



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Jonna Koivisto ja Jenni Vigren

Mykobakteereiden tunnistaminen MALDI-TOF MS -menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

15.11.2019

Tekijä(t) Otsikko	Jonna Koivisto ja Jenni Vigren Mykobakteereiden tunnistaminen MALDI-TOF MS -menetelmällä
Sivumäärä Aika	27 sivua + 1 liitettä 15.11.2019
Tutkinto	Bioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Merja Ojala Sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavainen
<p>Mykobakteerilajeja tunnetaan noin 200, ja uusia löytyy jatkuvasti. Mykobakteereihin kuuluvat tuberkuloosia aiheuttava <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Mycobacterium bovis</i>, ja <i>Mycobacterium africanum</i>), sekä <i>Mycobacterium leprae</i> ja ympäristömykobakteerit. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ja sen lähisukulaiset aiheuttavat tuberkuloosia. Suomessa potilasnäytteistä löydetään mykobakteereita vuosittain noin 900. Mykobakteerit ovat sauvabakteereja, ja muodoltaan nimensä mukaisesti sauvamaisia tai lievästi kaareutuvia. Niitä kutsutaan myös basilleiksi. Gramvärjäyksessä värjäytyvyys voi vaihdella, mutta useimmiten mykobakteeri värjäytyy grampositiivisesti. Mykobakteerilla on monikerroksinen ja paksu soluseinä. Mykobakteereita yhdistää se, että niiden seinämässä on suuri rasvapitoisuus. Tämä seinämä tekee mykobakteereista haponkestäviä. Mykobakteerit kasvavat aerobisissa olosuhteissa, eli hapen läsnäollessa.</p> <p>MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight on analyysimenetelmä, joka perustuu massaspektrofotometriaan. Sen avulla pystytään tunnistamaan polymeerejä, peptidejä sekä proteiineja. Kyseessä on matriisi avustettu analyysijärjestelmä, joka perustuu ionisoituneiden analyyttien erilliseen lentoaikaan. MALDI-TOF MS -menetelmällä tunnistetaan muun muassa bakteereita, sieniä ja hiivoja. Opinnäytetyössä tutkittiin, voidaanko MALDI-TOF MS -menetelmällä tunnistaa mykobakteereita luotettavasti. Opinnäytetyön aihe saatiin Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) Meilahdessa sijaitsevasta bakteriologian laboratorion. Tällä hetkellä mykobakteereiden tunnistamiseen käytössä on GenoType -menetelmä. Tutkimuksen tarkoituksena oli saada nykyisen käytössä olevan menetelmän tilalle nopeampi ja kustannustehokkaampi tapa tunnistaa mykobakteereita. MALDI-TOF MS -menetelmän avulla mykobakteereita voidaan tunnistaa useammin ja suurempia määriä samanaikaisesti.</p> <p>Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat potilaista eristettyjä mykobakteerikantoja sekä kontrollikantoja. Tutkittavia mykobakteerinäytteitä kasvatettiin kolmella eri elatusaineella, ja tarkoituksena oli tutkia miten eri mykobakteerilajit tunnistuvat nestemäiseltä MGIT elatusaineelta, Löwenstein-Jensen elatusaineelta sekä 7H11-maljalta. Mykobakteerit inaktivoitiin niille tarkoitettulla reagenssikittillä ennen MALDI-TOF MS tunnistusta. Mykobakteereiden tunnistaminen MALDI-TOF MS -menetelmällä oli haasteellista, joka voi johtua esimerkiksi kantojen eri kasvuvaiheista tutkimushetkellä. Heikkoon tulostason on voinut vaikuttaa myös liian vähäinen mykobakteerien määrä elatusaineilla.</p>	
Avainsanat	Mykobakteeri, MALDI-TOF MS, GenoType

Author(s) Title	Jonna Koivisto and Jenni Vigren Identifying mycobacterium with MALDI-TOF MS method
Number of Pages Date	27 pages + 1 appendices 15 November 2019
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Merja Ojala, Senior Lecturer Vesa Kirjavainen, Hospital Microbiologist
<p>There are approximately 200 known mycobacterium species and the discovery of new species is ongoing. Mycobacteria are for example <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex, <i>Mycobacterium leprae</i> and nontuberculous mycobacteria. Mycobacterium and the relative species cause tuberculosis which is the most common disease caused by mycobacterium. Each year there are approximately 900 mycobacteria found in patient samples in Finland. Mycobacteria are bacillus type of bacteria that are either rod-shaped or slightly curved rods. With the gram staining method, the staining can vary, but most often mycobacteria stains gram positive. Mycobacterial cell wall is multilayered and thick. It is common for mycobacteria to have cell wall that is rich in lipids. This type of cell wall causes mycobacteria to be resistant to acids. Mycobacteria grows in aerobic environments where oxygen is available.</p> <p>MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Ionization Time-Of-Flight is an analysis technique based on mass spectrophotometry, which enables the identification of polymers, peptides and proteins. MALDI-TOF MS is a matrix assisted analysis technique which is based on the differences in the Time-Of-Flight of the ionized analytes. Among other things, MALDI-TOF mass spectrometry is used to examine bacteria and fungus. In this thesis, we examined if MALDI-TOF mass spectrometry can identify or can be used to identify mycobacteria reliably. The subject for the thesis was received from bacteriological laboratory in Hospital district of Helsinki and Uusimaa (HUSLAB) based in Meilahti. At the moment, the GenoType -method is used to identify mycobacteria. The purpose of the research was to find a faster and more cost-effective method to identify mycobacteria. With the help of MALDI-TOF MS technique, mycobacteria can be identified with higher incidence accuracy and large amounts simultaneously.</p> <p>The samples used in this research were mycobacteria flora and control flora isolated from patients. The examined mycobacteria samples were grown in three different culture mediums and the purpose was to examine how different mycobacteria species can be identified from liquid MGIT-culture medium, Löwenstein-Jensen tube and 7H11 agar plates. Mycobacterium were inactivated with a reagent kit before MALDI-TOF MS recognition. The identification of mycobacterium by MALDI-TOF MS was challenging which could be attributed to different growing phases of the bacterial populations. The low identification accuracy could have been influenced by the insufficient amount of bacteria on the culture mediums.</p>	
Keywords	Mycobacterium, MALDI-TOF MS, GenoType

Käsitteet ja lyhenteet

7H11= Elatusainealusta mykobakteereille, selektiivinen agar malja. Malja sisältää öljyhappo-albumiinirikasteita, glyserolia ja dekstroosia jotka edistävät mykobakteereiden kasvua.

Atyyppinen mykobakteeri= Ympäristömykobakteeri, joka aiheuttaa ihmiselle hengitystie-, iho- ja pehmytkudosinfektioita sekä yleistyneitä infektioita.

GenoType= Liuskahybridisaatiotesti, jossa on erilaisia koettimia, joiden avulla voidaan tunnistaa 15 eri mykobakteerilajia.

Grampositiivinen= Grampositiivinen bakteeri värjätty gramvärjäyksessä violetiksi. Sen soluseinä on paksumpi, kun gramnegatiivisen bakteerin soluseinä.

Hybridisaatiomenetelmä= Komplementaaristen nukleinihapposekvenssien liittäminen toisiinsa emäsparisääntöä noudattaen.

Koetin= Merkkiaineella leimattu DNA- tai RNA jakso.

Latentti= Elimistössä lepotilassa oleva elävä bakteeri.

Löwenstein-Jensen (L-J) -putki= Kiinteä ja tiivis munapohjainen elatusaineputki mykobakteereille, jossa kasvatetaan enimmillään kahdeksan viikkoa.

MALDI-TOF MS= Analyysimenetelmä, joka perustuu massaspektrofotometriaan. Kyseessä on matriisi avustettu analyysijärjestelmä, joka perustuu ionisoituun lentoaikaan. MALDI-TOF MS analyysilaitteella tutkitaan muun muassa bakteereita, sieniä ja hiivoja.

Matriisi / matrix= Matriisi on energiaa absorboiva liuos, jota käytetään MALDI-TOF MS -menetelmässä. Matriisiliuoksen tehtävä on hajottaa organismeja. Analyysin aikana matriisiliuos ionisoituu näytteen mukana.

MGIT= Middlebrook 7H9 -lientä sisältävä rikastusputki, jossa näytteessä oleva mahdollinen positiivinen mykobakteerikasvu tunnistetaan näytteen sameudesta tai fluoresenssista laitteen avulla.

Mykobakteeri= Grampositiivinen sauvabakteeri.

Nokardia= Mykobakteereita muistuttavia bakteereja, jotka ovat nopeakasvuisempia sekä elävät vaatimattomissa olosuhteissa.

PCR= Polymeraasiketjureaktio on menetelmä, jonka avulla yksittäinen geeni pystytään monistamaan.

RBT-putki= 2 ml:n kiinteällä korkilla oleva putki.

rRNA= Ribosomaalinen RNA.

Spotti= MALDI-TOF MS -menetelmässä käytettävän näytelevyn näytepaikka.

TbVrVi= Mykobakteereiden värjäys ja viljely-tutkimus.

