceae*-heimosta valittiin eläinlääketieteellisesti merkittäviä bakteerilajeja. Lajeja valittaessa pyrittiin ensisijaisesti keskittymään sellaisiin lajeihin, joiden diagnostiikkaa toteutetaan Evirassa ja jotka ovat siksi laboratorioille tarpeellisia. Mukaan valittiin kuitenkin *Avibacterium*-sukuun kuuluva *A. paragallinarum* -kanta, jota ei ole eristetty eläimistä Suomessa, mutta jonka diagnostiikkaa Evira on tarvittaessa lupautunut suorittamaan.

Osa käytettävistä bakteerikannoista tilattiin DSMZ -kantakokoelmasta (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) ja loput olivat laboratorioden eläinnäytteistä eristettyjä kantoja Eviran Helsingin, Kuopion, Oulun sekä Seinäjoen laboratorioista. MALDI-TOF MS -laitteen tietokannan laajentamiseen käytettiin ainoastaan tyyppikantoja ja bakteerikantoja, jotka olivat riittävän tarkasti varmennettuja PCR -

tyypityksellä tai sekvensoimalla. Tyypikantoja ja muita varmennettuja kantoja käytettiin laitteen kirjaston laajentamiseen ja niiden sekä muiden työssä käytettyjen kantojen avulla tutkittiin eri bakteerisukujen sekä -lajien tunnistumista ennen ja jälkeen kirjaston laajentamisen. Työssä käytettiin myös MALDI Biotyper -laitteella jo aikaisemmin laboratorioissa tehtyjen bakteerikantojen identifikaatioajojen tuloksena saatuja spektrejä.

Taulukossa 9 on esitetty kaikki työssä käytetyt bakteerisuvut sekä -lajit. Bakteerilajien perään on sulkeisiin merkitty käytettyjen kantojen lukumäärä kyseisestä lajista. Varmistettujen kantojen lukumäärä kyseisestä lajista on merkitty sulkeisiin tummennetulla.

**Taulukko 9. Työssä käytetyt bakteerisuvut ja -lajit.**

<b><i>Actinobacillus</i></b>	<b><i>Avibacterium</i></b>	<b><i>Bibersteinia</i></b>
<i>A. equuli</i> (3+3) <i>A. seminis</i> (1) <i>A. porcinus</i> (1) <i>A. lignieresii</i> (4) <i>A. pleuropneumoniae</i> (8)	<i>A. paragallinarum</i> (1) <i>Avibacterium sp.</i> (1+2)	<i>B. trehalosi</i> (1+7)
<b><i>Histophilus</i></b>	<b><i>Haemophilus</i></b>	<b><i>Mannheimia</i></b>
<i>H. somni</i> (6+6)	<i>H. felis</i> (1) <i>H. parasuis</i> (4) <i>Haemophilus sp.</i> (1)	<i>M. haemolytica</i> (11) <i>M. varigena</i> (11) <i>M. ruminalis</i> (1+2) <i>M. granulomatis</i> (1) <i>Mannheimia sp.</i> (1+10)
<b><i>Nicoletella</i></b>	<b><i>Pasteurella</i></b>	<b><i>Pasteurellaceae</i></b>
<i>N. semolina</i> (2)	<i>P. canis</i> (1) <i>P. dagmatis</i> (1) <i>P. multocida</i> (5+13) <i>P. pneumotropica</i> (1) <i>Pasteurella sp.</i> (4)	<i>P. Bisgaard taxon 26</i> (1)

Työssä käytettiin yhteensä 115 bakteerikantaa yhdeksästä eri bakteerisuvusta. Bakteerikannoista 25 kappaletta oli varmennettuja PCR:llä tai sekvensoimalla ja loput perinteisin menetelmin laboratorioissa identifioituja kantoja.



## 6.2 Kantojen viljely

Käytettävät elatusaineet valittiin viljeltävien bakteerien mukaan. Suurinta osaa kannoista kasvatettiin tavallisella naudanveriagarilla, mutta tarpeen mukaan käytettiin myös CEM I-, FAA- (Fastidious Anaerobe Agar) tai GC -agareita (Gonokokkiagar).

Osa kannoista viljeltiin ensin naudanveriagarille, johon viljeltiin mukaan *Staphylococcus aureus* -bakteeri. Tietyt bakteerit kasvavat nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NAD) riippuvaisesti, joten viljelmässä täytyy olla mukana kyseistä koentsyymiä tuottava bakteerikanta (esim. *S. aureus*). Alkuperäisestä viljelmästä valittiin satelliittina *S. aureuksen* vieressä kasvava pesäke, joka edelleen viljeltiin CEM I -alustalle. Tällaisia bakteerikantoja olivat mm. *A. paragallinarum*, *A. pleuropneumoniae*, *H. felis* sekä *Pasteurellaceae Bisgaard taxon 26*. *A. seminis* -bakteerikanta viljeltiin rikkaammalle FAA-alustalle, sillä sitä ei saatu pysymään hengissä tavallisella naudanveriagarilla. *H. somni* -kannat GC-alustalle ja kaikki muut kannat tavalliselle naudanveriagarille.

Maljoja inkuboitii hiilidioksidatmosfäärissä (5 % CO<sub>2</sub>) 37 °C:een lämpötilassa 1–2 päivää bakteerista riippuen. Kaikki bakteerikannat pakastettiin myöhempää käyttöä varten.

## 7 Menetelmät

### 7.1 Referenssispektrien luominen

Työn seuraavassa vaiheessa hyödynnettiin Brukerin MALDI Biotyper -laitteen ominaisuutta, jonka avulla laitteen MSP-tietokantaan oli mahdollista lisätä omien, laboratoriossa eristettyjen, bakteerikantoja referenssispektrejä laitteen ohjelmiston avustuksella. Kirjastoon viemisen edellytyksenä on, että bakteerikantojen on ehdottomasti oltava joko tyyppikantoja tai muilla luotettavilla tavoilla, kuten sekvensoinnilla, varmennettuja kantoja. [42, s. 1.]

Kirjastoon vietävän bakteerikannan referenssispektri (Main Spectral Projection, MSP) esittää kyseisen bakteerikannan yksilöllistä proteiinispektiriä [43, s. 4]. Jotta MSP olisi tarpeeksi edustava, tulisi sen koostua vähintään 20 erillisestä spektristä. Tätä MSP:istä

koostettua kirjastoa käytetään siten tuntemattomien analyyttien tunnistuksessa. [32, s.113].

### 7.1.1 Kantojen käsittely

MSP:n luomisen ensimmäisessä vaiheessa tuoreille bakteerikannoille suoritettiin muuraishappo-asetonitriliuutto. Ennen tätä valmistettiin tuore bakteeristandardi (BTS) sekä HCCA-matriisi.

1 µl uutossa syntynyttä supernatanttia pipetoitiin näytelevylle kahdeksaan rinnakkaiseen spottiin, joiden annettiin kuivua. Tuoretta BTS:ää pipetoitiin 1 µl kahteen spottiin keskellä näytelevyä. Seuraavaksi näytteiden sekä BTS:n päälle pipetoitiin 1 µl tuoretta HCCA-matriisia. Tämän jälkeen näytelevy vietiin laitteen sisään.

Näytelevylle (96 paikkainen) mahtui kerrallaan 11 uutettavaa kantaa (kahdeksan spottia/kanta), joten kantojen uutot tehtiin useassa erässä. Käytetyn BTS:n sekä matriisin tuli olla jokaisella uuttokerralla tuoreita ja ne valmistettiin juuri ennen jokaista ajoa.

### 7.1.2 BTS:n sekä kantojen ajo

Laitteen kalibrointi-, kanta- sekä BTS-spottien tarkistus sekä spottien ajo suoritettiin MALDI Biotyper -laitteen flexControl -ohjelmassa. Jokaisen bakteerikannan kaikille kahdeksalle spotille syntyi ajossa kolme spektriä, jolloin yhden kannan spektrisarja koostui yhteensä 24:stä spektristä.

Ennen spektrien ajoa laitteen toiminta tarkastettiin BTS-kalibroinnilla. Tämän jälkeen jokaisen kantaspotin sekä BTS-spotin piikkien intensiteetit tarkistettiin manuaalisesti laserin avulla. Jokaisen spotin korkeimpien piikkien intensiteetti tuli olla yli 10 000 ( $10^4$ ). Mikäli piikkien intensiteetit jäivät mataliksi, täytyi laserin teho tarkastaa tai suorittaa uutto uudelleen. Tässä vaiheessa oli myös mahdollista hylätä yksittäinen kantaspotti, jonka intensiteetit jäivät liian mataliksi, mutta tällöin menetettiin kyseisen spotin kolme ajamatta jäävää spektriä. Ajon viimeisessä vaiheessa spotit kirjattiin ja niiden ajo ohjelmoitiin flexControl -ohjelmaan, jonka jälkeen käynnistettiin spottien varsinainen ajo.

### 7.1.3 BTS-spektrien tarkastaminen

Näytespottien ajon jälkeen siirryttiin flexAnalysis -ohjelmaan, jossa ensin tarkistettiin, että ajetun BTS -spotin kahdeksan piikkiä olivat määrätyissä massarajoissa. Tarkastamisessa käytettiin apuna alla olevaa taulukkoa 10.

**Taulukko 10. BTS:n piikkien massarajat [42, s. 2.]**

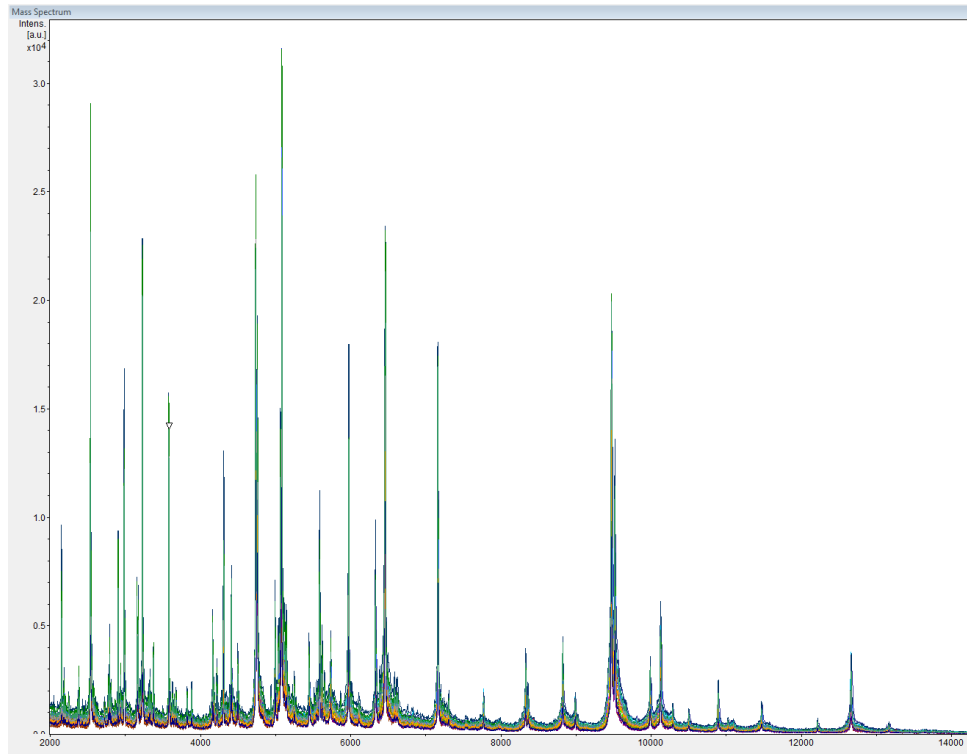
<b>BTS proteiini</b>	<b>Referenssimassa</b>	<b>± 300 ppm vaihteluväli</b>
RL29 [M+2H] <sup>2+</sup>	3637.8 Da	3636.7 - 3638.8 Da
RS32 [M+H] <sup>+</sup>	5096.6 Da	5095.3 - 5098.3 Da
RS34 [M+H] <sup>+</sup>	5381.4 Da	5379.8 - 5383.0 Da
RS33meth [M+H] <sup>+</sup>	6255.4 Da	6253.5 - 6257.3 Da
RL29 [M+H] <sup>+</sup>	7274.5 Da	7272.3 - 7276.7 Da
RS19 [M+H] <sup>+</sup>	10300.1 Da	10297.0 - 10303.2 Da
RNAse A [M+H] <sup>+</sup>	13683.2 Da	13679.1 - 13687.3 Da
Myoglobin [M+H] <sup>+</sup>	16952.3 Da	16947.2 - 16957.4 Da

BTS -spotin spektrien piikeistä tarkastettiin, että ne osuivat 300 ppm:n vaihteluvälille. Kahdeksasta piikeistä korkeintaan kaksi sai olla massarajojen ulkopuolella.