Sisällys

1. Johdanto	1
2. Mykobakteerit ja niiden diagnosointimenetelmät	2
2.1. Mykobakteerit	2
2.2. Nokardiat	4
2.3. Mykobakteereiden tunnistusmenetelmät	5
2.4. Mykobakteeri, värjäys ja viljelytutkimukset -TbVrVi	5
2.5. GenoType -menetelmä	5
2.6. MALDI-TOF MS ja VITEK® MS	6
3. Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	8
4. Opinnäytetyön toteutus	9
4.1. Tiedonhaku	9
4.2. Turvalaboratorio	9
4.3. Tutkimuksen toteutus ja näytemateriaali	10
4.4. Elatusaineet	13
4.5. Mykobakteerinäytteiden käsittely ja analysointi	14
5. Opinnäytetyön tulokset	15
5.1. Löwenstein-Jensen elatusaineen tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä	15
5.2. MGIT elatusaineen tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä	17
5.3. 7H11 elatusaineen tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä	18
6. Pohdinta	20
6.1. Luotettavuus	23
6.2. Eettisyys	23
6.3. Johtopäätökset	24
6.4. Ammatillinen kasvu	24
Lähteet	26
Liitteet	
Liite 1. Vitek® MS Mycobacterium Kit -pakkausseloste	

1. Johdanto

Tämän opinnäytetyön aiheena oli tutkia, voidaanko mykobakteereita tunnistaa luotettavasti MALDI-TOF MS -menetelmää käyttäen. Aihe saatiin Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriosta (HUSLAB) klinisen mikrobiologian yksiköstä Meilahden bakteriologian laboratoriosta. Nykyisin Meilahden bakteriologian laboratoriossa mykobakteereita tunnistetaan nukleiinihappopohjaisella hybridisaatiotestillä, joka on työläs, kallis sekä pitkä prosessi. Tutkimusta tehdään vain kerran viikossa, ja näytepaikkoja on ainoastaan 12 kappaletta. Tämän takia Meilahden bakteriologian laboratorio tarvitsee käyttöön sellaisen menetelmän, jolla tunnistaminen olisi vaivattomampaa, edullisempaa ja nopeampaa. Lisäksi näytteitä pitäisi pystyä analysoimaan useammin kuin kerran viikossa, ja myös näytepaikkojen rajallinen määrä oli koettu ongelmaksi.

Mykobakteerilajeja tunnetaan noin 200, ja uusia löytyy jatkuvasti. *Mycobacterium tuberculosis* ja sen lähisukulaiset aiheuttavat tuberkuloosia, ja se onkin tärkein mykobakteerien aiheuttama tauti. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2019a.) Vuonna 2018 tuberkuloosia todettiin Suomessa 226 tapausta, joista keuhkotuberkuloosia 154 ja muuta tuberkuloosia 72. Atyyppisen mykobakteerin aiheuttamia sairauksia vuonna 2018 oli 703. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2019b.) MALDI-TOF MS -menetelmä mahdollistaisi mykobakteereiden tunnistamisen edullisemmin ja nopeammin. MALDI-TOF MS analyysilaitteelle on olemassa mykobakteereille suunnattu VITEK® MS reagenssipaketti, joka sisältää tarvittavat reagenssit, ja valmiin matriisi- sekä muurahaishappoliuoksen. (VITEK® MS. Reagents/Accessories).

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli mykobakteereiden käsittely ja tunnistaminen MALDI-TOF MS -menetelmällä. Kaikkiaan tunnistettavia mykobakteerilajeja oli 16 kappaletta. Tavoitteena oli saada nykyisen käytössä olevan menetelmän tilalle nopeampi ja kustannustehokkaampi tapa tunnistaa mykobakteereita. Jos MALDI-TOF MS -menetelmä saadaan käyttöön Meilahden bakteriologian laboratoriossa, voidaan mykobakteereita tunnistaa suuria määriä kerralla. Näytteinä ajettiin kontrollikantoja sekä potilaista eristettyjä mykobakteerikantoja. Näytteistä oli jo aikaisemmin tunnistettu mykobakteerilaji GenoType menetelmällä. Mykobakteerit oli viljelty kolmelle eri elatusaineelle, koska tarkoitus oli tutkia myös sitä, vaikuttavatko eri elatusaineet mykobakteerien tunnistamiseen. MALDI-TOF MS analyysilaitteella ajettuja spotteja oli yhteensä 133 kpl.

Mikrobiologia erikoisalana kiinnostaa meitä, ja opinnäytetyön tutkimusaihe oli sen kaltainen, jossa pääsimme tekemään merkittävää tutkimustyötä. Meille oli tärkeää saada tehdä sellainen opinnäytetyö, jolla on jokin konkreettinen tulos. Lisäksi aihe oli tärkeä niin laboratorion, kuin potilaan hoidon kannalta.

2. Mykobakteerit ja niiden diagnosointimenetelmät

Mykobakteerilajeja tunnetaan noin 200 (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2019). Mykobakteereihin kuuluvat *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, *Mycobacterium leprae* ja ympäristömykobakteerit. Nokardiat muistuttavat mykobakteereita, ja nokardia löytyykin usein sattumalöydöksenä mykobakteeriviljelyn yhteydessä. Nokardia on mykobakteeria nopeakasvuisempi, joka elää vaatimattomammassa olosuhteissa. (Soini – Liippo – Vasankari 2010: 140–150.) Tässä opinnäytetyössä keskitytään mykobakteereihin, mutta sivutaan myös nokardioita.

2.1. Mykobakteerit

Mykobakteerit ovat sauvabakteereja, muodoltaan nimensä mukaisesti sauvamaisia tai lievästi kaareutuvia. Mykobakteereita kutsutaan myös basilleiksi. Niiden koko on 0,2-0,6 x 1,0-10 µm. Gramvärjäyksessä värjäytyvyys voi vaihdella, mutta useimmiten mykobakteeri värjäytyy grampositiivisesti. Mykobakteerilla on monikerroksinen ja paksu soluseinä, joka suojaaa mykobakteeria fagosytoosilta, eli solusyönniltä. Mykobakteereita yhdistää se, että niiden seinämässä on suuri rasvapitoisuus. Tämä seinämä tekee mykobakteereista haponkestäviä. Mykobakteerit kasvavat aerobisissa olosuhteissa, eli hapen läsnä ollessa. Patogeeniset mykobakteerilajit kasvavat hitaasti, ja pesäkkeitä ilmaantuu-kin yleensä vasta 2-6 viikon kuluttua. Mitä nopeammin mykobakteeri kasvaa, ja mitä värikkäämpiä pesäkkeitä se tekee, sitä vaarattomampi se on. Ihanteellinen kasvatuslämpötila on joko 31 tai 37 celsiusastetta. (Soini ym. 2010: 140–141.)

Mykobakteerilajeja on tiedossa tällä hetkellä noin 200, joista osa on patogeenisia ja opportunistisia. Ihmiselle tautia aiheuttavia, eli kliinisesti merkittäviä mykobakteereita on yli kaksikymmentä. Mykobakteereihin kuuluvat *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, ja *Mycobacterium africanum*), ympäristömykobakteerit sekä *Mycobacterium leprae*. *M. tuberculosis* ja sen lähisukulaiset aiheuttavat tuberkuloosia. *M. leprae* aiheuttaa pitkäaikaista ihon, limakalvojen ja ääreishermoston sairautta. *M. leprae* on kuitenkin väistymässä, ja endeemisiä alueita on

Kakkois-Aasiassa, eräillä Afrikan alueilla sekä Etelä-Amerikassa. Elinympäristössämme on myös runsaasti mykobakteereita, jotka aiheuttavat tautia vain potilaalle, jonka vastustuskyky on heikentynyt. Näitä kutsutaan ei-tuberkuloottisiksi tai ympäristömykobakteereiksi. Yleisimpiä ympäristömykobakteereita ovat *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* ja *M. lentiflavum*, sekä *M. gordonae*. (Soini ym. 2010: 141–142.)

Tuberkuloosi on yleisimmin keuhkoissa oleva infektiosairaus. Tuberkuloosi tarttuu pisaratartuntana ilmaitse, kun keuhkotuberkuloosia sairastava potilas yskii. Yleensä sairastumiseen tarvitaan kuitenkin pitkäaikainen oleilu samassa huonetilassa sairastuneen kanssa. Sairautta on aikaisemmin kutsuttu myös nimellä lentävä keuhkotauti. Se on maailmanlaajuisesti yksi merkittävimmistä sairauksista. Taudin aiheuttaa *M. tuberculosis*. Nautaeläimillä on samankaltainen bakteeri, *M. bovis*, joka erittäin harvoin voi aiheuttaa myös ihmiselle taudin. Tuberkuloositartunta alkaa usein latenttina, eli se piileskelee keuhkokudoksessa, eikä tällöin ole tartuttava. Tuberkuloosi aktivoituu, kun elimistön puolustuskyky laskee, esimerkiksi ikääntymisen tai muun sairauden takia. Tuberkuloosi aiheuttaa keuhkopussitulehduksia, jolloin keuhkopussiin kertyy nestettä, ja siitä aiheutuu hengenahdistusta. Tuberkuloosin yleisoireet ovat jatkuva lämpöily, yöhikoilu, uupumus, laihtuminen ja ruokahaluttomuus. (Lumio 2018.)

Vaikka potilaalla olisi aktiivinen infektio, mykobakteereita ei erity yskös- tai virtsanäytteisiin jatkuvasti, minkä vuoksi näytteitä kerätään useampana päivänä peräkkäin. Yskösnäyte tulee ottaa aamulla sairaanhoitajan opastuksella. Pelkkä sylki ei sovellu tutkimukseen, vaan näytteeksi tulee saada ysköstä syvältä keuhkoputkista. Myös virtsanäytteet otetaan aamulla. (Soini ym. 2010: 142–144.) Aamuvirtsanäytettä tarvitaan 50 ml, ja sitä kerätään kolmena peräkkäisenä päivänä (Mykobakteeri, viljely ja värjäystutkimukset 2019).

Monilääkeresistentti tuberkuloosi, eli MDR-tuberkuloosi tarkoittaa tuberkuloosibakteeria, joka on vastustuskykyinen rifampisiinille ja isoniatsidille, jotka ovat yleisiä tuberkuloosin hoitoon käytettäviä lääkkeitä. Erittäin resistentti tuberkuloosi, eli XDR-tuberkuloosi on näiden lääkkeiden lisäksi resistentti myös joillekin fluorokinoloneille sekä aminoglykosideille. Nämä resistentit tuberkuloosit kehittyvät, jos potilas saa tartunnan lääkeresistentistä tuberkuloosikannasta, tai jos tuberkuloosin lääkehoito toteutetaan huonosti. Kun tuberkuloositapaus havaitaan, arvioidaan lääkeresistentin mahdollisuus aina ennen lääkehoidon aloitusta. Tuberkuloosidiagnoosi pyritään vahvistamaan viljelyllä, jolla saadaan

myös määritettyä bakteerikannan lääkeherkkyudet. Lääkeresistenssiä epäillään, jos potilaan paraneminen ei lähde käyntiin, tai jos paraneminen pysähtyy ja bakteerien erityisalkaa uudelleen. Tällöin potilaasta otetaan uudet näytteet, jotta varsinaiset herkkyysmääritykset voidaan tehdä. Lääkeherkkyysmäärityksiä ei tässä tapauksessa aina pystytä tekemään, sillä voi olla mahdollista, ettei potilaan kantama mykobakteerikanta enää kasva. *M. tuberculosis* bakteerin monilääkeresistenttiys syntyy spontaanien, kromosomaalisten mutaatioiden kautta. Mutaatioita voi syntyä, jos tuberkuloosin hoitoon ei käytetä riittävän montaa tehokasta lääkettä yhdessä. (Soini – Vasankari 2014.)

2.2. Nokardiat

Nokardioita löytyy sattumalöydöksenä mykobakteeriviljelyssä. Nokardiat ovat grampositiivisia aerobisia bakteereita, jotka muistuttavat mykobakteereita ja sieniä. Ne muodostavat sekä makroskooppisesti, että mikroskooppisesti nähtäviä rihmoja, jotka ovat kuitenkin ohuempia kuin sienten rihmat. Mikroskooppiset rihmat katkeilevat pieniksi paloiksi, ja niiden erottaminen bakteereista voi olla hankalaa. Makroskooppisesti nähtävät rihmat taas muodostavat maljalla pesäkkeiden päälle ilmarihmoja. Maljalla pesäkkeet ovat suuria ja vahamaisia. Verrattuna mykobakteeriin, nokardia on kasvuolosuhteiltaan vaatimaton, ja ne kasvavatkin helposti esimerkiksi vesiagarissa. Nokardia myös kasvaa nopeammin kuin mykobakteeri, ja se myös värjäytyy gramvärjäyksessä selkeämmin. (Soini ym. 2010: 149–150.) Nokardiat huomioidaan tässä opinnäytetyössä sen takia, koska ne ovat haponkestäviä kuten mykobakteeritkin ja löytyvät sattumalöydöksenä.

Nokardia kuuluu ihmisten ja eläinten ihon, nielun, suun sekä suolen normaaliflooraan. Nokardian taudinaiheuttamiskyky on heikko. Nokardia voi aiheuttaa keuhkonokardioosin, mutta sairastuminen vaatii usein T-solujen toiminnan vajavuussairauden, kuten esimerkiksi syövän tai AIDSin. Nokardoita esiintyy maaperässä ja kasveissa. Altistuminen infektioille voi tapahtua, jos hengitetään mutapölyä, tai maata pääsee ihonalaiskudokseen esimerkiksi haavan kautta. Nokardia aiheuttaa paiseita keuhkoihin, jotka voivat lähettää etäpesäkkeitä muualle elimistöön, kuten esimerkiksi aivoihin, munuaisiin, maksaan tai pernaan. Nokardiat voivat aiheuttaa myös mysetoomia, eli kroonisesti märkäisiä paiseita ihossa tai ihonalaisessa kudoksessa. (Soini ym. 2010: 149–150.)

2.3. Mykobakteereiden tunnistusmenetelmät

Mykobakteerien laboriodiagnostiikka perustuu viljelyyn, värjäykseen ja geenimonistukseen. Alustava mykobakteeriryhmitys tapahtuu tarkkailemalla maljalla kasvavien pesäkkeiden morfologiaa, kasvunopeutta, kasvulämpötilaa ja värinmuodostumista. Tarkempi lajimääritys tehdään geenimonistustekniikoilla, esimerkiksi PCR:llä. Nykyisten menetelmien keskeinen ongelma on kuitenkin niiden hitaus. (Soini ym. 2010: 142–143.)

2.4. Mykobakteeri, värjäys ja viljelytutkimukset -TbVrVi

Tutkimuspyynnöllä -TbVrVi indikaationa on epäily *Mycobacterium tuberculosis* kompleksin mykobakteerista, *M. leprae* lajin bakteerista tai muusta atyyppisen mykobakteerin aiheuttamasta taudista. Epäiltäessä lepraa, käytetään tätä samaa pyyntöä, mutta lähetteeseen kirjataan epäilystä vapaamuotoinen maininta. Tutkimus voidaan tehdä yskösnäytteestä, märkä-, uloste-, tai muusta ei-nestemäisestä näytteestä. Lisäksi tutkimus voidaan tehdä myös kudoksen- tai luunäytteestä, bronkuslima-, bal-, virtsa, tai muusta nestemäisestä näytteestä sekä veri-, tai luuydinäytteestä. (Mykobakteeri, viljely ja värjäystutkimukset 2019.)

HUSLABissa mykobakteereiden värjäysmenetelmänä on haponkestävien sauvabakteereiden auramiinivärjäys. Yskösnäytteiden värjäystulos vastataan näytteen saapumispäivänä, ja muut näytteet vastataan 1-2 työpäivän aikana. Uudet positiiviset värjäysnäytteet tutkitaan geenimonistustesteillä. Värjäyksen lisäksi mykobakteerit viljellään sekä kiinteälle että nestemäisellä mykobakteerielatusaineelle. Näyte voidaan viljellä myös mykobakteeriviljelypulloissa. Mikäli viljelyssä todetaan haponkestäviä sauvoja, tulos vastataan välittömästi. Lajimääritys tehdään viikon kuluessa. Mikäli lajinimeä ei saada selville, tehdään lajimääritys alihankintana Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksella (THL). Negatiivinen viljelytulos vastataan kahdeksan viikon kuluessa. (Mykobakteeri, viljely ja värjäystutkimukset 2019.)

2.5. GenoType -menetelmä

Meilahden bakteriologian laboratoriossa mykobakteereja tunnistetaan tällä hetkellä GenoType Mycobacterium CM -menetelmällä. GenoType tunnistaa 15-20 eri mykobakteeri-

rilajia. Menetelmää käytetään yhdessä DNA-laboratorion kanssa. Näytepaikkoja on kaksoista, ja mykobakteerinäytteitä pystytään resurssien takia ajamaan vaan kerran viikossa.

GenoType on liuskahybridisaatiotesti. Testissä on erilaisia koettimia, joiden avulla voidaan tunnistaa 15 eri mykobakteerilajia. Tutkittava bakteerikanta täytyy ensin monistaa PCR-tekniikan avulla. Tämän jälkeen monistettu tuote hybridisoituu liuskalla olevien koettimien kanssa. Näytteestä vapautettu rRNA sitoutuu koettimeen, josta syntyy väireaktio. Tässä testissä on monia työvaiheita, ja sen tekemiseen kuluu aikaa viisi tuntia. Tämä testi on monistusvaiheen vuoksi selkeästi herkempi kuin pelkkä DNA-koetin testi. GenoType testin lisäksi myös DNA-mikrosirulla voidaan tunnistaa mykobakteereita. (Eskola – Soini 2004.)

GenoType Mycobacterium CM -menetelmä perustuu siis DNA STRIP-tekniikkaan. Koko menetelmä on jaettu kolmeen vaiheeseen: DNA:n uuttaminen viljellystä materiaalista, monistus alukkeiden avulla ja lopuksi hybridisaatio. GenoType Mycobacterium CM -testi sisältää monistamiseen tarvittavat reagenssit, kuten polymeraasin sekä alukkeet, jotka ovat optimoitu tätä testiä varten. Eräänlaiset kalvonauhat päällystetään spesifisillä koettimilla, jotka ovat komplementaarisia monistetuille nukleiinihapoille. Kemiallisen denaturoinnin jälkeen yksijuosteiset DNA-juosteet sitoutuvat koettimiin, jolloin tapahtuu hybridisaatio. Komplementaaristen DNA-juosteiden erittäin spesifinen sitoutuminen varmistetaan tarkoilla olosuhteilla, joihin vaikuttavat puskurikoostumuksen ja tietyn lämpötilan yhdistelmä. Näiden vaikutusten takia koettimet erottavat luotettavasti mykobakteerilajit. Lopuksi emäksinen fosfataasi muuttaa lisätyn substraatin väriaineeksi, joka tulee näkyväksi kalvonauhoilla värillisenä saostumana. (GenoType Mycobacterium CM 2016.)

2.6. MALDI-TOF MS ja VITEK® MS

MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight on analyysimenetelmä, joka perustuu massaspektrofotometriaan. Sen avulla pystytään tunnistamaan polymeerejä, peptidejä sekä proteiineja. MALDI-TOF MS on nopean, luotettavan, taloudellisen ja helppokäyttöisyyden lisäksi myös ympäristöystävällinen menetelmä, joka on mullistanut bakteereiden ja sienien tunnistamisen bakteriologian laboratorioissa. (Vrioni ym. 2018.)

VITEK® MS, Mass spectrofotometry microbial identification system on laaja tietokanta, joka nimeää tunnistettavan bakteerin lajin tai suvun tasolla. Nykylaboratoriodiagnostiikassa MALDI-TOF MS sekä VITEK® MS antavat tutkimustuloksen nopeasti ja edullisesti verrattuna muihin menetelmiin. Tutkimustuloksen nopeutuessa, myös potilaan hoitoa saadaan nopeutettua. (VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system.)