### 7.1.4 Spektrien esikäsittely

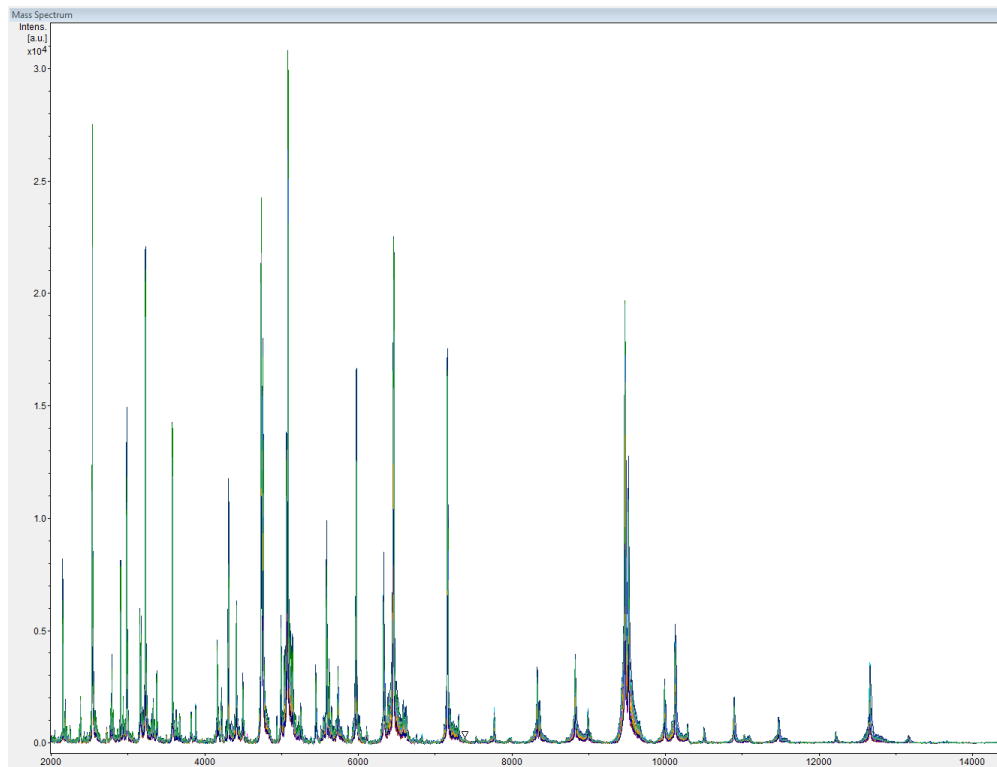
Ennen spektrien varsinaista käsittelyä kunkin kannan saadulle spektridatalle suoritettiin esikäsittely. Esikäsittelyssä tarkoituksena on korjata spektrien intensiteetti- sekä massa/varaus -arvoja. Tämä tapahtuu muun muassa taustakohinan sekä datan määrän vähentämisellä, joilla kannan spektrit saadaan sellaiseen muotoon, jossa niitä pystytään helposti vertailemaan keskenään. [44.] flexAnalysis -ohjelma suoritti datan esikäsittelyn automaattisesti.

Esikäsittelyssä käytettiin kahta ohjelman automaattista toimintoa. *Smoothing* -toiminnolla käsiteltävän kannan datan pisteet keskiarvoistettiin suhteessa viereisiin pisteisiin, jolloin taustakohinan määrä saatiin mahdollisimman pieneksi. *Baseline subtraction* -toimintoa käytettiin tasoittamaan spektrien pohjaviivat, jolloin pohjaviivan vaihtelevuus saatiin minimoitua näytteiden välillä. Vaihtelevuus on seurausta esimerkiksi matriisin aiheuttamasta kemiallisesta taustakohinasta. Molempia toimintoja käytetään datan normalisointiin, jonka avulla kantojen spektrejä pystytään paremmin vertaamaan toisiinsa [45]. Kuvassa 8 on näkyvissä MSP:n luonnin aikana saatu *Bibersteinia trehalosi*-kannan (ba-375) spektrien (24 kpl) raakadata ennen sen normalisointia.



**Kuva 8. Spektrien piikit ennen esikäsittelyä.**

Kuvassa 9 on esitetty saman kannan esikäsitelty ja normalisoitu raakadata.



**Kuva 9. Spektrit esikäsittelyn ja normalisoinnin jälkeen.**

Vielä ennen spektrien lopullista tarkistusta, saadut, esikäsitellyt spektrit ja niiden piikit käytiin manuaalisesti läpi puuttuvien tai ylimääräisten piikkien (outlier) varalta massa-alueelta 3000–10 000 m/z. Mikäli puuttuvia tai ylimääräisiä piikkejä löytyi, kyseinen spektri poistettiin.

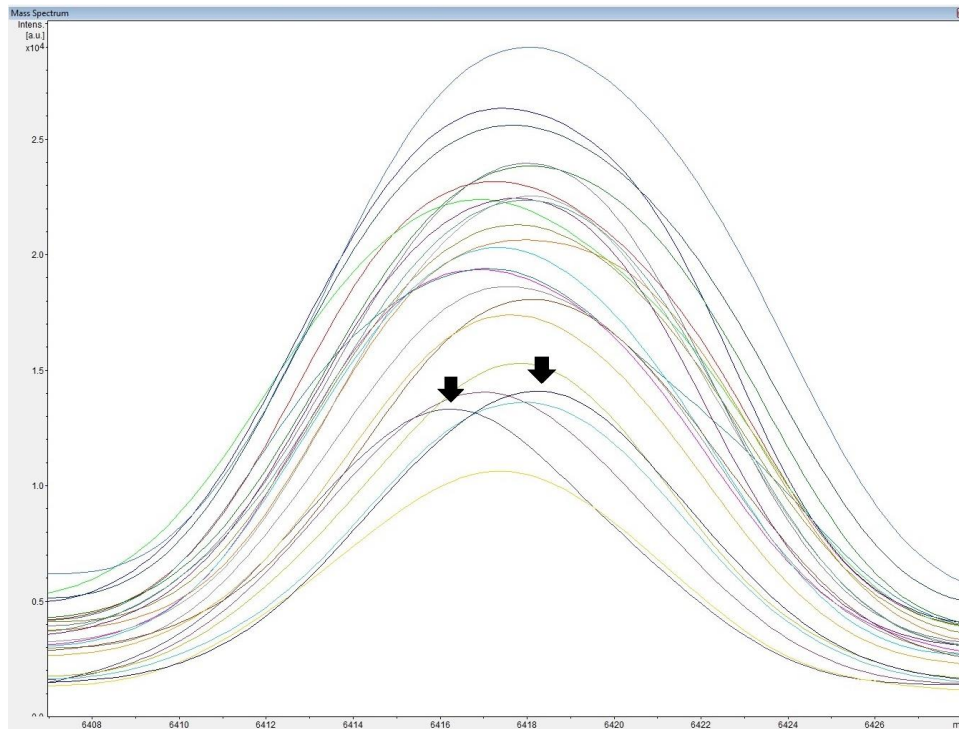
#### 7.1.5 Spektrien käsittely

Seuraavassa vaiheessa kunkin kannan spektrien korkeimmat spektrien piikit tarkastettiin massavälillä 3000–10 000 m/z (Da) aina tuhannen välein. Tarkastamisessa käytettiin apuna taulukkoa 11.

**Taulukko 11. Spektrien piikkien 500 ppm:n massarajat kullakin massa-alueella.**

Massa (m/z)	Erotus
3000	≤ 1.5
4000	≤ 2.0
5000	≤ 2.5
6000	≤ 3.0
7000	≤ 3.5
8000	≤ 4.0
9000	≤ 4.5
10000	≤ 5.0

Spektrit tarkastettiin alkaen massasta 3000 m/z (Da). Kyseisen massan alueelta valittiin korkein piikki, jonka kohdalta spektrejä siirryttiin tarkastelemaan lähemmin. Spektrien joukosta valittiin spektrien huippujen x-akselien arvojen perusteella arvoltaan suurin sekä pienin eli ne spektrit, joiden huiput ovat kaikista kauimpana toisistaan. Tämä on havainnollistettu kuvassa 10, jossa ollaan massa-alueella 6400 m/z. Spektrien huiput etsittiin silmämääräisesti arvioimalla.



**Kuva 10. Kauimmaisten spektrien huippujen etsiminen.**

Tämän jälkeen laskettiin kyseisten huippujen x-arvojen erotus ja tuloksen tuli olla taulukossa 15 esitetystä rajoista eli massa-alueella 3000 m/z korkeintaan 1.5. Mikäli piikit olivat massarajojen sisällä, siirryttiin massa-alueeseen 4000 m/z ja siitä edelleen eteenpäin tuhannen välein aina massa-alueeseen 10 000 m/z asti. Mikäli kauimmat huiput olivat liian kaukana toisistaan ja niiden välinen erotus oli liian suuri, täytyi arvioidusta keskimääräisestä huipusta kauempana ollut spektri poistaa. Lopuksi jäljelle jäänyt spektrisarja, jonka tuli tässä vaiheessa koostua vähintään 20 spektristä, tallennettiin ja siirrettiin MALDI Biotyper OC -ohjelmassa osaksi itse luotua Projects-kirjastoa.

## 7.2 *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysi

Ennen MALDI-TOF MS -analyysiä bakteerikannat viljeltiin valituille elatusaineille. Onnistuneen MALDI-TOF MS -analyysin perustana on mahdollisimman tuore bakteeriviljelmä; optimaalinen inkubointiaika riippuu tutkittavasta bakteerilajista sekä -kannasta. Suurinta osaa kannoista inkuboitui yksi vuorokausi, jonka jälkeen MALDI-TOF MS -analyysi suoritettiin. Mikäli kasvu oli hyvin heikkoa 24 tunnin inkuboinnin jälkeen, jatkettiin kasvatusta toiset 24 tuntia.

Bakteeriviljelmien inkuboinnin jälkeen suoritettiin niiden MALDI-TOF MS -analyysi. Näytteen käsittelyssä käytettiin suoraa siirrostusmenetelmää. Maljalta otettiin hammastikulla yksi yksittäinen bakteeripesäke, joka levitettiin huolellisesti näytelevyn kahteen spottiin. Näytelevyn annettiin kuivua, jonka jälkeen jokaisen spottiin pipetoitiin 1 µl HCCA -matriisia. Tämän jälkeen matriisin annettiin kuivua, jonka jälkeen näytelevy siirrettiin laitteen sisään ja analysoitiin MALDI-TOF MS -laitteella.

Kaikki varmistetut sekä muut bakteerikannat (115 kpl) ajettiin tavanomaisella tunnistusajolla MALDI Biotyper RTC -ohjelmassa kahdessa rinnakkaisessa spotissa. Kannat ajettiin valmistajan bakteerikirjastoa vasten (Bruker Taxonomy). Kahdesta rinnakkaisesta näytespotin spektristä valittiin se, joka antoi korkeammat vastaavuuspisteet (score value) ja tätä spektriä käytettiin myös seuraavassa ajossa.

Kirjaston laajennuksen jälkeen kannat ajettiin uudestaan vasten laajennettua kirjastoa, johon valittiin valmistajan kirjaston lisäksi kaikki tietokantaan itse lisättyjen bakteerikantojen MSP:t. Ajot suoritettiin MALDI Biotyper OC -ohjelmalla, jossa Biotyper RTC -ohjelmalla saadut, ajotiedostoihin tallennetut spektrit oli mahdollista hakea ja ajaa näihin tallennetut spektrit uudestaan offline-tilassa haluttuja kirjastoja vasten. Kirjastoksi valittiin Projects-kirjasto, jonne itse lisätyt bakteerikannat oli MSP:n tekovaiheessa viety. Biotyper OC -ohjelmalla saatuja tuloksia verrattiin aikaisemmin Biotyper RTC -ohjelmalla saatuihin tunnistusajojen tuloksiin ja katsottiin, onko *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien tunnistus parantunut.

### 7.3 MSP-dendrogrammit

MSP-dendrogrammien avulla on mahdollista tarkastella, kuinka läheistä sukua vertailtavat bakteerilajit tai -suvut ovat keskenään [32, s. 139]. Dendrogrammit luotiin MALDI Biotyper OC -ohjelman avulla ja lähtödatana käytettiin kirjastossa olevien bakteerikantojen MSP:itä.

### 7.4 *Mannheimia*-suvun bakteerien identifikaatio perinteisillä menetelmillä

*Mannheimia*-suvusta valittiin muutamia bakteerikantoja, joiden tunnistumista tutkittiin myös perinteisin Eviran laboratorioiden nykyisin käyttämin biokemiallisin menetelmin.

Tutkittaviksi valittiin sellaisia kantoja (11 kpl), joiden kohdalla MALDI-TOF MS -menetelmä ei antanut tyydyttävää tulosta. Tämän lisäksi mukaan otettiin yksi työssä käytetyistä tyypikannoista, jonka avulla perinteisen menetelmän toimivuutta voitiin tarkastella.

Eviran laboratoriossa *Mannheimia*-suvun tunnistukseen on käytössä *Mannheimia* -testisarja, joka koostuu 14:sta biokemiallisesta testistä. Tämän lisäksi kannoille tehtiin gram-värjäys. *Mannheimia*-testisarjan työohje on esitetty liitteessä 1.

#### 7.5 *Pasteurella*-suvun bakteerien identifikaatio perinteisillä menetelmillä

Myös *Pasteurella*-suvun tunnistumista tutkittiin biokemiallisin menetelmin. Tutkittavaksi valittiin viisi eri *Pasteurella*-kantaa, joihin kuului neljä eri *Pasteurella*-lajia: *P. canis* (2 kpl), *P. dagmatis*, *P. multocida* sekä *P. pneumotropica*.

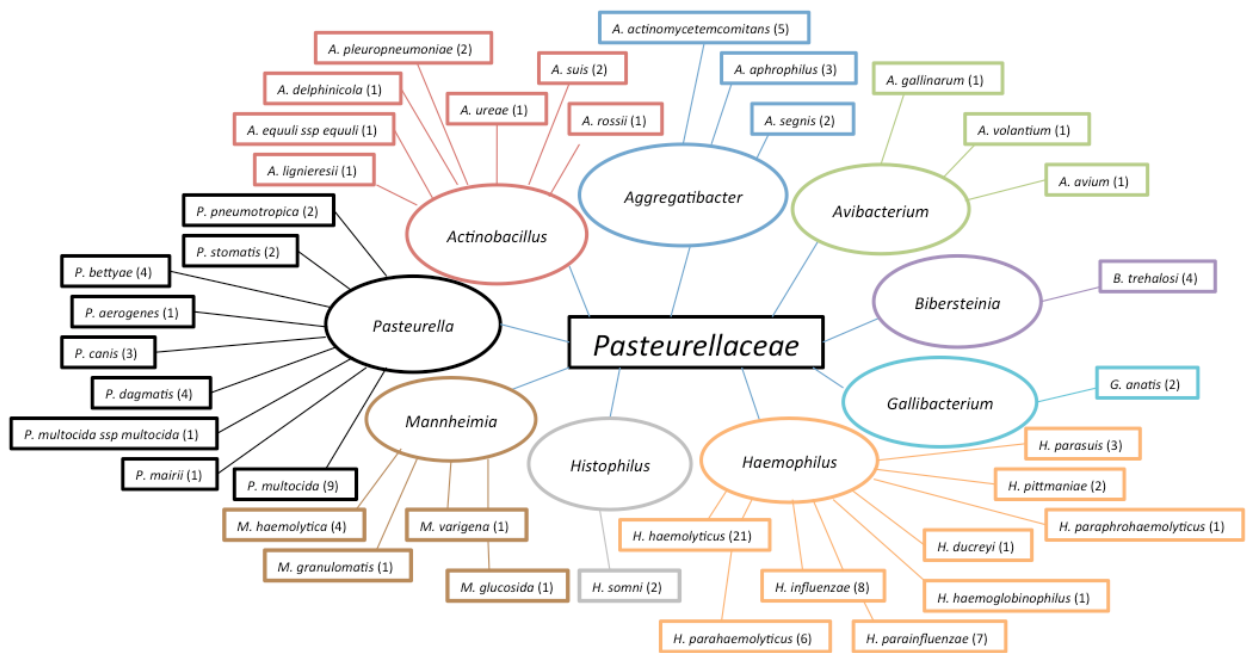
Eviran laboratorioissa *Pasteurella*-suvun tunnistukseen on käytössä tunnistettavasta kannasta riippuen joko API 20NE -testi (bioMérieux) tai *Pasteurella*-testisarja, joka koostuu kymmenestä biokemiallisesta testistä. API -testillä tutkittiin *P. multocida* sekä *P. pneumotropica* -kannat. Testin työohje on esitetty liitteessä 2. Loput kannoista tutkittiin *Pasteurella*-testisarjan avulla.



## 8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 8.1 MALDI-TOF MS -laitteen kirjastosta löytyvät bakteerikannat

Kuvassa 11 on esitetty kaikki MALDI Biotyper -laitteen kirjastosta (Bruker Taxonomy) löytyneet *Pasteurellaceae*-heimon bakteerisuvut sekä -lajit. Bakteerilajin nimen jälkeen on merkitty sulkuihin kyseisestä lajista löytyvien kantojen lukumäärä.



Kuva 11. MALDI Biotyper -laitteen kirjastosta löytyvät *Pasteurellaceae*-heimon bakteerisuvut sekä -lajit.

Kirjastossa oli edustettuna heimosta yhdeksän eri bakteerisukua. Useiden sukujen kohdalla kirjasto koostui ainoastaan yhdestä tai muutamasta eri lajista, joissa kantojen lukumäärä oli pieni. Tällaisia sukuja olivat muun muassa *Bibersteinia*, *Gallibacterium* sekä *Histophilus*.

## 8.2 MALDI Biotyper -laitteen kirjastoon itse lisätyt bakteerikannat

Laitteen kirjastoon lisättiin onnistuneesti kaikki työtä varten saadut, varmennetut bakteerikannat, joita oli yhteensä 25 kappaletta. Taulukossa 12 on esitetty kaikki kirjastoon lisätyt bakteerikannat sekä spektrien lukumäärä, josta kyseisen bakteerikannan luotu MSP koostuu. Uusia, kirjastosta alun perin puuttuvia bakteerilajeja oli yhteensä kahdeksan ja ne on merkitty taulukkoon lihavoituina.

**Taulukko 12. MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon lisätyt bakteerikannat.**

Bakteerikanta	Tunniste	Varmistusmenetelmä	Spektrien määrä
<b><i>Nicoletella semolina</i></b>	DSM 16380	Tyypikanta	20
<b><i>Avibacterium paragallinarum</i></b>	DSM 18554	Tyypikanta	23
<i>Actinobacillus equuli ssp haemolyticus</i>	DSM 22436	Tyypikanta	23
<b><i>Mannheimia ruminalis</i></b>	DSM 21141	Tyypikanta	21
<b><i>Actinobacillus seminis</i></b>	ATCC 15768, DSM 22263	Tyypikanta	24
<i>Histophilus somni</i>	KBAK-1493/3	PCR	23
<i>Histophilus somni</i>	KBAK-1914/1	PCR	19
<i>Histophilus somni</i>	KBAK-1890/3	PCR	19
<i>Histophilus somni</i>	KBAK-1691/2	PCR	18
<i>Histophilus somni</i>	KBAK-1589/3	PCR	21
<b><i>Actinobacillus porcinus</i></b>	ba-1263	Sekvensointi	23
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	ba-375	Sekvensointi	21
<b><i>Nicoletella semolina</i></b>	KBAK-7985	Sekvensointi	20
<i>Actinobacillus equuli</i>	KBAK-2940/1	Sekvensointi	23
<i>Actinobacillus equuli</i>	KBAK-2955/1	Sekvensointi	23
<i>Mannheimia sp.</i>	KBAK-787/2	Sekvensointi	24
<b><i>Haemophilus felis</i></b>	KBAK-2876	Sekvensointi	22
<i>Pasteurella multocida</i>	ba-4121/1	Sekvensointi	23
<i>Pasteurella multocida</i>	ba-4122/2	Sekvensointi	23
<i>Pasteurella multocida</i>	ba-4123	Sekvensointi	23
<i>Pasteurella multocida</i>	ba-4124/1	Sekvensointi	23
<i>Pasteurella multocida</i>	ba-4120/2	Sekvensointi	21
<i>Histophilus somni</i>	ba-368	Sekvensointi	21
<b><i>Pasteurellaceae Bisgaard taxon 26</i></b>	KBAK-485	Sekvensointi	23
<i>Avibacterium sp.</i>	KBAK-9521	Sekvensointi	23

Kirjastoon vietiin kantoja yhteensä 13:sta eri bakteerilajista. Useista lajeista lisättiin kirjastoon useampi saman lajin eri kanta.

Suurin osa kannoista saatiin lisättyä laitteen kirjastoon ensimmäisellä yrittämällä, muutama *Histophilus somni* -bakteerikanta (KBAK-1914/1, KBAK-1890/3, KBAK-1691/2) jouduttiin uuttamaan toiseen tai kolmanteen kertaan, sillä spektreissä oli sen verran hajontaa, että spektrien käsittelyvaiheessa spektrejä jouduttiin poistamaan niin monta, ettei MSP ollut enää edustava. Tästä johtuen kyseisten kantojen MSP:t koostettiin lopulta alle 20:stä spektristä huolimatta siitä, että valmistajan suosituksena oli koostaa MSP vähintään 20 spektristä.

### 8.3 *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysi

MALDI-TOF MS -analyysi suoritettiin kaikille työssä käytetyille 115:sta bakteerikannalle. MALDI Biotyper RTC- sekä OC -ohjelmilla saatuja bakteerikantojen tunnistustuloksia verrattiin keskenään ja tarkasteltiin bakteerisuvuittain.

### 8.3.1 *Actinobacillus*

*Actinobacillus*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 13. Vasemmanpuoleisessa sarakkeessa on esitetty kyseisen bakteerikannan identifikaatiotulos, joka on saatu käyttämällä perinteisiä biokemiallisia identifikaatiomenetelmiä. Keskimmaisessä sarakkeessa näkyy identifikaatiotulos, joka on saatu ajettaessa kanta valmistajan kirjastoa (Bruker Taxonomy) vasten MALDI-TOF MS -laitteella Biotyper RTC -ohjelmalla ja oikeanpuolimmaisessa sarakkeessa kanta on ajettu valmistajan kirjastoa sekä kirjastoon itse lisättyjä kantoja (Projects) vasten Biotyper OC -ohjelmalla. Identifikaatiotuloksen (ID) perässä tummennetulla on esitetty kanta, jota vasten saatiin parhaat vastaavuuspisteet (score value). Bakteerin nimi on merkitty tummennetulla vasemmanpuoleiseen sarakkeeseen, mikäli kyseessä on tyypikanta tai muu varmennettu kanta, joka lisättiin laitteen bakteerikirjastoon.

**Taulukko 13. *Actinobacillus*-suvun MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>A. equuli</i>	KBAK-2940/1	2.152	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>equuli</i> DSM 19655T DSM	2.649	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i> DSM 22436 Evira
<i>A. equuli</i>	KBAK-2955/1	2.096	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>equuli</i> DSM 19655T DSM	2.629	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i> DSM 22436 Evira
<i>A. equuli</i>	KBAK-968	2.102	<i>Actinobacillus suis</i> DSM 19774 DSM	2.512	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i> DSM 22436 Evira
<i>A. equuli</i>	KBAK-70	2.218	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>equuli</i> DSM 19655T DSM	2.536	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i> DSM 22436 Evira
<i>A. equuli</i>	HBAK-2379/1	1.757	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.516	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i> DSM 22436 Evira
<i>A. equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i>	DSM 22436	1.676	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> DSM 21417T DSM	2.692	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>haemolyticus</i> DSM 22436 Evira
<i>A. seminis</i>	DSM 22263	1.731	<i>Pasteurella multocida</i> FI FLR	2.281	<i>Actinobacillus seminis</i> DSM 22263 Evira
<i>A. porcinus</i>	ba-1263	2.205	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL	2.205	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL
<i>A. lignieresii</i>	KBAK-6883	2.239	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.239	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. lignieresii</i>	KBAK-10208	1.798	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	1.798	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL
<i>A. lignieresii</i>	HBAK-1424/1	2.251	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.251	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. lignieresii</i>	HBAK-2561/2	2.266	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.266	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i>	KBAK-9121	2.235	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.235	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i>	KBAK-482	2.040	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.040	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i>	KBAK-519	1.446	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DSM 13472T DSM	1.446	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DSM 13472T DSM
<i>A. pleuropneumoniae</i>	KBAK-520	1.973	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DSM 13472T DSM	1.973	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DSM 13472T DSM
<i>A. pleuropneumoniae</i>	KBAK-2172	1.954	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DSM 13472T DSM	1.954	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> DSM 13472T DSM
<i>A. pleuropneumoniae</i>	HBAK-284/2	2.206	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.206	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i>	HBAK-518/1	2.219	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.219	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i>	HBAK-2120/2	2.303	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.303	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL

*Actinobacillus*-suvun bakteerikantoja analysoitiin työn aikana 20 kappaletta ja kantoja oli viidestä eri bakteerilajista. *A. equuli* sekä *A. pleuropneumoniae* -bakteerikantoja oli määrällisesti eniten ja muutamista lajeista oli saatavilla vain yksi bakteerikanta. Neljä bakteerikantaa lisättiin MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon.

*A. equuli* -kannan (DSM 22436) lisäys kirjastoon selvästi paransi lajin tunnistumista, sillä kaikkien kantojen tunnistustulos parani kannan lisäämisen jälkeen. Aikaisemmista tutkimuksista tiedettiin, että MALDI-TOF MS -menetelmä ei kykene luotettavasti tunnistamaan *A. equuli* -bakteerin alalajeja (*ssp equuli* & *ssp haemolyticus*) eikä myöskään *A. suis* -kantaa näistä kahdesta, sillä lajit ovat fylogeneettisesti hyvin samanlaisia. Ala-

lajit pystytään kuitenkin usein erottamaan toisistaan muutaman biokemiallisen testin avulla. Rutiinidiagnostiikassa ei kuitenkaan usein ole tarvetta identifioida lajeja alalajitasolla asti, joten alalajien virheellinen tunnistuminen ei yleensä ole ongelma. [4, s. 242.]

*A. seminis* -bakteeria ei löytynyt alkuperäisestä valmistajan kirjastosta ja työn aikana sinne lisättiin yksi kyseisen lajin kanta (DSM 22263). Lajin tunnistumisesta MALDI-TOF MS -menetelmällä ei kuitenkaan pystytä antamaan luotettavia tuloksia, koska muita lajin kantoja ei ollut saatavilla.

MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon itse lisätyistä bakteerikannoista *A. porcinius* -kanta (ba-1263) tunnistui virheellisesti *H. parasuis* -bakteeriksi. Virheellisen identifikaation on voinut aiheuttaa esim. kontaminaatio, kannan pakastuksessa sattunut virhe tai sitten MSP:n luonti ei ole kyseisen kannan kohdalla onnistunut.

*A. lignieresii* -bakteerin kannat eivät tunnistuneet MALDI-TOF MS -menetelmällä. Yllä olevasta taulukosta huomataan, että lähes kaikki *A. lignieresii* -bakteeriksi perinteisin menetelmin identifioidut kannat tunnistuvat MALDI-TOF:lla *A. pleuropneumoniae* -bakteereiksi. Aikaisemmin tehdyistä tutkimuksista kävi kuitenkin ilmi, että *A. lignieresii* sekä *A. pleuropneumoniae* -bakteerit tunnistuvat usein ristiin MALDI-TOF MS -analyysillä, sillä kyseiset kannat ovat hyvin läheistä sukua keskenään. *A. lignieresii* on märehitijöiden ja *A. pleuropneumoniae* sikojen patogeeni, joten eristyskohteesta pystyy päättämään kummasta bakteerista on kyse. Koska kaikki työssä käytetyt *A. lignieresii* -kannat oli eristetty naudoista, voidaan päätellä, että MALDI-TOF MS -menetelmän antama tulos on suurella todennäköisyydellä virheellinen laitteen tunnistuessa kannat ristiin. Bakteerit on mahdollista erottaa myös NAD-riippuvuutta tarkastelemalla; *A. pleuropneumoniae* -bakteerin Suomessa tavattava tyyppi (biotyyppi 1) on NAD-riippuvainen toisin kuin *A. lignieresii* -bakteeri.

*A. pleuropneumoniae* -bakteeri tunnistui menetelmällä suhteellisen hyvällä vastaavuuspisteillä muutamaa kantaa lukuun ottamatta (KBAK-519, KBAK-520, KBAK-2172). Huomattava asia oli myös, että sikojen NAD-riippuvaiset taudinaiheuttajabakteerit (*A. pleuropneumoniae* sekä *H. parasuis*) kyetään erottamaan toisistaan MALDI-TOF MS -analyysillä luotettavasti. Tästä on paljon hyötyä, sillä kyseisten bakteerien erottaminen perinteisillä biokemiallisilla menetelmillä on usein haasteellista.