Uutuutena markkinoille on tullut mykobakteereille oma reagenssipaketti, VITEK® MS Mycobacterium / Nocardia and Mould Reagent Kit, joka mahdollistaa mykobakteereiden tunnistamisen luotettavasti ja turvallisesti. Tuotepaketti sisältää valmiit reagenssit sekä 48 paikkaisen näytelevyn. (VITEK® MS. Reagents/Accessories.)

Kontrollikantana käytetään *Escherichia coli* bakteeria, jolla varmistetaan laitteen luotettavuus. Mikäli laite ei tunnista kontrollikantaa, ei VITEK® MS anna ajaa näytteitä näytelevyltä. Näytteiden päälle pipetoidaan kaupallista, valmista matriisiliuosta, joka koostuu orgaanisesta haposta. Matriisi on energiaa absorboiva liuos. Kun matriisi kiteytyy kuivumisen aikana näytelevylle, näyte kiteytyy sen sisälle. Matriisiliuoksen tehtävä on hajottaa organismeja, ja ajon yhteydessä se myös ionisoituu näytteen mukana. (Lévesque ym. 2015.)

Näytteen ionisoimiseksi näytelevy laitetaan VITEK® MS:n vakuumitilaan. Laserimpulssit saavat aikaiseksi näytteen proteiinien ionisoitumisen kaasumaiseen muotoon. Varautuneet partikkelit kiihdytetään lentämään vakuumissa olevan sähkökentän läpi. Lentoaika (TOF), eli kauanko partikkelilla kestää saavuttaa detektorin on riippuvainen partikkelin massasta ja sähkövarauksesta. Lentoajan mittaus tapahtuu detektorilla, jonne partikkelit osuvat lentäessään. Näin muodostuu mikrobispesifinen proteiinispektri, jota analyysilaitte vertaa omaan tietokantaansa eli referenssiproteiinispektreihin. (Lévesque ym. 2015.)

MALDI-TOF MS tarjoaa erittäin vahvan, tehokkaan, nopean sekä luotettavan menetelmän mikrobien tunnistukseen. Tarkkuus ja spesifisyys vaihtelee 90-100 % välillä riippuen kyseessä olevista mikrobilajeista tai näytteistä. Myös ne mikrobit, jotka ovat yleensä vaikeasti tunnistettavia tavanomaisin menetelmin, eivät yleensä ole ongelmallisia tunnistaa MALDI-TOF MS -menetelmällä. Sen tietokannat ovat melko kattavia ja vankkoja, ja niiden koetaan olevan riittäviä. Ongelmia kuitenkin löytyy, muun muassa se, että jos laitteen käyttäjän perehdytys tekniikkaan on ollut lyhyt, se johtaa korkeaan tulosten hyväksymistasoon. Välttämättä silloin ei osata epäillä sitä, voiko tosiaan laitteen vastaama

bakteeri aiheuttaa kyseisen infektion. Yhdeksi ongelmaksi koetaan myös laitteen rajallinen herkkyys. Mikäli mikrobin tunnistusherkkyyttä nostettaisiin, käyttökustannukset nousisivat sekä prosessi muuttuisi hitaammaksi. (van Belkum – Walker – Pincus – Cherrier – Girard 2017.)

Huang, Lee, Tu ja Shin julkaisivat vuonna 2018 tutkimuksen, jossa mykobakteereita tunnistettiin MALDI-TOF MS -menetelmällä. Tutkimuksen mukaan puhtaista viljelmistä mykobakteerit tunnistuivat hyvin. Kun MGIT-putkessa nähtiin makroskooppisesti tarkastelemalla puuvillan kaltaista kasvua, oli tunnistus 100 %. Mikäli MGIT-putkissa kasvusto oli sekaviljelmää, tunnistus oli huono, vain 41,7 %. Tutkimuksessa todettiin, että mykobakteerin oikein tunnistamisessa tärkeää on viljelmän puhtaus, tuoreus sekä mykobakteerin määrä. Tutkimuksessa suoritettiin kustannusanalyysi, jossa todettiin, että MALDI-TOF on taloudellisesti kilpailukykyinen menetelmä mykobakteerien tunnistamiseen diagnostisessa laboratoriossa. Reagenssikustannukset olivat pienemmät kuin esimerkiksi mikrosirumenetelmässä. MALDI-TOF MS analyysilaitteen käyttö vaatii kalliit laitteet, mutta sitä voidaan hyödyntää myös muiden bakteerien, sienien ja hiivojen tunnistuksessa. Tämä vähentää kokonaiskustannuksia. MALDI-TOF MS -menetelmän avulla tunnistaminen on nopeaa, joka johtaa siihen, että mykobakteeri-infektiot todetaan nopeammin ja näin voidaan säästää sairaala- ja hoitokuluissa.

3. Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli ajaa eri mykobakteerikantoja MALDI-TOF MS analyysilaitteella. Tarkoituksena oli myös selvittää, onko MALDI-TOF MS -menetelmä luotettava mykobakteereiden tunnistamiseen. Tunnistimme *M. tuberculosis* kompleksin kantoja, eli *M. tuberculosis*, *M. bovis* ja *M. africanum* sekä atyyppisiä mykobakteereita. Tunnistettavia lajeja oli 16, jotka ovat lueteltuna taulukossa 1.

Tavoitteena oli saada nykyisen käytössä olevan menetelmän tilalle nopeampi ja kustannustehokkaampi tapa tunnistaa mykobakteereita. MALDI-TOF MS -menetelmän avulla näytteitä pystyttäisiin ajamaan useammin ja enemmän sekä huomattavasti vanhaa menetelmää nopeammin. Meilahden bakteriologian laboratoriossa on kaksi MALDI-TOF MS analyysilaitetta. Näillä analyysilaitteilla tunnistetaan tällä hetkellä bakteereita, sieniä ja hiivoja.

Tutkimuskysymykset:

1. Voidaanko MALDI-TOF MS -menetelmällä tunnistaa mykobakteereita luotettavasti?
2. Vaikuttaako eri elatusaineet mykobakteerilajien tunnistamiseen?
3. Voidaanko MALDI-TOF-tutkimuksella korvata GenoType -menetelmää?

4. Opinnäytetyön toteutus

4.1. Tiedonhaku

Tietoa opinnäytetyöhön haettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun tiedonhaku palveluista, kuten PubMed sekä Ovid, joissa on saatavilla tuoreita tieteellisiä artikkeleita opinnäytetyön tueksi. Hakusanoina käytettiin muun muassa mycobacterium, MALDI-TOF MS ja VITEK MS. Hakusanoilla tuoreita artikkeleita löytyi useita kymmeniä, mutta tutkimuksen kannalta hyödyllisiä löytyi vain rajallisesti. Kiinnitimme huomiota lähteen laatuun ja tuoreuteen, jonka perusteella valitsimme neljä englannin kielistä artikkelia mukaan opinnäytetyön raporttiin. Tutkimustietoa mykobakteerien tunnistamisesta MALDI-TOF MS analyysilaitteella oli haasteellista löytää.

Materiaalia on aloitettu kartoittamaan jo opinnäytetyön suunnitelmavaiheessa. Aihe on rajattu koskemaan mykobakteereiden tunnistamista MALDI-TOF MS -menetelmällä sekä turvalaboratorio työskentelyyn ja näytteiden käsittelyyn. Tarvitsimme opinnäytetyön materiaaliksi tutkimustietoa mykobakteereista sekä MALDI-TOF MS analyysilaitteen toimintaan liittyvää tietoa.

4.2. Turvalaboratorio

Ennen varsinaista työn suoritusta saimme perehdytyksen mykobakteerilaboratoriossa työskentelyyn. Mykobakteereita tutkitaan omassa turvalaboratoriossa, jossa toimiminen on erilaista kuin tavallisessa laboratoriossa. Mykobakteerilaboratoriossa on muun muassa sulkutila, jossa työvaatteiden päälle puetaan erillinen suojavaate sekä työkengät

vaihdetaan erillisiin kenkiin. Laboratoriohoitaja Milla Kulin kävi kanssamme läpi englantinkieliset työohjeet. Hän oli apuna ensimmäisenä päivänä, jonka jälkeen toimimme itsenäisesti.

Mikrobiologian laboratoriossa työskentely vaatii työturvallisuusohjeiden noudattamista. Lisäksi eri työpisteillä noudatetaan työpistekohtaisia työohjeita. Ohjeiden noudattaminen on välttämätön ja tehokas tapa torjua infektioita, sillä mikrobiologian laboratoriossa työntekijä voi altistua tautia aiheuttaville mikrobeille. Mikrobeille altistumista voi tapahtua lähes kaikissa työvaiheissa, esimerkiksi potilasnäytteen käsittelyssä, viljelyssä tai mikroskooppinäytteen valmistuksessa. Altistuminen voi tapahtua, mikäli viljelmää tai näytettä joutuu työntekijän käsiin, joiden kautta mikrobit voivat joutua suuhun tai silmiin. Mikrobeille voi altistua myös pisaratartuntana. (Kulin 2018.)

Mikrobiologian laboratoriossa työskennellessä käytetään suojakäsineitä, kun tehdään primääriwiljelyä, työskennellään suojakaapissa tai kun käsitellään näytteitä. Käsihygienia on myös ehdottoman tärkeä. Kädet pestään sekä desinfioidaan aina, kun on käsitelty näytteitä, ja aina kun poistutaan työtiloista. Käsissä ei saa käyttää sormuksia, kelloja eikä käsikoruja. Laboratoriossa työskennellessä käytetään suojavaatteita. Suojakaapissa työskentelyyn on erillinen ohje, johon tulee perehtyä ennen suojakaappityöskentelyä. Työskentelypinnat puhdistetaan työskentelyn jälkeen 80 % denaturoidulla alkoholilla. Roiskeet ja eritetahrat puhdistetaan heti niiden synnyttyä. Yöllä suojakaapeissa käytetään UV-valoa vähintään kahden tunnin ajan. (Kulin 2018.)