### 8.3.2 *Avibacterium*

*Avibacterium*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 14.

**Taulukko 14. *Avibacterium*-suvun MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifiointi		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>A. paragallinarum</i>	DSM 18554	1.634	<i>Avibacterium endocarditidis</i> DSM 18224T DSM	2.254	<i>Avibacterium paragallinarum</i> DSM 18554 Evira
<i>Avibacterium sp.</i>	KBAK-9521	1.493	<i>Haemophilus haemolyticus</i> DN624 SLH	2.302	<i>Avibacterium sp.</i> KBAK 9521 Evira
<i>Avibacterium sp.</i>	OBAK-2529/3	1.871	<i>Avibacterium endocarditidis</i> DSM 18224T DSM	1.871	<i>Avibacterium endocarditidis</i> DSM 18224T DSM
<i>Avibacterium sp.</i>	HBAK-2585	2.096	<i>Avibacterium endocarditidis</i> DSM 18224T DSM	2.096	<i>Avibacterium endocarditidis</i> DSM 18224T DSM

*Avibacterium*-suvun bakteerikantoja analysoitiin työn aikana ainoastaan neljä kappaletta. Kannosta kolme oli alun perin identifioitu ainoastaan sukutasolle (*Avibacterium sp.*) ja neljäs kanta (*A. paragallinarum*, DSM 18554) lisättiin MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon.

*A. paragallinarum* -bakteeri puuttui MALDI-TOF MS -laitteen kirjastosta kokonaan, joten sen lisäämisellä saatiin lajin identifikaatiomahdollisuutta parannettua. Työssä käytettiin kuitenkin vain yhtä kantaa, sillä itse eristetyt kantoja ei ollut saatavilla, koska lajia ei ole eristetty Suomessa. Evira on kuitenkin lupautunut suorittamaan kyseisen lajin diagnostiikkaa tarvittaessa, joten kanta haluttiin lisätä MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon. *Avibacterium*-suvun identifikaation parempi tarkasteleminen vaatisi MALDI-TOF MS -menetelmän testaamista suuremmalla määrällä kyseisen suvun kantoja, sillä näin pienellä otannalla luotettavia ja kattavia tuloksia ei pystytä esittämään.

Työn aikana tehtyjen MSP-dendrogrammien avulla voitiin lajin tunnistumisesta kuitenkin päätellä, ettei se luultavasti tunnistu muiksi *Pasteurellaceae*-heimon lajeiksi kovin herkästi, sillä se erottuu dendrogrammissa selkeästi omaan haaraan.

### 8.3.3 *Bibersteinia*

*Bibersteinia*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 15.

**Taulukko 15. *Bibersteinia*-suvun MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biolyser RTC (Bruker Taxonomy)		Biolyser OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>B. trehalosi</i>	ba-375	2.331	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.331	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG
<i>B. trehalosi</i>	KBAK-19149	1.987	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	1.987	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL
<i>B. trehalosi</i>	KBAK-4628	2.432	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 35739 CCUG	2.432	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 35739 CCUG
<i>B. trehalosi</i>	ba-664	2.351	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	2.351	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD
<i>B. trehalosi</i>	SBAK-4330	2.426	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.426	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG
<i>B. trehalosi</i>	HPBA-9	2.371	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.448	<i>Bibersteinia trehalosi</i> HBAK 963 Evira
<i>B. trehalosi</i>	HBAK-2289/1	2.420	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.420	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG
<i>B. trehalosi</i>	HBAK-2344/1	2.477	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.477	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG

*Bibersteinia*-sukuun ainoana bakteerilajina kuuluvan *B. trehalosi* -bakteerin kantoja analysoitiin työn aikana kahdeksan kappaletta. MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon lisättiin niistä yksi kanta.

*B. trehalosi* -bakteerikannat tunnistuivat MALDI-TOF MS -analyysillä hyvin. Kahden kannan (KBAK-19149, ba-664) perinteisten menetelmien identifikaatiotulokset erosivat MALDI-TOF MS -laitteen antamista tuloksista ja tunnistuivat *Mannheimia*-suvun bakteereiksi. Kyseiset kannat tutkittiin myöhemmin työn aikana *Mannheimia* -testisarjan avulla. Muut kannat tunnistuivat kuitenkin luotettavasti ja korkeilla vastaavuuspisteillä.

Yksi *B. trehalosi* -bakteerikanta lisättiin MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon työn aikana (ba-375). Tämän kannan tunnistumista tarkastellessa huomattiin, että vaikka tietyistä kannasta oli luotu MSP, jonka toimivuutta tarkasteltiin ajamalla sama kanta MSP:n luomisen jälkeen uudelleen, ei parhaat vastaavuuspisteet saanut kanta ollut välttämättä identtinen ajetun kannan kanssa, vaikka kyseessä olikin täysin sama bakteerikanta. Tämä voidaan selittää sillä, että bakteerikantojen tunnistumiseen vaikuttavat monet tekijät kuten viljelmän ikä, sen kunto sekä esimerkiksi näytteen levitys näytelevylle. Tästä syystä mitä enemmän kantoja laitteen kirjastossa on edustettuna, sitä todennäköisempää kantojen tunnistuminen on, sillä laajempi kirjasto kattaa paremmin bakteerikantojen sisäisen vaihtelun. [47.]

### 8.3.4 *Haemophilus*

*Haemophilus*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 16.

**Taulukko 16. *Haemophilus*-suvun MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>H. felis</i>	KBAK-2876	1.561	<i>Pasteurella stomatis</i> V665 MCRF	2.225	<i>Haemophilus felis</i> KBAK 2876 Evira
<i>H. parasuis</i>	GNS 2675	2.271	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL	2.271	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL
<i>H. parasuis</i>	GNS 2758	2.304	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL	2.304	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL
<i>H. parasuis</i>	GNS 2874	2.244	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL	2.244	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL
<i>H. parasuis</i>	HBAK-517/1	2.296	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL	2.296	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL
<i>Haemophilus sp.</i>	HBAK-264/3	2.199	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL	2.199	<i>Haemophilus parasuis</i> CIP 100918T CTL

*Haemophilus*-suvun kantoja analysoitiin työn aikana yhteensä kuusi kappaletta ja kantoja oli kahdesta eri bakteerilajista. Näiden lisäksi yksi kanta oli identifioitu perinteisillä menetelmillä ainoastaan sukutasolle. MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon lisättiin yksi bakteerikanta.

*H. parasuis* sekä *H. felis* -kannat tunnistuivat samoiksi sekä perinteisillä menetelmillä että MALDI-TOF MS -analyysillä. Sukutasolle perinteisin menetelmin tunnistettu kanta (HBAK-264/3) tunnistui *H. parasuis* -bakteeriksi MALDI-TOF MS -analyysillä. Yksi *H. felis* -bakteerikanta (KBAK-2876) lisättiin itse laitteen kirjastoon. Kyseinen bakteeri puuttui kokonaan alkuperäisestä kirjastosta, joten käytetty kanta tunnistui ensimmäisessä ajossa virheellisesti. Kannan kirjastoon lisäämisen jälkeen kanta tunnistui, mutta koska muita kyseisen lajin kantoja ei ollut saatavilla, ei kannan todellisesta tunnistumisesta voida arvioida luotettavasti. Tuloksista voidaan todeta se, että näyttää kuitenkin siltä, että *H. felis* -kanta ei ainakaan sekoitu muiden *Haemophilus*-suvun bakteerilajien kanssa. *H. parasuis* -bakteerikannat tunnistuivat menetelmällä luotettavasti jo peruskirjastolla, eivätkä kannat tunnistuneet ristiin toisen sikapatogeenin, *A. pleuropneumoniae* -bakteerin kanssa.



### 8.3.5 *Histophilus*

*Histophilus*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 17.

Taulukko 17. *Histophilus*-suvun MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>H. somni</i>	KBAK-1914/1	2.171	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL	2.407	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	KBAK-1589/3	2.162	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL	2.322	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1493 Evira
<i>H. somni</i>	KBAK-1890/3	2.115	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD	2.162	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	KBAK-1493/3	2.146	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD	2.285	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	KBAK-1691/2	2.156	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL	2.281	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	ba-368	2.110	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL	2.286	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	OBAK-2077/2	2.213	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL	2.213	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL
<i>H. somni</i>	OBAK-487/1	2.104	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD	2.208	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	OBAK-671/4	2.196	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD	2.196	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD
<i>H. somni</i>	T568	2.159	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD	2.311	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	HBAK-1579	1.948	<i>Histophilus somni</i> GD34 GDD	2.257	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira
<i>H. somni</i>	HBAK-2605/3	2.145	<i>Histophilus somni</i> 512 LAL	2.220	<i>Histophilus somni</i> KBAK 1589 Evira

*Histophilus*-sukuun ainoana bakteerilajina kuuluvan *H. somni* -bakteerin kantoja analysoitiin työn aikana yhteensä 12 kappaletta. MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon lisättiin kuusi bakteerikantaa.

Kaikki *H. somni* -bakteerikannat tunnistuivat samoiksi sekä perinteisillä menetelmillä että MALDI-TOF MS -analyysillä. Itse lisättyjen bakteerikantojen lisäys kirjastoon paransi tunnistustuloksia lähes jokaisen kannan kohdalla. Useiden kantojen kohdalla paras tunnistustulos saatiin juuri itse lisätyillä kannoilla. Aikaisempien tutkimusten mukaan [46.] on esitetty, että *H. somni* -bakteeri ei tunnistu luotettavasti MALDI-TOF MS -analyysillä, joka on toteutettu suoralla siirrostusmenetelmällä. Tuloksista kuitenkin huomataan, että tunnistuminen on riittävää jokaisen kannan kohdalla suoralla siirrostusmenetelmällä. Näin uuttomenetelmiä voidaan hyödyntää siinä tapauksessa, mikäli suora menetelmä ei anna haluttua tulosta.

### 8.3.6 *Mannheimia*

*Mannheimia*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 18.

**Taulukko 18. *Mannheimia*-suvun MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)			Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID	
<i>M. haemolytica</i>	KBAK-2231	2.400	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.400	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. haemolytica</i>	KBAK-4425	2.342	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	2.342	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	
<i>M. haemolytica</i>	KBAK-5137	2.347	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.347	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. haemolytica</i>	KBAK-8314	2.382	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.382	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. haemolytica</i>	KBAK-10384	2.354	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	2.354	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	
<i>M. haemolytica</i>	SBAK-284	2.365	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	2.365	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	
<i>M. haemolytica</i>	SBAK-493	2.162	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.162	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>M. haemolytica</i>	SBAK-2385	2.246	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.246	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>M. haemolytica</i>	HBAK-2775/1	2.093	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	2.093	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	
<i>M. haemolytica</i>	HBAK-430/2	2.306	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.306	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. haemolytica</i>	HBAK-2228/1	2.370	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.370	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. varigena</i>	KBAK-2851	1.986	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	1.986	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	
<i>M. varigena</i>	KBAK-8240	1.961	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	1.961	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>M. varigena</i>	KBAK-10600	2.287	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.287	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. varigena</i>	KBAK-122	1.525	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	1.572	<i>Mannheimia ruminalis</i> DSM 21141 Evira	
<i>M. varigena</i>	KBAK-124	1.677	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	1.677	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>M. varigena</i>	KBAK-732	2.342	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.342	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>M. varigena</i>	KBAK-763	2.340	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.340	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>M. varigena</i>	SBAK-696	2.135	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	2.135	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	
<i>M. varigena</i>	SBAK-719	1.836	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	1.836	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	
<i>M. varigena</i>	HBAK-525/1	2.137	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	2.137	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	
<i>M. varigena</i>	HBAK-2148/6	2.230	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	2.230	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	
<i>M. ruminalis</i>	KBAK-4628	2.458	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.458	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>M. ruminalis</i>	KBAK-2535	2.174	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	2.174	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 351 LAL	
<b><i>M. ruminalis</i></b>	DSM 21141	1.865	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	2.494	<i>Mannheimia ruminalis</i> DSM 21141 Evira	
<i>M. granulomatis</i>	KBAK-8287	1.787	<i>Mannheimia ruminalis</i> DSM 5283 BRB	1.942	<i>Mannheimia ruminalis</i> DSM 21141 Evira	
<i>Mannheimia</i> sp	KBAK-3791	2.239	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.239	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>Mannheimia</i> sp	KBAK-4026	2.300	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.300	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>Mannheimia</i> sp	KBAK-5256	2.369	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	2.369	<i>Mannheimia haemolytica</i> GD44 GDD	
<i>Mannheimia</i> sp	KBAK-5301	2.329	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.329	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>Mannheimia</i> sp	KBAK-5839	2.418	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.418	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	
<i>Mannheimia</i> sp	KBAK-10404	2.273	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	2.273	<i>Mannheimia haemolytica</i> DSM 10531T BRB	
<i>Mannheimia</i> sp.	OBAK-740/1	1.961	<i>Mannheimia haemolytica</i> 535 LAL	2.188	<i>Mannheimia ruminalis</i> DSM 21141 Evira	
<i>Mannheimia</i> sp.	OBAK-364/1	2.277	<i>Mannheimia granulomatis</i> DSM 19156T DSM	2.277	<i>Mannheimia granulomatis</i> DSM 19156T DSM	
<i>Mannheimia</i> sp.	OBAK-1948/3	1.385	<i>Haemophilus haemolyticus</i> DN161 SLH	1.429	<i>Nicoletella semolina</i> KBAK 7985 Evira	
<i>Mannheimia</i> sp.	SBAK-1319	1.605	<i>Haemophilus haemolyticus</i> CCUG 12834T CCUG	1.605	<i>Haemophilus haemolyticus</i> CCUG 12834T CCUG	
<b><i>Mannheimia</i> sp.</b>	KBAK-787/2	2.059	<i>Mannheimia varigena</i> DSM 19166T DSM	2.283	<i>Mannheimia</i> sp. KBAK 787 Evira	

*Mannheimia*-suvun bakteerikantoja oli saatavilla määrällisesti eniten ja kantoja analysoitiin työn aikana 37 kappaletta. Analysoitavia kantoja oli neljästä eri bakteerilajista sekä 11 sukutasolle perinteisin menetelmin identifioitua kantaa. MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon lisättiin kaksi bakteerikantaa.

Lajitasolle identifioituista kannoista 11 tunnistui eri lajeiksi verrattaessa perinteisiä menetelmien antamaa tulosta MALDI-TOF MS -analyysin tuloksiin. Tuloksia tarkastelemalla näyttää siltä, että *M. haemolytica* sekä *M. varigena* -bakteerit saattavat tunnistua laitteella ristiin lajien sukulaisuuden vuoksi. Alun perin sukutasolle tunnistetuista kan-

noista (11 kpl) kaksi ei tunnistunut MALDI-TOF MS -analyysillä *Mannheimia*-suvun lajeiksi (OBAK-1948/3, SBAK-1319). On hyvin mahdollista, että kyseiset kannat olivat esimerkiksi alun perin identifioitu virheellisesti, saastuneet tai pakastettu väärin ja siksi antoivat virheellisiä tuloksia. Laitteen kirjastoon itse lisättyjä bakteerikantoja oli kaksi (*M. ruminalis*, DSM 21141 & KBAK-787/2), joista jälkimmäinen oli identifioitu ainoastaan sukutasolle.

*Mannheimia*-suvun lajien tunnistuminen oli hyvin vaihtelevaa. Vaikka suurin osa kannoista tunnistui hyväksyttävillä vastaavuuspisteillä, erosi tunnistustulos usean kannan kohdalla verrattaessa aiemmin tehtyjen perinteisten menetelmien antamaa tulosta MALDI-TOF MS -analyysin tuloksiin. Suurimpana ongelmana käytettyjen kantojen kanssa oli se, että vaikka kantoja oli saatavilla runsaasti, oli niistä suurin osa identifioitu perinteisillä menetelmillä ja saatavilla oli vain muutama varmistettu kanta. Tällöin ei voida olla varmoja, onko kannat alun perin identifioitu oikein, jolloin myös MALDI-TOF MS -analyysin tuloksiin tulee suhtautua varauksella. Suvun lajien tunnistumista laitteella tulisi tutkia lisää esim. sekvensoiduilla kannoilla, sillä osa työssä tutkituista kannoista oli vanhoja, eikä suvun eri lajeja pystytty silloin välttämättä luotettavasti erottamaan toisistaan perinteisillä menetelmillä. Teoriassa MALDI-TOF MS -laitteen tulisi tunnistaa *Mannheimia*-suvun lajit toisistaan, mutta Evirassa aiemmin saatujen kokemusten perusteella jotkin lajit saattavat silti käytännössä tunnistua virheellisesti [31.]

### 8.3.7 *Nicoletella*

*Nicoletella*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 19.

**Taulukko 19. *Nicoletella*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>N. semolina</i>	DSM 16380	1.646	<i>Haemophilus parasuis</i> 11 00578 03 VAXM	2.634	<i>Nicoletella semolina</i> DSM 16380 Evira
<i>N. semolina</i>	KBAK-7985	1.554	<i>Kandleria vitulina</i> DSM 20405T DSM	2.009	<i>Nicoletella semolina</i> KBAK 7985 Evira

*Nicoletella*-sukuun ainoana lajina kuuluvan *Nicoletella semolina* -bakteerin kantoja oli saatavilla kaksi kappaletta. Molemmat saatavilla olevista kannoista lisättiin MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon.

Kumpikaan kanta ei ensimmäisessä ajossa tunnistunut oikein, sillä kyseinen bakteerilaji puuttui alkuperäisestä kirjastosta. Kantojen kirjastoon lisäämisen jälkeen molemmat tunnistuivat hyväksyttävillä vastaavuuspisteillä. Kyseisen bakteerilajin tunnistumista on hankala analysoida kattavasti saatujen tuloksien perusteella tutkittujen kantojen vähyyden vuoksi. Aikaisempien tutkimusten perusteella [46.] on kuitenkin havaittu, että *N. semolina* -bakteeri tunnistuu MALDI-TOF MS -analyysillä hyvin ja erottuu selvästi muista *Pasteurellaceae* -heimon bakteereista. Työssä sadut tulokset tukevat tätä tutkimustulosta.

### 8.3.8 *Pasteurella*

*Pasteurella*-suvun bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 20.

**Taulukko 20. *Pasteurella*-suvun bakteerien MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>P. canis</i>	HBAK-1664/1	2.344	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM	2.344	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM
<i>P. dagmatis</i>	HBAK-1664/3	2.329	<i>Pasteurella dagmatis</i> V176 MCRF	2.329	<i>Pasteurella dagmatis</i> V176 MCRF
<i>P. multocida</i>	ba-4124/1	2.415	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.482	<i>Pasteurella multocida</i> Evira
<i>P. multocida</i>	ba-4122/2	2.455	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.467	<i>Pasteurella multocida</i> Evira
<i>P. multocida</i>	ba-4123	2.516	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.516	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR
<i>P. multocida</i>	ba-4121/1	2.582	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.582	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR
<i>P. multocida</i>	ba-4120/2	2.303	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.452	<i>Pasteurella multocida</i> HBAK 966 Evira
<i>P. multocida</i>	OBAK-650/2	2.512	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.521	<i>Pasteurella multocida</i> HBAK 959 Evira
<i>P. multocida</i>	OBAK-159/1	2.217	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.532	<i>Pasteurella multocida</i> Evira
<i>P. multocida</i>	OBAK-3201/1	2.397	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.574	<i>Pasteurella multocida</i> Evira
<i>P. multocida</i>	OBAK-3554/1	1.978	<i>Pasteurella canis</i> VA 01363 0 09 ERL	1.978	<i>Pasteurella canis</i> VA 01363 0 09 ERL
<i>P. multocida</i>	OBAK-3533/1	1.812	<i>Pasteurella multocida</i> besSt7 THL	2.542	<i>Pasteurella multocida</i> Evira
<i>P. multocida</i>	SBAK-2045	2.368	<i>Pasteurella dagmatis</i> V176 MCRF	2.368	<i>Pasteurella dagmatis</i> V176 MCRF
<i>P. multocida</i>	SBAK-2197	2.142	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM	2.142	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM
<i>P. multocida</i>	SBAK-2261	2.379	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR	2.379	<i>Pasteurella multocida</i> A244 07 FLR
<i>P. multocida</i>	SBAK-2785	2.100	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM	2.100	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM
<i>P. multocida</i>	SBAK-1353	1.928	<i>Pasteurella canis</i> VA 01363 3 09 ERL	1.928	<i>Pasteurella canis</i> VA 01363 3 09 ERL
<i>P. multocida</i>	SBAK-2299	2.440	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM	2.440	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM
<i>P. multocida</i>	GNS 22	2.336	<i>Pasteurella multocida</i> FI FLR	2.421	<i>Pasteurella multocida</i> HBAK 959 Evira
<i>P. multocida</i>	HBAK-2314/1	2.258	<i>Pasteurella multocida</i> besSt7 THL	2.361	<i>Pasteurella multocida</i> Evira
<i>P. pneumotropica</i>	HBAK-1578	2.052	<i>Haemophilus haemolyticus</i> DN161 SLH	2.282	<i>Pasteurella pneumotropica</i> LDJ507-12
<i>Pasteurella</i> sp.	SBAK-2183	2.281	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.281	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG
<i>Pasteurella</i> sp.	SBAK-2951	1.835	<i>Pasteurella stomatis</i> V655 MCRF	1.835	<i>Pasteurella stomatis</i> V655 MCRF
<i>Pasteurella</i> sp.	SBAK-3230	2.106	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM	2.106	<i>Pasteurella canis</i> 26 PIM
<i>Pasteurella</i> sp.	SBAK-423	2.417	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG	2.417	<i>Bibersteinia trehalosi</i> CCUG 46489 CCUG

*Pasteurella*-suvun bakteerikantoja analysoitiin työn aikana 25 kappaletta ja eri bakteerilajeja oli yhteensä neljä. Tämän lisäksi neljä bakteerikantaa oli identifioitu ainoastaan sukutasolle. MALDI-TOF MS -laitteen kirjastoon lisättiin työn aikana viisi *P. multocida* -bakteerikantaa.

*Pasteurella*-suvun bakteerien tunnistuminen MALDI-TOF MS -analyysillä oli suhteellisen luotettavaa ja kannat tunnistuivat korkeilla vastaavuuspisteillä. Suurin osa kannoista tunnistui luotettavasti jo peruskirjastolla. Kuitenkin useampi *P. multocida* -bakteeriksi perinteisin menetelmin tunnistettu bakteerikanta tunnistui MALDI-TOF MS -analyysillä *P. canikseksi* tai *P. dagmatikseksi*. Kaksi sukutasolle tunnistettua kantaa tunnistui muiksi kuin *Pasteurella* -suvun lajeiksi (SBAK-2183, SBAK-423). Aikaisemmissa tutkimuksissa [4, s. 240] on osoitettu, että MALDI-TOF MS -laitteella on mahdollista tunnistaa kaikki *Pasteurella*-suvun lajit luotettavasti toisistaan, ja saadut tulokset tukevat tätä väitettä.

### 8.3.9 Muut

Muiden bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset on esitetty taulukossa 21.

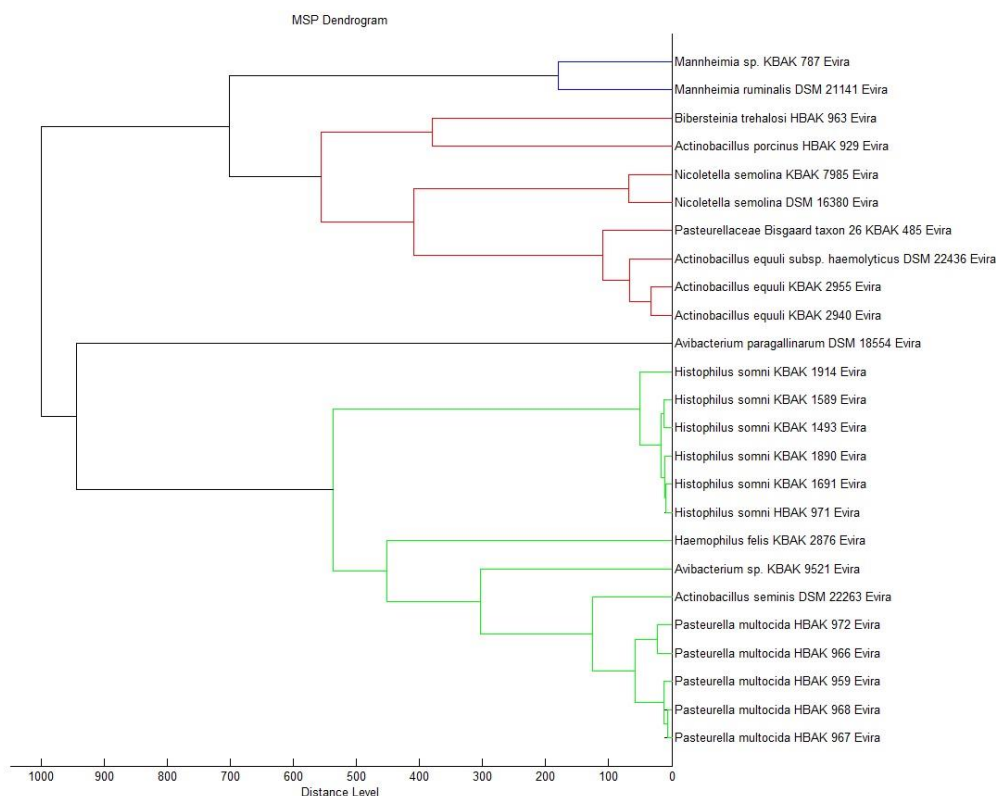
**Taulukko 21. Muiden bakteerikantojen MALDI-TOF MS -analyysin tulokset.**

Perinteinen identifikaatio		Biotyper RTC (Bruker Taxonomy)		Biotyper OC (Bruker Taxonomy + Projects)	
ID	Tunniste	Score	ID	Score	ID
<i>P. Bisgaard taxon 26</i>	KBAK-485	1.907	<i>Actinobacillus equuli</i> ssp <i>equuli</i> DSM 19655T DSM	2.542	<i>Pasteurellaceae Bisgaard taxon 26</i> KBAK 485 Evisa

Yksi työhön käytetyistä bakteerikannoista, *Pasteurellaceae Bisgaard taxon 26* (KBAK-485), kuului vielä tarkemmin luokittelemattomiin *Pasteurellaceae*-heimon bakteereihin. *P. Bisgaard taxon 26* -ryhmään kuuluu useita samankaltaisia, vielä luokittelemattomia, bakteereita, joista tiedetään sen verran, että ne on luokiteltu *Actinobacillus*-suvun tyyppiin bakteereihin [48.] Bakteerikanta oli kuitenkin identifioitu sekvensoimalla, joten sitä käytettiin MALDI-TOF MS -laitteen kirjaston laajentamiseen. Tämänkin lajin kohdalla luotettavia tuloksia on mahdotonta antaa, koska lisätyn bakteerikannan toimintaa ei pystytty kattavasti testaamaan. Kyseinen bakteerikanta ei kuitenkaan näytä sekoittuvan muiden *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikantojen kanssa.

## 8.4 MSP-dendrogrammit

Työn loppupuolella luotiin kaksi MSP-dendrogrammia, joiden avulla tarkasteltiin bakteerisukujen sekä -lajien välisiä sukulaisuuksia. Ensimmäiseen dendrogrammiin valittiin kaikki laitteen kirjastoon itse lisätyt bakteerikannat, ja dendrogrammi luotiin käyttäen kantojen MSP:tä. Kyseinen MALDI Biotyper OC -ohjelman avustuksella luotu dendrogrammi on esitetty kuvassa 12.