Mykobakteerilaboratoriossa jätehuolto ja aseptiikka on tarkempaa, kuin esimerkiksi mikrobiologian laboratoriossa, ettei mykobakteerit pääse kontaminoimaan. Työskentely vaatii tarkkuutta sekä huolellisuutta, ja esimerkiksi suojakaapissa työskennellessä käsineitä ei saa ottaa kaapin ulkopuolelle, vaan ne on riisuttava kaapissa. Roskat autoklavoidaan ennen laboratoriosta ulos viemistä.

4.3. Tutkimuksen toteutus ja näytemateriaali

Opinnäytetyö käsittelee aihetta mykobakteereiden tunnistaminen MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight) -menetelmällä ja aihe saatiin Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriin (HUS) Meilahdessa sijaitsevasta bakteriologian laboratoriosta. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat lehtori Merja Ojala sekä sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavainen. Tutkimusajanjakso oli viikoilla 16–18 vuonna 2019. Tässä

opinnäytetyössä käytettiin MALDI-TOF MS -menetelmää, jolla pyrittiin tunnistamaan mykobakteereita. Tutkittavista näytteistä oli jo valmiiksi tunnistettu mykobakteerilaji GenoType -menetelmällä. Tutkittavia lajeja oli kaikkiaan 16 kappaletta (taulukko 1). Opinnäytetyön toteutusvaiheessa meitä ohjasi tarvittaessa myös laboratorion henkilökunta. Tarvittavat materiaalit, kuten VITEK® MS:n reagenssi paketti sekä mykobakteerit tulivat HUSLABin toimesta.

Taulukko 1. Opinnäytetyössä tutkittuja mykobakteerilajeja

<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>Mycobacterium chimaera</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
<i>Mycobacterium malmoense</i>
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Meilahden bakteriologian laboratoriossa oli tarkoitus aloittaa Mykobakteereiden tunnistus MALDI-TOF MS analyysilaitteella, joka lyhentäisi huomattavasti nykyistä pitkää protokollaa geenimonistamisineen. Meilahden bakteriologian laboratoriossa mykobakteereille käytetään elatusaineina nestemäistä MGIT-elatusainetta, Löwenstein-Jensen (LJ)-elatusainetta sekä 7H11-maljoja. Tässä opinnäytetyössä tunnistettiin *M. tuberculosis*

kompleksin (*M. tuberculosis*, *M. bovis* ja *M. africanum*) kantoja sekä atyyppisiä mykobakteereita kyseisiltä elatusaineilta ja maljoilta MALDI-TOF MS analyysilaitteella.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytetyt mykobakteerilajit elatusaineittain

Löwenstein-Jensen	MGIT	7H11
-	-	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	-	<i>Mycobacterium chelonae</i>
-	-	<i>Mycobacterium chimaera</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
-	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
-	-	<i>Mycobacterium kansasii</i>
-	-	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
-	-	<i>Mycobacterium malmoense</i>
-	-	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
-	-	<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>
-	-	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
-	<i>Mycobacterium simiae</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Tutkimuskäyttöön saadut näytteet olivat potilasnäytteitä ja kontrollikantoja, joista mykobakteerilaji oli jo valmiiksi tunnistettu GenoType -menetelmällä tunnistettu. Näytteitä oli kerätty tätä tutkimusta varten pakastetuista kontrolli- ja potilasnäytteistä vuosilta 2016-2019. Näytteet oli valmiiksi viljelty opinnäytetyön tutkimusta varten edellä mainituille elatusaineille. Mykobakteerin kasvu vaihtelee lajin mukaan, joten ne oli laitettu ajoissa kasvamaan.

Näytteitä käsitellään mykobakteerilaboratoriossa ennen näytelevyjen tuontia yleisiin laboratoriotiloihin, jossa sijaitsee MALDI-TOF MS analyysilaitte. Mykobakteerit käsitellään inaktiiviseen muotoon ennen matriisiliuoksen lisäystä ja analyysilaitteella ajoa. Inaktiivointi sekä näytelevyn huolellinen pakkaaminen objektilasikoteloon ehkäisee kontaminaation sekä estää tartuntavaarallisia mikrobeja leviämästä muihin tiloihin ja työntekijöihin.

4.4. Elatusaineet

Tässä opinnäytetyössä tunnistimme mykobakteereita kolmelta eri elatusaineelta. Tarkoituksena oli tutkia sitä, vaikuttaako elatusaine mykobakteerin tunnistumiseen MALDI-TOF MS analyysilaitteella.

Löwenstein-Jensen-putki on kiinteä elatusaineputki, josta kosteus ei haihdu niin helposti kuin agarmaljalta. Putki on tiivis, ja elatusaine on munapohjaista. Mykobakteereita kasvatetaan enintään kahdeksan viikkoa, ja kasvua tarkastellaan viikoittain. L-J-putki on hyvä elatusaine kaikkien mykobakteereiden kasvatukseen. Laskemalla pH:ta pienemmäksi, putki saadaan selektiiviseksi myös epätyypillisiä mykobakteereita varten. Malakiittivihreää käytetään hengitysteiden normaaliflooran aiheuttaman kontaminanttikasvun estämiseen. (Eskola – Soini 2004.)

MGIT on rikastusputki, joka sisältää nestemäistä Middlebrook 7H9-lientä. Näytteessä oleva mahdollinen positiivinen mykobakteerikasvu tunnistetaan näytteen sameudesta tai fluoresenssista laitteen avulla. Nestemäisessä elatusaineessa sienten ja bakteereiden kasvu estetään elatusaineeseen lisätyllä mikrobilääkkeellä. (BD BBL™ MGIT™.)

7H11 on selektiivinen agar malja, johon on käytetty Middlebrook OADC rikastetta. Tätä maljaa käytetään myös jatkoviljelyihin. Hajotusviljelyn kautta maljalle saadaan selkeitä erillispesäkkeitä. Malja sisältää öljyhappo-albumiinirikasteita, glyserolia ja dekstroosia jotka edistävät mykobakteereiden kasvua. Maljalla on myös malakiittivihreää, joka estää ylähengitysteiden normaaliflooran kasvua alustalla. (BD BBL™ Middlebrook 7H11//7H11 Selective Agar 2014.)

4.5. Mykobakteerinäytteiden käsittely ja analysointi

Näytteinä ajoimme kontrollikantoja sekä potilaista eristettyjä mykobakteerikantoja. Näytteistä oli jo aikaisemmin tunnistettu mykobakteerilaji GenoType -menetelmällä. Kantoja oli 16 kappaletta (taulukko 1).

Tunnistimme *M. tuberculosis* kompleksin kantoja, eli *M. tuberculosis*, *M. bovis* ja *M. africanum* sekä atyyppisia mykobakteereita. Haasteena tutkimuksessa oli mykobakteerien eri kasvunopeudet, jonka vuoksi näytteiden ajo ajoittui usealle eri viikolle. Myös arkipyhäpäivät hankaloittivat tutkimuspäivien suunnittelua. Ennen kun mykobakteerit tunnistettiin MALDI-TOF MS analyysilaitteella, ne saatettiin inaktiiviseen muotoon. Inaktiivisen muodon saamiseksi meillä oli käytössä VITEK® MS Mycobacterium Kit, joka sisältää kaikki tarvittavat reagenssit sekä putket.

Mykobakteerit vaativat erillisen käsittelyn (liite 1), jotta niiden proteiinit saadaan vapautumaan. Käsittelyä varten VITEK® MS Mycobacterium/Nocardia kit:n mukana tulee vaihekohtainen ohje. Näytettä otettiin viljelysilmukalla putkeen, jossa on lasihelmiä sekä 0,5 ml etanolia. Näyteputkessa olevat lasihelmet auttavat solurakenteen hajoamista sekoittamisen yhteydessä. On tärkeää varoa, ettei kasvumaljalta tule kasvualustaa eli agaria mukana näytettä otettaessa. Tämän jälkeen putkea sekoitettiin voimakkaasti 15 minuuttia vorteksilla. Näytesuspensiota inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia, jonka jälkeen sekoitettiin 5-10 sekuntia ja eroteltiin kitissä mukana olevaan 2 ml RBT-putkeen. Suspensio suositellaan pipetoimaan, ettei lasihelmet siirry RBT-putkeen. (VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT / VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT 2016.)

Suspensiota sentrifugoitiin 2 minuuttia 10000-14000 g välillä. Erottunut supernatantti pipetoitiin pois. Seuraavaksi putkeen lisättiin 10 µl muurahaishappoa ja sekoitettiin pipetillä. Tämän jälkeen lisättiin 10 µl asetonitriliä ja jälleen sekoitettiin voimakkaasti sekä sentrifugoitiin 10000-14000 g. Supernatanttia pipetoitiin 1 µl näytelevyllä olevan ympyrän sisään ja annettiin kuivua. Lopuksi lisättiin VITEK MS-CHCA matriisi liuosta 1 µl ja annettiin jälleen kuivua. Tämän jälkeen näyte oli valmis ajettavaksi MALDI-TOF MS analyysilaitteella. (VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT / VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT 2016.)