**Kuva 12.** Lisättyjen MSP:n pohjalta luotu MSP-dendrogrammi.

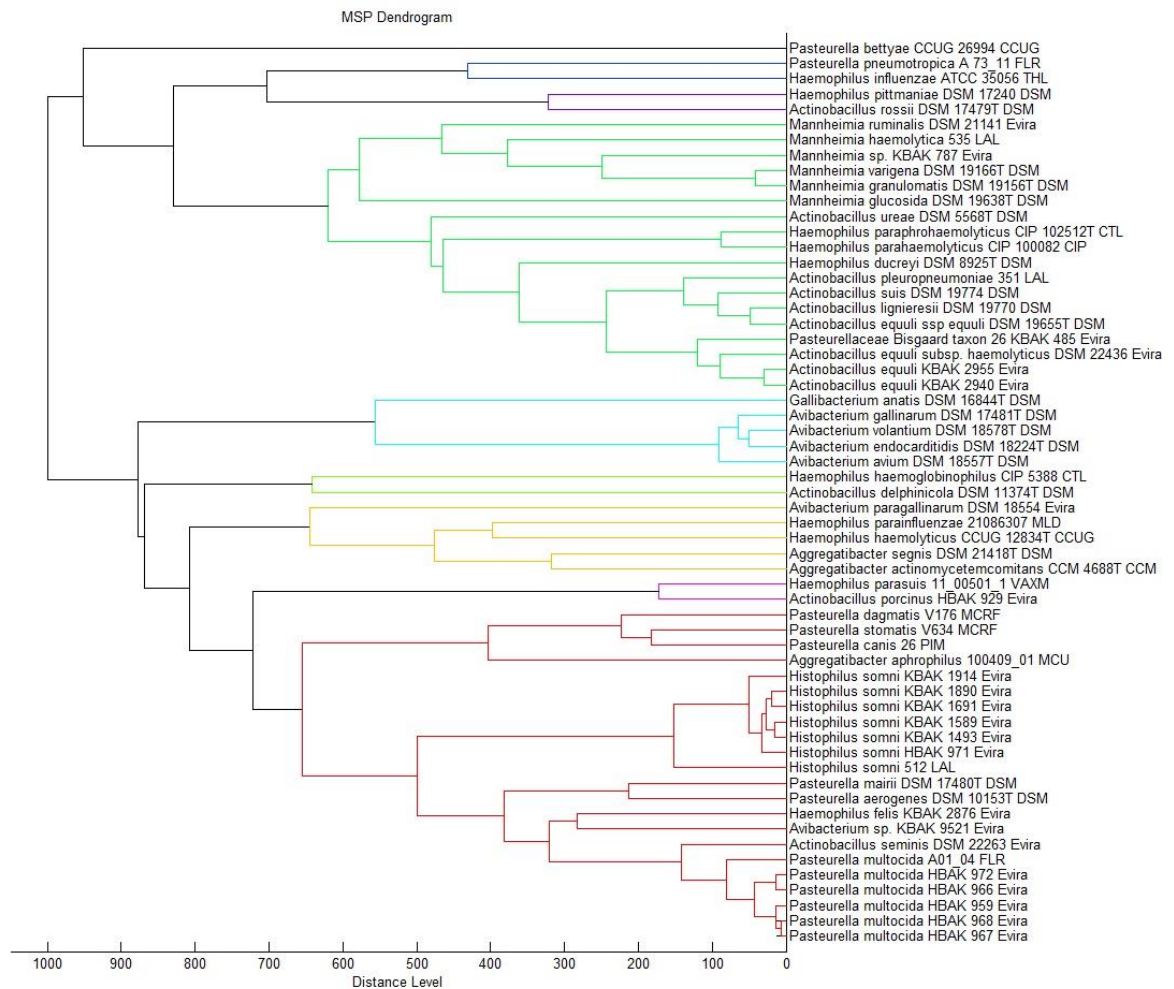
Dendrogrammista huomataan, että lähisukuiset bakteerikannat klusteroituivat lähikäin samaan haaraan ja samankaltaiset kannat on kuvattu samalla värillä. Kantoja yhdistävän haaran pituus kertoo, kuinka läheistä sukua kannat ovat keskenään; mitä kauempana haara yhtyy, sitä kaukaisempaa sukua kyseiset kannat ovat toisilleen. Haaran pituus on kuitenkin suhteellinen ja se on normalisoitu maksimiarvoon 1000, jonka takia eri dendrogrammit eivät ole keskenään vertailukelpoisia.

*Mannheimia*, *Nicoletella* sekä *Actinobacillus*-suvuissa saman lajin eri kannat klusteroituvat odotetusti lähekkäin. *Actinobacillus*-suvun bakteereista poikkeuksen tekee *A. seminis* -kanta, joka klusteroituu selvästi erilleen muista suvun bakteereista ja lähemmäs *Pasteurella*-sukua. Myös *H. felis* -kanta klusteroituu lähekkäin *Pasteurella*-suvun kantojen kanssa. *Histophilus*- sekä *Pasteurella*-suvun kannat näyttävät olevan hyvin samanlaisia keskenään muodostaen niin ikään lähekkäisiä klustereita.

*A. paragallinarum* -bakteerikannan huomataan olevan ainoa, joka ei muodosta haaraa muiden bakteerilajien tai -kantojen kanssa, ei edes *Avibacterium sp.* -kannan kanssa. Tästä voidaan päätellä että kyseinen bakteerikanta eroaa huomattavasti muista mukana olleista *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikannoista.

*B. trehalosi* sekä *A. porcinus* -kannat eivät käyttäytyneet dendrogrammissa odotetusti, sillä ne muodostivat suhteellisen lähekkäisen klusterin keskenään, vaikka *B. trehalosi* -bakteerin pitäisi muodostaa itsenäinen, muista *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikannoista eriävä, klusteri. *A. porcinus* -kannan MSP:n toimivuutta tulisi tarkastella laajemmin ja mikäli MSP ei näytä toimivan, tulisi se poistaa kirjastosta kokonaan, jotta tulevaisuudessa vältetään virheellisiltä identifikaatioilta.

Toiseen dendrogrammiin valittiin kirjastoon itse lisättyjen MSP:n lisäksi suurin osa valmistajan kirjastosta jo löytyvistä *Pasteurellaceae*-heimon bakteerikannoista. Dendrogrammiin otettiin mukaan jokaisesta bakteerilajista ainoastaan yksi bakteerikanta jokaisesta lajista, jotta se olisi helpommin luettavissa. Luotu dendrogrammin on esitetty kuvassa 13. Itse lisätyt bakteerikannat tunnistaa bakteerilajin nimen perässä olevasta Evira -sanasta.



Kuva 13. Valmistajan kirjaston sekä itse lisättyjen MSP:n pohjalta luotu MSP-dendrogrammi.

Toisessa dendrogrammissa eri bakteerilajien klusteroituminen ei ole enää niin selvää. Kuitenkin useimpien bakteerisukujen kohdalla kunkin eri lajin kannat klusteroituvat edelleen suhteellisen lähekkäin. Näitä ovat mm. *Mannheimia*, *Histophilus* sekä *Avibacterium*-sukujen kannat. Toisaalta taas esim. *P. multocida* -bakteerit klusteroituvat tiu-



kasti yhteen, mutta suurin osa muista *Pasteurella*-suvun lajien kannoista on levittäytynyt ympäri dendrogrammia hyvinkin laajalle.

Laajemmasta dendrogrammista voidaan ehkä päätellä, miksi useiden *Pasteurellaceae*-heimon lajien diagnostiikka saattaa olla hankalaa niin perinteisillä menetelmillä kuin mahdollisesti myös MALDI-TOF MS -menetelmällä. Monien heimon eri bakteerilajien väliset erot voivat olla hyvin pieniä, jolloin lajien erottaminen toisistaan vaatii erittäin tarkkaa ja herkkää tunnistus- ja erotusmenetelmää tai esimerkiksi MALDI-TOF MS -analyysin tuloksen varmistamista valituilla biokemiallisilla varmistustesteillä.

## 8.5 Perinteiset identifikaatiomenetelmät

*Mannheimia* sekä *Pasteurella*-bakteerisuvuista valittiin muutamia kantoja, joita tutkittiin MALDI-TOF MS -analyysin lisäksi myös Evirassa käytettävillä perinteisillä menetelmillä, ja molemmilla menetelmillä saatuja tuloksia verrattiin keskenään.

### 8.5.1 *Mannheimia*-suku

*Mannheimia*-suvun bakteerikantoja tutkittiin yhteensä 11 kappaletta. Mukaan valittiin sellaisia kantoja, jotka eivät tunnistuneet luotettavasti MALDI-TOF MS -analyysillä tai joiden MALDI-TOF MS -analyysin tulokset poikkesivat alkuperäisestä, perinteisin menetelmin saadusta, tunnistustuloksesta. Kaikki kannat tutkittiin *Mannheimia*-testisarjan avulla, joka koostui 14:sta biokemiallisesta testistä. Testit tulkittiin taulukon 22 mukaisesti.

**Taulukko 22. *Mannheimia*-testisarjan tulosten tulkinta.**

Testi	Nro	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glukosida</i> <sup>a</sup>	<i>M. varigena</i> <sup>b</sup>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. ruminalis</i> <sup>c</sup>
Hemolyysi		+	+	+	— <sup>d</sup>	—
Urea		—	—	—	—	—
Indoli		—	—	d	—	—
NPG	1	—	+	d	+	—
ONPF	2	+	+ <sup>e</sup>	d	—	—
ONPG	3	d	+	d	d	+
ARA	4	—	d	+	—	— <sup>e</sup>
XYL	5	+	+	+	d	d
MAN	6	+	+	+	+	+
SOR	7	+	+	—	+	d
MAL	8	+	+	+	+	d
TRE	9	—	—	—	—	—
ESC	10	—	+	— <sup>e</sup>	d	—
ODC	11	—	d	d	—	— <sup>e</sup>

Biokemialliset testit suoritettiin käytössä olevien työohjeiden mukaisesti. Testeistä saadut tulokset on esitetty taulukossa 23.

**Taulukko 23. *Mannheimia*-testisarjan biokemiallisten testien tulokset.**

Testi	DSM 21141	KBAK-8240	KBAK-10600	KBAK-122	KBAK-763	KBAK-124	KBAK-732	KBAK-4628	KBAK-2535	HBAK-19149	ba-664
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Indoli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskuliini	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ONPG	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinoosi	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Xyloosi	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannitoli	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitoli	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Maltoosi	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloosi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ONPF -testi jätettiin kokonaan tekemättä ja hemolyysi arvioitiin silmämääräisesti. Käytetyistä naudanveriagareista oli osittain hankalaa arvioida hemolyysiä, koska reaktio ei aina näkynyt odotetulla tavalla. Saatuja tuloksia verrattiin taulukkoon 22, jonka pohjalta kanta identifioitiin joksikin viidestä *Mannheimia*-lajista. Näitä tuloksia verrattiin MALDI-TOF MS -analyysistä saatuihin tuloksiin. Lopulliset tunnistustulokset on esitetty taulukossa 24. Ensimmäinen bakteerikanta (*M. ruminalis*, DSM 21141) oli tyyppikanta, jota käytettiin testissä kontrollina, ja kaksi viimeistä kantaa (HBAK-19149, ba-664) olivat alunperin *B. trehalosi* -bakteeriksi ilmoitettuja kantoja, jotka MALDI-TOF MS -analyysi kuitenkin identifioi *Mannheimia*-suvun lajeiksi ja jotka päätettiin testata myös *Mannheimia* -testisarjan avulla.

**Taulukko 24. *Mannheimia*-testisarjan sekä MALDI-TOF MS -analyysin tunnistustulokset.**

Bakteerikanta	MALDI-TOF MS -analyysi	<i>Mannheimia</i> -testisarja
DSM 21141	<i>M. ruminalis</i> (2.249)	<i>M. ruminalis</i>
KBAK-8240	<i>M. haemolytica</i> (1.932)	<i>M. varigena</i>
KBAK-10600	<i>M. haemolytica</i> (2.305)	<i>M. haemolytica</i>
KBAK-122	<i>M. haemolytica</i> (1.525)	-
KBAK-763	<i>M. haemolytica</i> (2.389)	<i>M. haemolytica</i>
KBAK-124	<i>M. varigena</i> (1.719)	<i>M. varigena</i>
KBAK-732	<i>M. haemolytica</i> (2.289)	<i>M. haemolytica</i>
KBAK-4628	<i>M. haemolytica</i> (2.478)	<i>M. haemolytica</i>
KBAK-2535	<i>A. pleuropneumoniae</i> (2.307)	-
HBAK-19149	<i>M. haemolytica</i> (1.894)	<i>M. varigena</i>
ba-664	<i>M. haemolytica</i> (2.352)	<i>M. haemolytica</i>

Taulukon keskimmäisessä sarakkeessa on näkyvissä MALDI-TOF MS -laitteen antama tunnistustulos sekä suluissa bakteerikannan saamat vastaavuuspisteet. Kahdelle kannalle ei saatu tunnistustulosta *Mannheimia*-testisarjalla, ja toinen näistä kannoista tunnistui jo MALDI-TOF MS -analyysillä *A. pleuropneumoniae* -bakteeriksi. On mahdollista, että testisarjalla *Mannheimia*-suvun lajeiksi tunnistumattomat bakteerikannat ovat sellaisia *Mannheimia*-suvun lajeja, jotka puuttuvat MALDI-TOF MS -laitteen kirjastosta vielä kokonaan ja siksi eivät tunnistu menetelmällä. Kirjastosta puuttuu kokonaan esim. *M. caviae* -bakteeri. Kontrollina käytetty *M. ruminalis* -bakteerikanta (DSM 21141) tunnistui testisarjalla hyvin.

Tuloksista huomataan, että sellaiset kannat, jotka ovat saaneet korkeat vastaavuuspisteet MALDI TOF MS -analyysillä, ovat tunnistuneet samoiksi lajeiksi myös testisarjan avulla, kun taas useat heikommat vastaavuuspisteet MALDI-TOF MS -analyysillä saaneet kannat tunnistuivat testisarjalla selvästi huonommin.

Vertailun tuloksena voidaan todeta, että *Mannheimia*-suvun identifikaatio on vielä epävarmaa sekä *Mannheimia* -testisarjan että MALDI-TOF MS -menetelmän avulla. Kattavampien tuloksien saaminen vaatisi menetelmien vertailua suuremmalla määrällä varmennettuja bakteerikantoja. Kuitenkin MALDI-TOF MS -menetelmä vaikuttaisi soveltuvan paremmin suvun lajien identifikaatioon, sillä se on yksinkertaisempi toteuttaa, halvempi ja identifikaatiotuloksen saaminen vie selvästi vähemmän aikaa. Testisarjaa ei pidetä kovin luotettavana *Mannheimia*-suvun lajien tunnistuksessa, sillä eri lajien väliset erot ovat usein pieniä eivätkä testitulokset näin ollen anna välttämättä luotettavia tuloksia.

### 8.5.2 *Pasteurella*-suku

*Pasteurella*-suvun bakteerikantoja tutkittiin yhteensä 5 kappaletta. Kaksi kantaa (*P. multocida* (OBAK-650/2) & *P. pneumotropica* (HBAK-1578/1)) identifioitiin API 20 NE -testillä ja testien tuloksia verrattiin saatuihin MALDI-TOF MS -analyysin tuloksiin. Testien tulokset on esitetty taulukossa 25.

**Taulukko 25. MALDI-TOF MS -analyysin sekä API 20NE -testin tulokset.**

Bakteerikanta	MALDI-TOF MS -analyysi	API ID
OBAK-650/2	<i>P. multocida</i> (2.521)	<i>P. multocida</i> 96.0 % ID
HBAK-1578/1	<i>P. pneumotropica</i> (2.282)	<i>P. pneumotropica</i> 99.9 % ID

Molemmat kannat tunnistuivat sekä MALDI-TOF MS -analyysillä että API 20NE -testillä. API -testeissä saatu prosenttiluku kertoo testin luotettavuudesta. Kahden kannan analyysin perusteella testin todellisesta kyvystä erottaa *Pasteurella*-suvun lajeja toisistaan ei voida antaa luotettavia tuloksia. Näyttää kuitenkin siltä, että sekä MALDI-TOF MS -menetelmä että API 20NE -testit soveltuisivat *P. multocida* sekä *P. pneumotropica* -bakteerilajien identifiointiin. MALDI-TOF MS -menetelmän avulla identifiointi on kuitenkin huomattavasti nopeampaa, yksinkertaisempaa sekä halvempaa.

Loput kolme (*P. canis* (2 kpl) & *P. dagmatis*) kantaa testattiin kymmenen biokemiallisen testin sarjalla, sillä API 20NE -testi ei kata kyseisiä bakteerilajeja, joten niitä ei pystytty luotettavasti testillä tunnistamaan. Testit tulkittiin taulukon 26 avulla.

**Taulukko 26. *Pasteurella*-testisarjan tulosten tulkinta.**

Species	NAD requirement	ODC	Ind	Ure	Tre	Mal	D-Xyl	L-Ara	Man	Sor	Dul	Species affected
<i>P. multocida</i>												mammals, birds and man
<i>ssp. multocida</i>	-	+	+	-	v	-	v	-	+	+	-	
<i>ssp. septica</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
<i>ssp. gallicida</i>	-	+	+	-	-	-	+	v	+	+	+	
<i>P. dagmatis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	dog, cat, transmitted through bites to man
<i>P. gallinarum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	poultry
<i>P. canis</i>	-	+	v	-	v	-	v	-	-	-	-	biotype 1 (Indole +): dog, cat and man biotype 2 (Indole -): calf
<i>P. stomatidis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	respiratory tract of dog and cat
<i>P. anatis</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	duck
<i>P. langaa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	fowl
<i>P. avium</i>	v	-	-	-	+	-	v	-	-	-	-	poultry, previous name <i>Haemophilus avium</i>
<i>P. volantium</i>	+	v	-	-	+	+	v	-	+	v	-	poultry, previous name <i>Haemophilus avium</i>

Biokemialliset testit suoritettiin käytössä olevien työohjeiden mukaisesti. Testeistä saadut tulokset on esitetty taulukossa 27.

**Taulukko 27. *Pasteurella*-testisarjan biokemiallisten testien tulokset.**

Testi	HBAK-1664/1	HBAK-1664/3	OBAK-3554/1
ODC	-	-	+
Indoli	+	+	+
Urea	-	+	-
Trehaloosi	+	+	+
Maltoosi	+	+	-
Xyloosi	-	-	+
Arabinoosi	-	-	-
Mannitoli	-	-	-
Sorbitoli	-	-	-
Dulsitoli	-	-	-

Saatujen tuloksien perusteella bakteerikannat identifioitiin ja tuloksia verrattiin MALDI-TOF MS -analyysistä saatuihin tunnistustuloksiin. Lopulliset tunnistustulokset on esitetty taulukossa 28.

**Taulukko 28. MALDI-TOF MS -analyysin sekä *Pasteurella*-testisarjan tulokset.**

Bakteerikanta	MALDI-TOF MS -analyysi	<i>Pasteurella</i> -testisarja
HBAK-1664/1	<i>P. canis</i> (2.344)	<i>P. canis</i>
OBAK-3554/1	<i>P. canis</i> (1.978)	<i>P. canis</i>
HBAK-1664/3	<i>P. dagmatis</i> (2.329)	<i>P. dagmatis</i>

MALDI-TOF MS -analyysin tulokset olivat yhtäläisiä *Pasteurella*-testisarjan tunnistustulosten kanssa. Analysoitujen kantojen vähyden vuoksi luotettavia testituloksia ei pystytä esittämään. Saatujen tulosten osalta näyttää kuitenkin siltä, että sekä MALDI-TOF MS -menetelmä että *Pasteurella*-testisarja kykenevät luotettavasti tunnistamaan *P. canis*- sekä *P. dagmatis*-bakteerit. Kahta identifikaatiomenetelmää verrattaessa MALDI-TOF MS -menetelmä on kuitenkin huomattavasti nopeampi toteuttaa, halvempi sekä yksinkertaisempi, joten sen soveltuvuus *Pasteurella*-suvun bakteereiden identifikaatioon on parempi kuin *Pasteurella* -testisarjan.

## 9 Yhteenveto

Insinööriyön tarkoituksena oli kartoittaa MALDI-TOF MS -menetelmän soveltuvuutta *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifioinnissa tutkimalla heimon eri sukujen tunnistuvuutta sekä laajentamalla laitteen olemassa olevaa bakteerikirjastoa. Tämän lisäksi menetelmää verrattiin käytössä oleviin perinteisiin biokemiallisiin identifikaatiomenetelmiin valituilla bakteerisuvuilla.

MALDI Biotyper -laitteen kirjaston laajennus onnistui hyvin. Alkuperäinen kirjasto oli tiettyjen eläinlääketieteellisten *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien osalta puutteellinen ja sieltä puuttui useita heimon bakteerilajeja. Monien lajien osalta kirjasto koostui ainoastaan yhdestä tai muutamasta kyseisen lajin kannasta. Kirjastoa laajennettiin työn aikana 25:llä bakteerikannalla, joihin sisältyi kahdeksan sellaista bakteerilajia, joita ei alkuperäisessä kirjastossa ollut lainkaan edustettuina.

Osa tutkituista *Pasteurellaceae*-heimon bakteerilajeista tunnistui luotettavasti jo alkuperäisellä bakteerikirjastolla. Tällaisia lajeja olivat mm. *Bibersteinia*-suvun *B. trehalosi*, *Pasteurella*-suvun *P. multocida* sekä *Haemophilus*-suvun *H. parasuis*. Bakteerikirjaston laajennuksen huomattiin lisäksi parantavan useamman lajin identifikaatiota. Näihin lajeihin kuuluivat mm. *A. equuli*, *H. somni* sekä *P. multocida*.

Bakteerikirjaston laajentamisen avulla MALDI Biotyper -laitteen tunnistuskapasiteettia saatiin työn aikana parannettua lisäämällä kirjastoon sieltä puuttuvien bakteerilajien kantoja. Lajeja, joiden identifikaatio tuli mahdolliseksi kirjaston laajennuksen myötä olivat *A. seminis*, *A. paragallinarum*, *H. felis*, *M. ruminalis*, *N. semolina* sekä *P. Bisgaard taxon 26*. Lajien tunnistumista tulisi kuitenkin testata useammilla varmennetuilla bakteerikannoilla, jolloin lajien tunnistumisesta saataisiin täysi varmuus.

Bakteerilajeja, joiden identifikaation onnistumisesta MALDI Biotyper -laitteella ei työn aikana saatu täyttä varmuutta olivat mm. *A. porcinus*, *A. lignieresii*, *M. varigena* sekä *M. granulomatis*. Näiden lisäksi monet muut bakteerilajit, joita analysoitiin työn aikana vain muutama, vaativat lisätestausta useammilla bakteerikannoilla kuin mitä työtä varten oli saatavilla, jotta lajien tunnistumisesta saataisiin täysi varmuus.

Lajeja, jotka ovat laitteella hankalammin identifioituvia, tulisi testata sellaisilla bakteerikannoilla, jotka on varmistettu vähintään PCR:n tai mieluummin sekvensoinnin avulla,

jotta identifikaation onnistumisesta voidaan laitteella voidaan olla varmoja. Lähisukuis-  
ten lajien, jotka tunnistuvat laitteella helposti ristiin (esim. *A. lignieresii* & *A. pleurop-  
neumoniae*, *M. haemolytica* & *M. varigena*), tunnistumisen voidaan usein lisäksi var-  
mistaa kasvuominaisuuksien (pesäkkeen ulkonäkö, hemolyysi), kasvuvaatimusten  
(esim. NAD-riippuvuus), eläinlajin alkuperän tai muutaman biokemiallisen lisätestin  
avulla.

MALDI-TOF MS -menetelmän sekä perinteisten biokemiallisten menetelmien vertaami-  
nen *Mannheimia* sekä *Pasteurella*-bakteerisuvuilla osoitti, että MALDI-TOF MS -  
menetelmä on usein yksinkertaisempi, kustannustehokkaampi sekä huomattavasti tar-  
kempi ja nopeampi menetelmä kyseisten bakteerisukujen lajien identifioimiseen. Kat-  
tavampien tulosten saamiseksi tulisi bakteerisukujen tunnistumista testata molemmilla  
menetelmillä suuremmalla määrällä varmistettuja bakteerikantoja.

Tulevaisuudessa *Pasteurellaceae*-heimon bakteerien identifikaatiota MALDI-TOF MS -  
menetelmällä on yhä mahdollista parantaa laajentamalla laitteen bakteerikirjastoa sieltä  
vielä puuttuvilla bakteerilajeilla sekä uusien bakteerikantojen lisäämisellä sellaisista  
bakteerilajeista, jotka ovat jo edustettuina laitteen kirjastossa. Kirjastoa tulisi erityisesti  
päivittää itse eristetyillä paikallisilla kannoilla, jolloin laitteen identifikaatioteho saadaan  
kohdennettua juuri Suomessa tavattaviin eläintautipatogeeneihin.

## Lähteet

- 1 Dousse, F., Thomann, A., Brodard, I. 2008. Routine phenotypic identification of bacterial species of the family *Pasteurellaceae* isolated from animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol.20, s. 716-724.
- 2 Blackall, P.J., Bojese, Anders M., Christensen, H., Bisgaard, M. 2007. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb.nov. *International journal of Systematic and evolutionary microbiology*, s. 666-674.
- 3 Naushad, S., Adeolu, M., Goel, N., Khadka, B., Al-Dahwi, A., Gupta, R. 2015. Phylogenomic and molecular demarcation of the core members of the Polyphyletic *Pasteurellaceae* genera *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*. *International Journal of Genomics*. Vol. 2015, Article ID 198560.
- 4 Frey, J., Kuhnert, P. 2015. Identification of Animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOD Mass Spectrometry. *Veterinary infection biology: molecular diagnostics and high-throughput strategies methods in molecular biology*. Vol 1247, s. 235–243.
- 5 Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. 2013. *Clinical veterinary microbiology*. Second Edition. Mosby Elsevier.
- 6 Evira, 2011. Eläinten terveys ja eläintaudit: hengitystietulehdukset. Verkkodokumentti.  
<<http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten+terveys+ja+elaintaudit/elaintaudit/sia t/hengitystietulehdukset/>> Luettu 22.3.2015.
- 7 Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil G., Martel, J.L., Chaslusdancla, E. 2001. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Veterinary research, BioMed Central*, s. 323–339.
- 8 Wilson, B., Ho, M. 2013. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clinical microbiology reviews*. Vol. 26, s. 631–655.
- 9 Tefera, G., Smola, J. 2001. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. *Veterinarni Medicina*, s 119–124.
- 10 Evira, 2011. Eläinten terveys ja eläintaudit: hengitystietulehdukset. Verkkodokumentti.  
<<http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten+terveys+ja+elaintaudit/elaintaudit/lampaat+ja+vuohet/hengitystietulehdukset/>> Luettu 28.3.2015.
- 11 Quinn, P.S., Marley, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.S. 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*. Second Edition. Wiley-Blackwell.