Mykobakteerilaboratoriossa inaktiiviseen muotoon saatettu näyte pipetoitiin näytelevylle, joka kuivumisen jälkeen asetettiin objektilasikoteloon. Näytelevy pakattiin suljettuun koteloon huolellisesti, jotta vältetään kontaminaatioita ja ettei mikrobit leviä ympäristöön. Näytelevy kuljetettiin mykobakteerilaboratoriosta mikrobiologian laboratorioon, jossa MALDI-TOF MS analyysilaitte sijaitsee. Tämän jälkeen näytteiden tunnistetiedot syötettiin tietokoneelle ja näytelevy laitettiin MALDI-TOF MS analyysilaitteen sisään.

Kun bakteereita tunnistetaan MALDI-TOF MS analyysilaitteella, se muodostaa spektrin, jota verrataan VITEK MS® kirjaston spektreihin. Mikäli bakteeria ei pystytä tunnistamaan, saadaan vastaukseksi virhelauseke. "No id" -virhelauseke tarkoittaa sitä, että lajia ei voida tunnistaa. "Bad spectrum during a acquisition" tarkoittaa huonoa spektriä. "Not enough peaks" tarkoittaa, ettei analyysilaitte saanut mitattua riittävästi piikkejä, joiden perusteella spektri muodostuu ja tunnistaminen tapahtuu.

5. Opinnäytetyön tulokset

Jokainen tutkittava näyte oli identifioitu omalla numerotunnisteella. Näytteitä kasvatettiin kolmella eri elatusaineella, ja tarkoituksena oli tutkia miten eri mykobakteerilajit tunnistuvat nestemäiseltä MGIT-elatusaineelta, Löwenstein-Jensen-putkesta sekä 7H11-maljalta.

Ennen tutkimusosuuttamme laboratoriohoitaja Milla Kulin oli testannut mykobakteerikititä työhöjeen mukaan (liite 1.) ja kirjannut tulokset Excel-taulukkoon. Saimme taulukon käyttöömmme opinnäytetyötä varten, ja lisäsimme sinne myös omat tuloksemme. Aloitimme tutkimuksen ohjeen mukaan pipetoimalla näytelevylle näytettä 1 µl. Ensimmäisissä ajoissa mykobakteerit tunnistuivat huonosti tai ei ollenkaan, joten keskustelimme asiasta sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavaisen kanssa. Saimme ohjeeksi kokeilla ajaa samasta näytteestä rinnakkain 1 µl ja 2 µl spotit, jotta saamme tietää, onko näytemäärällä merkitystä tunnistamisen kannalta. Rinnakkaisia spotteja ei ajettu kaikista näytteistä.

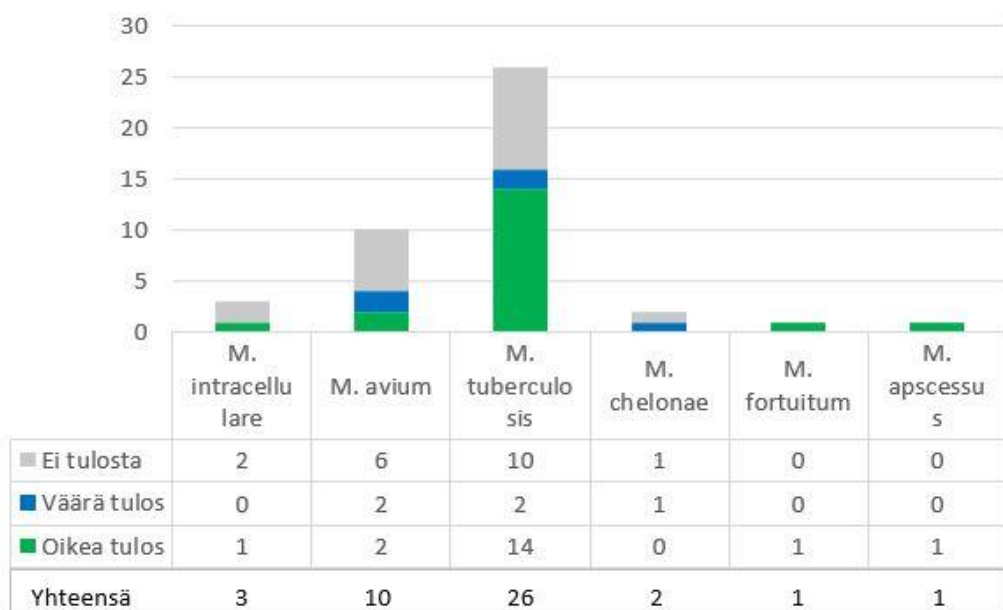
5.1. Löwenstein-Jensen elatusaineen tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä

Ajoimme Löwenstein-Jensen elatusaineelta yhteensä 43 näytettä. Osan näytteistä ajoimme kahteen kertaan, koska ajoimme rinnakkain näytemäärät 1 µl ja 2 µl. Kuviossa 1 ja 2 on esitetty tulokset lajien mukaan pylväsdiagrammi muodossa, joka auttaa hahmottamaan tulosten jakautumista. 1 µl näytemäärällä oikeita tuloksia saimme 19 kpl (44

%), vääriä tuloksia 5 kpl (12 %) ja ei tulosta 19 kpl (44 %). MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat virhelausekkeet jakaantuivat: No id 63 % / Bad spectrum during a acquisition 31 % / Not enough peaks 5 %.

Kuviossa 1 on kuvattu Löwenstein-Jensen elatusaineelta saadut tulokset 1 µl näytemäärällä MALDI-TOF MS -menetelmällä. 1 µl näytemäärällä kolmesta *M. Intracellulare* näytteestä tunnistui oikein yksi näyte. Vääriä tuloksia ei tullut, mutta kahdesta ei saatu tulosta lainkaan. *M. avium* näytteitä oli kymmenen, ja niistä tunnistui oikein kaksi. Vääriä tuloksia oli kaksi, ja kuudesta ei saatu tulosta. *M. tuberculosis* näytteitä oli 26 ja niistä tunnistui oikein 14. Vääriä tuloksia oli kaksi, ja kymmenestä ei saatu tulosta. Kahdesta *M. chelonae* näytteestä ei tunnistunut oikein kumpikaan. Vääriä tuloksia oli yksi, ja toisesta ei saatu tulosta. *M. fortuitum* ja *M. apscensus* näytteitä oli kumpaakin yksi ja ne tunnistuivat oikein.

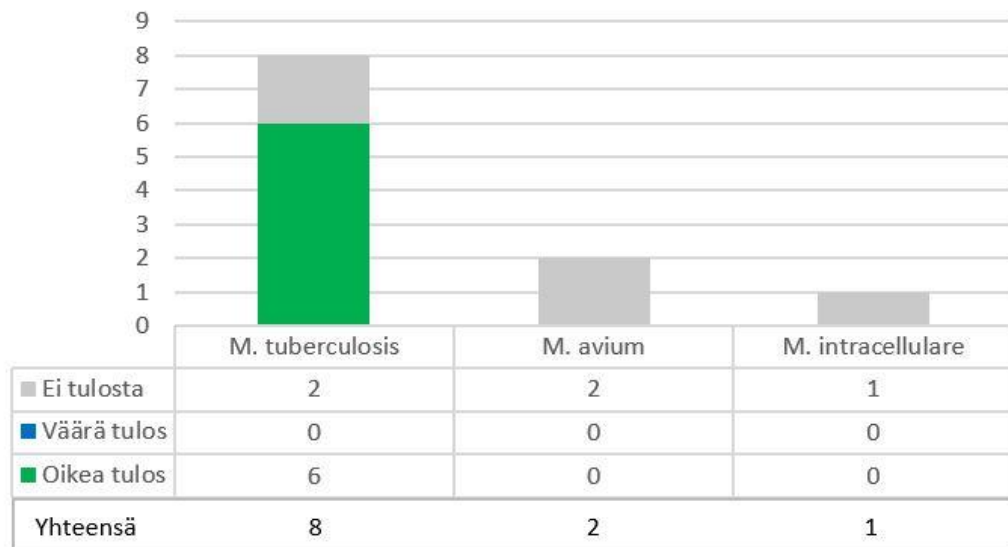
Löwenstein-Jensen MALDI-TOF tulokset (1 µl)



Kuvio 1. Löwenstein-Jensen elatusaineelta MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat tulokset mykobakteerilajien mukaan näytemäärän ollessa 1 µl.

2 µl näytemäärällä oikeita tuloksia saimme 6 kpl (55 %), ei tulosta 5 kpl (45 %) ja vääriä tuloksia 0 kpl (0 %). Virhelausekkeet jakaantuivat No id 20 % / Bad spectrum during a acquisition 80 %.

Löwenstein-Jensen MALDI-TOF tulokset (2 µl)

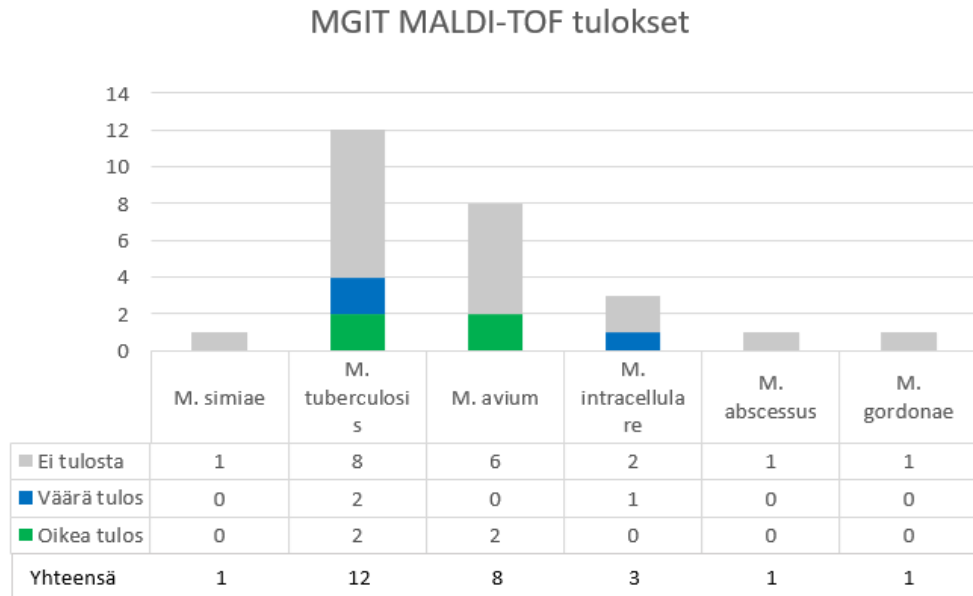


Kuvio 2. Löwenstein-Jensen elatusaineelta MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat tulokset mykobakteerilajien mukaan näytemäärän ollessa 2 µl.

Kuviossa 2 on kuvattu Löwenstein-Jensen elatusaineelta saadut tulokset 2 µl näytemäärällä MALDI-TOF MS -menetelmällä. 2 µl näytemäärällä *M. Intracellulare* näytettä oli vain yksi, ja siitä ei saatu tulosta. *M. avium* näytettä oli kaksi, ja niistä kummastakaan ei saatu tulosta. *M. tuberculosis* näytteitä oli yhteensä kahdeksan, ja niistä tunnistui oikein kuusi. Vääriä tuloksia ei ollut, ja kahdesta ei saatu tulosta lainkaan.

5.2. MGIT elatusaineen tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä

Ajoimme yhteensä 26 kappaletta eri näytettä MGIT elatusaineelta. Oikeita tuloksia oli 4 kpl (15,4 %), vääriä tuloksia 3 kpl (11,5 %) ja ei tulosta 19 kpl (73,1 %). Virhelausekkeet jakautuivat seuraavasti: No id 79 % / Bad spectrum during a acquisition 5,3 % / Not enough peaks 15,7 %.



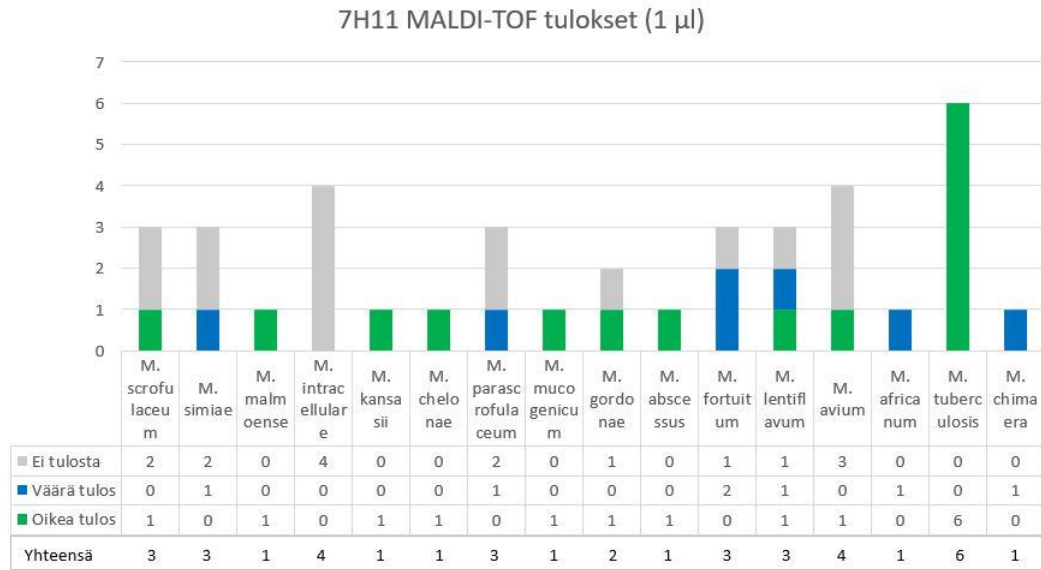
Kuvio 3. MGIT elatusaineelta MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat tulokset mykobakteerilajien mukaan.

Kuviossa 3 on kuvattu MGIT elatusaineelta saadut tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä. *M. simiae* näytteitä oli yksi, ja siitä ei saatu tulosta. *M. tuberculosis* tunnistui oikein kaksi kertaa. Vääriä tuloksia oli 2 kpl, ja ei tulosta 8 kpl. *M. avium* näytteitä oli kahdeksan, joista kaksi tunnistui oikein. Vääriä tuloksia ei tullut, ja kuusi näytettä ei tunnistunut lainkaan. *M. intracellulare* näytteitä oli kolme, joista kahdesta ei saatu tulosta, ja yksi tunnistui väärin. *M. abscessus* ja *M. gordonae* ajettiin yhden kerran, ja niistä ei saatu tulosta.

5.3. 7H11 elatusaineen tulokset MALDI-TOF MS -menetelmällä

Ajoimme 7H11-maljalta yhteensä 23 kappaletta eri näytteitä. Kuvioissa 4 ja 5 tulokset on esitetty pylväsdiagrammi muodossa. Ajoimme samaa näytettä useaan kertaan. Ensimmäisenä tutkimuspäivä viidestätoista näytteestä oikein tunnistui vain viisi. Keskustelimme asiasta Vesa Kirjavaisen kanssa, ja päätimme että annoimme näytteiden kasvaa lisää, ja seuraavana tutkimuspäivänä ajamme näytteet sekä 1 µl että 2 µl näytemäärällä.

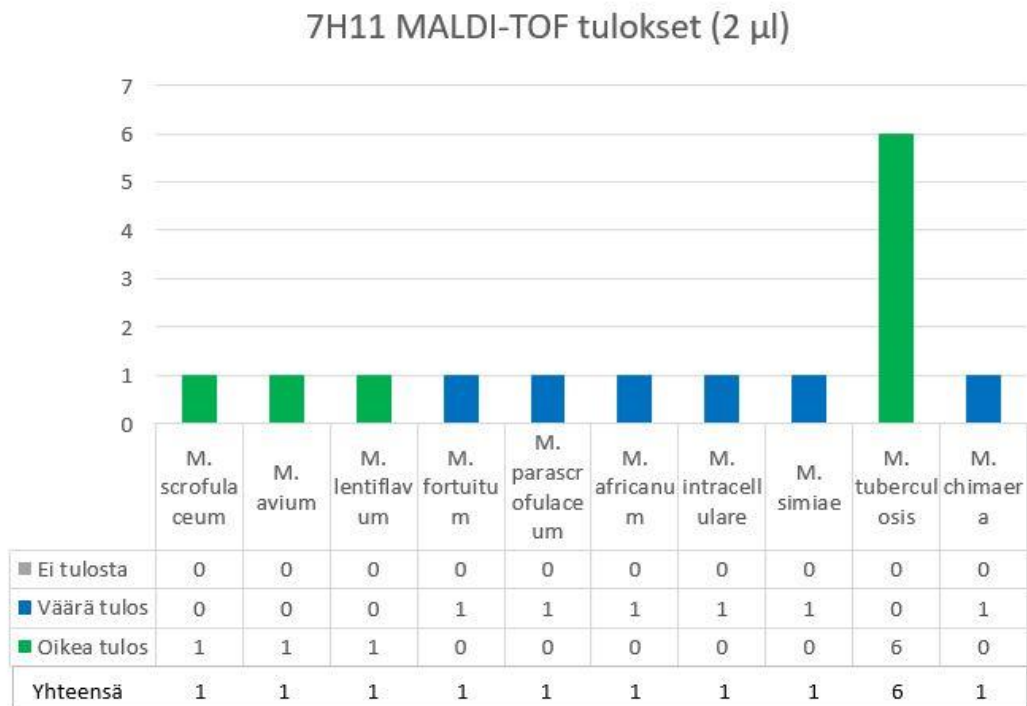
1 µl näytemäärällä oikeita tuloksia saatiin 15 kpl (39,5 %), vääriä tuloksia 7 kpl (18,4 %) ja ei tulosta 16 kpl (42,1 %). MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat virhelausekkeet jakaantuivat: No id 68,8 % ja Bad spectrum during a acquisition 31,2 %.



Kuvio 4. 7H11-maljalta MALDI-TOF MS analysilaitteen antamat tulokset mykobateerilajien mukaan näytemäärän ollessa 1 µl.

Kuviossa 4 on kuvattu 7H11 elatusaineelta saadut tulokset 1 µl näytemäärällä MALDI-TOF MS -menetelmällä. 1 µl näytemäärällä *M. scrofulaceum* näytteitä ajettiin kolme kertaa, joista yksi tunnistui oikein, ja kaksi ei tunnistunut lainkaan. *M. simiae* näytteitä oli kolme, joista yksi tunnistui väärin, ja kahdelle ei saatu tulosta. *M. malmoense* ajettiin vain kerran, ja siitä saatiin oikea tulos. *M. intracellulare* näytteitä oli neljä, ja niistä ei saatu tulosta ollenkaan. *M. kansasii* ja *M. chelonae* ajettiin yhden kerran, ja niistä saatiin oikea tulos. *M. parascrofulaceum* näytteitä ajettiin kolme, joista kahdelle ei saatu tulosta, ja yksi tunnistui väärin. *M. mucogenicum* ajettiin yhden kerran, ja se tunnistui oikein. *M. gordonae* näytteitä oli kaksi, joista toinen tunnistui oikein, ja toiselle ei saatu tulosta. *M. abscessus* näytettä oli yksi, ja se tunnistui oikein. *M. fortuitum* näytteitä oli kolme, joista kahdelle saatiin väärä tulos ja yksi ei tunnistunut ollenkaan. *M. lentiflavum* näytettä ajettiin kolme kertaa, joista saatiin yksi oikea tulos, yhdelle väärä tulos, ja yksi ei tunnistunut lainkaan. *M. avium* näytteistä yksi tunnistui oikein, ja kolme ei tunnistunut lainkaan. *M. africanum* näytteitä oli yksi, ja siitä saatiin väärä tulos. Kuudesta *M. tuberculosis* näytteestä kaikki tunnistuivat oikein. *M. chimaera* ajettiin yhden kerran, ja se tunnistui väärin.