- 12 Nedbalcova, K., Satran, P., Jaglic, Z., Ondriasova, R., Kucerova, Z. 2006. Haemophilus parasuis and Glässer's disease in pigs: a review. Veterinarni Medicina, s. 168–179.
- 13 Pohjanvirta, Tarja. Evira. 2009. PowerPoint -esitys. Luettu 13.3.2015
- 14 Hanthorn, C. 2014. Pathogenicity of *Bibersteinia trehalosi* in bovine calves. Graduate thesis and dissertations. Paper 13974.
- 15 Evira. Eläintaudit Suomessa 2012. Eviran julkaisuja 9/2013. Luettu 28.3.2015.
- 16 Hanthorn, C., Dewell, R., Cooper, V., Frana, T., Plummer, P., Wang, J., Dewell, G. 2014. Randomized clinical trial to evaluate the pathogenicity of *Bibersteinia trehalosi* in respiratory disease among calves. BMC Veterinary Research.
- 17 Akter, S., Ali, M., Das, M., Hossain, M. 2013. Isolation and identification of *Avibacterium paragallinarum*, the causal agent of infectious coryza (IC) from layer chickens in Bangladesh. J. Bangladesh Agril. Univ. 11(1), s. 87–96.
- 18 Król, J., Bania, J., Florek, M., Pliszczak-Król, A., Staroniewicz, Z. 2011. Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant *Pasteurellaceae* isolated from cats and dogs in Poland. Journal of veterinary diagnostic investigation, s. 532–537.
- 19 Patel, R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clinical infectious diseases, s. 564–572.
- 20 Carlson, P., Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 21 Mikrobiologian perusteita. 2002. Mikrobiologian julkaisuja. Opetushallitus.
- 22 Hansen, M., Bertelsen, M., Dietz, R., Sonne, C., Bojesen, A. 2013. A simple and novel method for retrieval of *Pasteurellaceae* from swab samples collected in the field. MicroBiologyOpen, s. 795–797.
- 23 Evira. 2008. Bakteerien lukumäärän määrittäminen naudanveriagarilla. Pesäkelaskentatekniikka. Menetelmäohje. s. 1.
- 24 Korhonen K., Tursas, H. 2013. Maldi sepsityper kitillä saatujen positiivisten veriviljelytulosten luotettavuuden arviointi. Opinnäytetyö. Turun Ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma.
- 25 Helenius, M., Kilpeläinen, K., Taponen, E. 2012. Mikrobiologiaa bioanalytikoille – Kliinisen mikrobiologian työohjeiden päivittäminen. Opinnäytetyö. Savonia Ammattikorkeakoulu.

- 26 Leppänen, A., Seppälä, J. 2013. *Actinobaculum schaalii* -bakteerin tunnistaminen. Opinnäytetyö. Karelia-ammattikorkeakoulu, bioanalytiikan koulutusohjelma.
- 27 Murray, P. 2011. What is new in clinical microbiology – Microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. The journal of molecular diagnostics, Vol. 14, No. 5, s. 419–423.
- 28 Clark, A., Kaleta, E., Arora, A., Wolk, D. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift on the routine practice of clinical microbiology. Clinical microbiology reviews, Vol. 26, No. 3, s. 547–603.
- 29 Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. 2011. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS microbiology reviews 36, s. 380-407.
- 30 Lavigne, J.P., Espinal P., Dunyach-Remy, C., Messad, N., Pantel, A., Sotto, A. 2013. Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? Clinical chemistry and laboratory medicine, s. 257-270.
- 31 Evira. 2014. Pelkola, Kirsti. Bruker Biotyper MALDI-TOF MS bakteerianalytiikassa. PowerPoint-esitys.
- 32 Bruker Daltonik. 2012. MALDI Biotyper 3.1. User Manual.
- 33 Evira. 2014. Bakteerikantojen tunnistus MALDI Biotyper -laitteistolla. Elintarvike- ja rehumikrobiologia ja eläintautibakteriologia. Työohje, s. 1-7.
- 34 Marvin, L., Roberts, M., Fay, L. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Elsevier, s. 11-21.
- 35 Bruker Daltonik GmbH. 2012. Instructions for use Bruker Matrix HCCA. Verkko-dokumentti. < <http://www.criver.com/files/pdfs/emd/accugenix/bruker-matrix-hcca-portioned-instructions.aspx>> Luettu 14.4.2015.
- 36 Anderson, N., Buchan, B., Riebe, K., Parsons, L., Gnacinski, S., Ledebauer, N. 2012. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. Vol. 50, no. 3, s. 1008-1013.
- 37 Matsuda, N., Matsuda, M., Notake, S., Yokokawa, H., Kawamura, Y., Hiramatsu, K., Kikuchi, K. 2012. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant *Staphylococci* by Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. Vol. 50, number 12, s. 3862–3866.

- 38 Williams, T., Andrzejewski, D., Lay, J., Musser, S. 2003. Experimental factors effecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. American Society for Mass spectrometry s. 342–351.
- 39 Lay Jr, J.O. 2000. MALDI-TOF Mass spectrometry and bacterial taxonomy. Trends in analytical chemistry, vol. 19, no. 8, s. 507–516.
- 40 Wieme, A., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., Vandamme, P. 2014. The effects of the growth medium on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight massa spectra: a case study of acetic acid bacteria. Applied and environmental microbiology, vol 80, no. 4, s. 1528–1538.
- 41 Pelkola, Kirsti. 2015. Erikoistutkija, Eläintautibakteriologia, Evira, Helsinki. Keskustelu. 11.5.2015.
- 42 Pelkola, Kirsti. 2015. MALDI-Biotyper -laitteen huolto ja säädöt. Työohje, Evira. Luettu 2.5.2015
- 43 Rettinger, A., Krupka, I., Grunwald, K., Dyachenko, V., Fingerle, V., Konrad, R., Raschel, H., Busch, U., Sing, A., Straubinger, R., Huber, I. 2012. *Leptospira* ssp. Strain identification by MALDI-TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). BMC Microbiology, 12:185, s. 1–14.
- 44 Pelkola, Kirsti. 2015. MSPn luominen Maldi Biotyper -laitteen kirjastoon. Työohje, Evira, s.1–6. Luettu 10.3.2015.
- 45 Ressom, H., Varghese, R., Goldman, R. 2009. Computational methods for analysis of MALDI-TOF spectra to discover peptide serum biomarkers.
- 46 Kuhnert, P., Bisgaard, M., Korczak, B., Schwendener, S., Christensen H., Frey, J. 2012. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods, s. 1–7.
- 47 Pelkola, Kirsti. 2015. Erikoistutkija, eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö. Evira, Helsinki. Keskustelu. 22.4.2015.
- 48 Bisgaard, M., Christensen, H. 2012. Classification of vian haemolytic *Actinobacillus*-like organisms (Bisgaard taxon 26) associated with anseriforme birds as *Actinobacillus anseriformium* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

## Mannheimia-testisarjan työohje



Eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö

Vastuhenkilö	Henry Kuronen	Sivu/sivut	1 / 2
Laatija	Jaana Pentikäinen	Työohje	LAB 2324/2
Hyväksyjä	Sinikka Pelkonen	Käyttöönotto	15.9.2008

### Mannheimia-testisarja

## Mannheimia-testisarja

### Käyttö

Käytetään *Mannheimia*-bakteerin tunnistamiseen. Bakteeri on yleensä hemolyyttinen, gramnegatiivinen sauva, liikkumaton, katalaasipositiivinen ja useimmiten oksidaasipositiivinen.

### Tarvikkeet

Ureaasi-putki

Indoli-putki

Roscon Diatabs Diagnostic Tablets-kiekkoja ja niille koeputket:

- 1 NPG ( $\beta$ -glucosidase)
- 2 ONPF ( $\alpha$ -fucosidase)
- 3 ONPG ( $\beta$ -galactosidase)
- 4 L-arabinose (ARA)
- 5 D-xylose (XYL)
- 6 Mannitol (MAN)
- 7 D-sorbitol (SOR)
- 8 Maltose (MAL)
- 9 Trehalose (TRE)
- 10 Esculin hydrolysis (ESC)
- 11 Ornithine decarboxylase (ODC)

ARA- ja XYL-kiekkoja säilytetään 2-8 °C lämpötilassa.

### Suoritus

Ureaasikoe ja indolikoe tehdään erillisten työohjeiden mukaisesti.

Roscon diagnostisia kiekkoja varten tehdään tutkittavasta bakteerista vahva, vähintään McFarland 4 vahvuinen suspensio fysiologiseen suolaliuokseen (n.3-4 ml). Putkiin laitetaan 0.25 ml suspensiota. Tutkittava testiekikko tiputetaan putkeen ja putki suljetaan. ODC-putkeen laitetaan kuitenkin 3 tippaa parafiiniöljyä ennen putken sulkemista. Loppususpensiosta viljellään häntämalja. Putkia inkuboidaan +35-37°C -asteessa yön yli.

### Tulkinta

NPG - ONPF- ja ONPG-putket:

- positiivinen: keltainen
- negatiivinen: väritön

Sokeriputket:

- positiivinen: keltainen / keltaisen oranssi
- negatiivinen: punainen / oranssin punainen

ESC-putki:

- positiivinen: musta / harmaa
- negatiivinen: väritön / heikosti harmaa

Ei päivitettävä kopio



Eläintautibakteriologian tutkimusyksikkö

Vastuuhenkilö	Henry Kuronen	Sivu/sivut	2 / 2
Laatija	Jaana Pentikäinen	Työohje	LAB 2324/2
Hyväksyjä	Sinikka Pelkonen	Käyttöönotto	15.9.2008

**Mannheimia-testisarja****ODC-putki:****4 h**

- positiivinen: sininen / violetti
- negatiivinen: keltainen / vihreä

**18-24h**

- positiivinen: voimakkaan violetti
- negatiivinen: keltainen / vihreä / harmaa / vaalean sininen

Ureaasikoe ja indolikoe tulkitaan erillisten työohjeiden mukaan.

*Mannheimia*-bakteeri tunnistetaan oheisen taulukon mukaan.

Testi	Nro	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glukosida</i> <sup>a</sup>	<i>M. varigena</i> <sup>b</sup>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. ruminalis</i> <sup>c</sup>
Hemolyysi		+	+	+	- <sup>d</sup>	-
Urea		-	-	-	-	-
Indoli		-	-	d	-	-
NPG	1	-	+	d	+	-
ONPF	2	+	+ <sup>e</sup>	d	-	-
ONPG	3	d	+	d	d	+
ARA	4	-	d	+	-	- <sup>e</sup>
XYL	5	+	+	+	d	d
MAN	6	+	+	+	+	+
SOR	7	+	+	-	+	d
MAL	8	+	+	+	+	d
TRE	9	-	-	-	-	-
ESC	10	-	+	- <sup>e</sup>	d	-
ODC	11	-	d	d	-	- <sup>e</sup>

<sup>a</sup> *M. glukosida* can be separated into biovars A-I based on differences in ornithine decarboxylase, ONPF, ONPX and fermentations of L-arabinose and gentiobiose.

<sup>b</sup> *M. varigena* can be separated into biovar 1 and 2 based on differences in ornithine decarboxylase.

<sup>c</sup> *M. ruminalis* can be separated into biovar 1 and 2 based on differences in fermentation of maltose.

<sup>d</sup> *M. granulomatis* is haemolytic on sheep blood agar.

<sup>e</sup> Deviating strains exist.

**Lähteet**

Veterinary Microbiology 84 (2002), 103-114, Oystein Angen, Peter Ahrens, Magne Bisgaard: "Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* -like strains isolated from diseased animals in Denmark

User's guide: Diatabs Diagnostic Tablets for bacterial identification, ROSCO

**Päivityshistoria**

Tämä ohje korvaa työohjeen EELA KUO ba 44 versio 2, johon on tehty teknisiä muutoksia. 15.9.2008: Ohje on päivitetty uuden organisaation mukaiseksi. Tämä ohje korvaa ohjeen KUTU 136/1.

Ei päivitettävä kopio

## API 20NE -testin työohje



Vastuhenkilö	Mirja Raunio-Saarnisto	Sivu/sivut	3 / 9
		Työohje	LAB 3959/2
Hyväksyjä	Tuula Honkanen-Buzalski	Käyttöönotto	14.9.2012

Eläintautibakteriologia

API-työohje

## 3 API 20 NE

Tee suspensio 0.5 McF 2ml:aan steriiliä fys. NaCl (1-4 pesäkettä). Tätä suspensiota pipetoidaan taskuihin NO<sub>3</sub> -> PNPG.

Pipetoi edellistä suspensiota 200 µl API AUX -mediumiin hyvin sekoittaen, vältä ilmakuplien muodostumista. Täytä GLU -> PAC -taskut ja suuaukko tasaiseksi. Merkitse oksidaasin tulos liuskaan.

Inkuboidaan +29°C ± 2°C 24 ± 2 h. Usein inkubointia pitää jatkaa toiset 24 h.

Tarkista inkuboinnin jälkeen ensin taskut välillä GLU -> PNPG.

Lisää reagenssit NO<sub>3</sub>- ja TRP-testeihin (vapautuu kaasuja, jotka haittaavat muita reaktioita, varsinkin loppupään ns. assimilaatiotestejä GLU -> PAC; tee vetokaapissa!)

Jos laitat APIn inkuboitumaan vielä 24 h:ksi, ime pipetillä pois NIT 1- ja NIT 2 – sekä JAMES-reagenssit. Peitä ko taskut mineraaliöljyllä.

EI PÄIVITETTÄVÄ KOPIO

TESTI	TULOS	
	NEGATIIVINEN	POSITIIVINEN
NO <sub>3</sub>	NIT 1 + NIT 2 (2-5 min.)	
	väritön	vaal.pun./pun.
	ZN (5 min.)	
	vaal.pun.	väritön
TRP	JAMES (tulkinta heti)	
	väritön, haalean vihreä/keltainen	vaal.pun.
GLU	sinisestä vihreään	keltainen
ADH	keltainen	oranssi/vaal.pun./pun.
URE	keltainen	oranssi/vaal.pun./pun.
ESC	keltainen	harmaa/ruskea/musta
GEL	ei pigmentin diffuusiota	mustan pigmentin diffuusio
PNPG	väritön	keltainen
GLU	läpikuultava	opalisoiava
ARA	läpikuultava	opalisoiava
MNE	läpikuultava	opalisoiava
MAN	läpikuultava	opalisoiava
NAG	läpikuultava	opalisoiava
MAL	läpikuultava	opalisoiava
GNT	läpikuultava	opalisoiava
CAP	läpikuultava	opalisoiava
ADI	läpikuultava	opalisoiava
MLT	läpikuultava	opalisoiava
CIT	läpikuultava	opalisoiava
PAC	läpikuultava	opalisoiava

Eviran ulkopuolisen laboratorion on itse varmistettava ohjeen toimivuus omassa toiminnassaan sekä varmistettava ohjeen ajantasaisuudesta osoitteessa [www.evira.fi](http://www.evira.fi)