2 µl näytemäärällä oikeita tuloksia saatiin 9 kpl (60 %), vääriä tuloksia 6 kpl (40 %) ja ei tulosta 0 kpl (0 %). Virhelauskeita ei tullut.



Kuvio 5. 7H11-maljalta MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat tulokset mykobateerilajien mukaan näytemäärän ollessa 2 µl.

Kuviossa 5 on kuvattu 7H11 elatusaineelta saadut tulokset 2 µl näytemäärällä MALDI-TOF MS -menetelmällä. 2 µl näytemäärällä *M. scrofulaceum*, *M. avium* ja *M. lentiflavum* näytteitä ajettiin kaikkia yksi, ja ne tunnistuivat oikein. *M. fortuitum* ja *M. parascrofulaceum* näytettä ajettiin yhden kerran, ja ne tunnistuivat väärin. Myös *M. africanum*, *M. Intracellulare* ja *M. simiae* näytteitä ajettiin yhden, ja kaikki tunnistuivat väärin. Kuudesta *M. tuberculosis* näytteestä kaikki tunnistuivat oikein. *M. chimaera* ajettiin yhden kerran, ja siitä saatiin väärä tulos.

6. Pohdinta

Opinnäytetyön tutkimuksen perusteella mykobakteereiden tunnistaminen MALDI-TOF MS -menetelmää käyttäen onnistui huonosti. Tutkimuksen yksi suurimmista haasteista oli mykobakteerikantojen eri kasvuajat. Osa mykobakteereista kasvaa nopeammin ja

osa hitaammin. Tutkimusta tehtiin vain kaksi viikkoa, joten on mahdollista, että osa mykobakteerikannoista ei ollut kasvanut vielä riittävästi, ja osa taas oli mahdollisesti ylikasvaneita.

Samankaltaisiin tuloksiin oli päädytty myös Huang, Lee, Tu ja Shin (2018) tutkimuksessa, jossa MGIT elatusaineesta tunnistettiin mykobakteereja MALDI-TOF MS -menetelmän avulla. Tutkimuksessa todetaan, että viljelmän ikä voi vaikuttaa MALDI-TOF MS -spektreihin. Kaikki nopeasti kasvaneet mykobakteerit tunnistettiin oikein, ilman minikäänlaista yhteyttä laitteen antamaan positiiviseen hälytykseen. Hitaasti kasvavissa mykobakteereissa korkeampi tunnistamisaste kuitenkin liittyi viljelyn pidempään kasvatusaikaan. Tutkimuksessa nopeasti kasvavat mykobakteerit tunnistettiin onnistuneesti ensimmäisen viikon aikana. Hitaasti kasvavat mykobakteerit tunnistuivat oikein 66,7 %, ja tunnistusvarmuus kasvoi, kun MGIT-liemet pidettiin huoneenlämpötilassa laitteen antamaan positiiviseen hälytykseen asti. Tutkimuksessa pääteltiin, että epäonnistuminen mykobakteerien tunnistamisessa MALDI-TOF:lla voi johtua näytteen riittämättömästä mykobakteerien määrästä.

Saamaamme heikkoon tulostasoon voi myös vaikuttaa liian vähäinen bakteerin määrä elatusaineella, kuten ylläolevassa tutkimuksessakin on todettu. Sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavainen oli yhteydessä mykobakteerikitin valmistajaan bioMérieuxiin, ja he tahollaan miettivät heikkoon tulostasoon syitä. Oikealla vortexilla olisi suuri merkitys mykobakteereiden inaktivoitumiseen ja tunnistuksen luotettavuuteen. Mykobakteerilaboratoriossa oli ohjeista poikkeava vortex. BioMérieuxin mukaan väärät tulokset voivat johtua myös kasvun vähäisestä määrästä, tai mahdollisesti elatusaineilla kasvavista muista bakteereista.

MGIT elatusaineelta mykobakteerit tunnistuivat huonoiten. Tutkimusvaiheessa teimme havaintoja siitä, että nestemäisestä elatusaineesta on vaikea nähdä, onko siellä bakteerikasvua. Tästä syystä tutkittavan mykobakteerin määrä ei välttämättä ollut riittävä tai optimaalinen. MGIT-putki näytti silmämääräisesti siltä, ettei siellä ollut kasvua. 7H11-maljalta kasvun määrää ja puhtautta oli helppo arvioida, koska maljalla kasvoi erillispesäkkeitä. Tältä elatusaineelta mykobakteerit tunnistuivatkin parhaiten. Irtopesäke oli helppo ottaa maljalta puhtaasti ilman elatusainejäämiä. Kaikki *M.tuberculosis* kannat tunnistuivat oikein sekä 1 µl, että 2 µl näytemäärällä. L-J-putken kasvusto oli hyvin niukkaa, jonka vuoksi siitä oli vaikea saada yksittäispesäkkeitä. Silmukkaan tarttui helposti ela-

tusainetta, koska silmukalla piti kaapia elatusaineen pintaa, jotta siihen saatiin bakteerimassaa. Tässä tuloksia voi olla sotkemassa myös kontaminanttikasvu tai mahdollisesti ylähengitysteissä oleva normaalifloora. Nokardioita ei tässä tutkimuksessa löytynyt, sillä mykobakteerit oli tunnistettu jo aikaisemmin. Nokardia saattaa löytyä sattumalöydöksenä viljely- ja värjäystutkimuksessa, koska se on myös haponkestävä niin kuin mykobakteerikin.

Mykobakteerien tunnistumiseen ei vaikuttanut näytelevylle pipetoitu näytemäärä. Näytteitä analysoitiin sekä 1 µl että 2 µl näytemäärillä. Koska kaikkia näytteitä ei ajettu molemmissa määrissä, oli tulosten tulkinta ja toisiinsa vertaaminen haastavaa. Joitakin näytteitä analysoitiin useaan kertaan, koska haluttiin selvittää, auttaisiko pidempi kasvatusaika oikean tuloksen saamiseen. Pidemmällä kasvatusajalla ei näyttänyt olevan merkitystä. MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamien tulosten perusteella potilasnäytteitä ei voida tämän tutkimuksen perusteella vastata luotettavasti, koska oikein tunnistuneiden mykobakteerien määrä ei ollut riittävä (taulukko 3).

Taulukko 3. MALDI-TOF MS analyysilaitteen antamat tulokset elatusaineittain prosentteina.

Elatusaine	Ajettujen spottien määrä (kpl)	Oikein (%)	Väärin (%)	Ei tulosta (%)
Löwenstein-Jensen (1 µl)	43	44	12	44
Löwenstein-Jensen (2 µl)	11	55	45	0
MGIT	26	15,4	11,5	73,1
7H11 (1 µl)	38	39,5	18,4	42,1
7H11 (2 µl)	15	60	40	0

Tutkimuksen perusteella ei pystytä sanomaan johtuuko alhainen tunnistumismäärä näytteiden eriaikaisista kasvuvaiheista, käsittelystä vai mykobakteereiden inaktivointikitistä. Tutkimuksessa käytettiin pakastettuja mykobakteerikantoja, joten pohdimme voisiko se olla syy huonoon tunnistamiseen. Jos tutkimus olisi tehty tuoreilla näytteillä olisi tulos voinut olla toinen.

6.1. Luotettavuus

Tutkimusta tehdessämme työskentelimme luotettavasti ja johdonmukaisesti ohjeita noudattaen. Kirjasimme ylös kaikki huomiomme elatusaineilla olevasta bakteerikasvuista, kasvun puutteesta ja mahdollisesta sekakasvusta. Kirjasimme kaikki saamamme tulokset Excel-taulukkoon ja tarkka kirjanpitoimme lisää tutkimuksen luotettavuutta. Tarvittaessa saimme apua ongelmatilanteisiin sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavaiselta, ja laboratorion henkilökunnalta. Kuvasimme opinnäytetyöraporttiin tarkasti työvaiheet. Lisäksi etsimme lähdekriittisesti tietoa niin kotimaisista, kuin ulkomaisista lähteistä. Lähdeviitteet on merkitty selkeästi.

Tutkimme näytteitä, joista on jo aiemmin tunnistettu mykobakteerilaji GenoType -menetelmällä. Vertasimme MALDI-TOF MS -menetelmällä saamiamme tuloksia aiemmin saattuihin tuloksiin. MALDI-TOF MS -menetelmällä saadut tulokset olivat osittain yhteneväisiä aiemman menetelmän kanssa, mutta tässä vaiheessa menetelmää ei voida vielä käyttää potilastulosten vastaamiseen.

6.2. Eettisyys

Suomen Bioanalytikkoliitto ry:n kliinisen laboratoriotyön eettisten periaatteiden mukaan bioanalytikko vastaa tulosten luotettavuudesta ja käsittelee kaikkea biologista näyttemateriaalia potilaan oikeuksia ja yksityisyyttä kunnioittaen (Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2006).

Tutkimuksessa työskenneltiin noudattaen bioanalytikon eettisiä ohjeita. Tutkimuksen luonne oli sen kaltainen, ettei siinä haastateltu ketään, eikä tutkimuksessa käytetty näytteisiin liittyviä potilaiden tunnistustietoja. Osa näytteistä oli potilaista eristettyjä, mutta näytteet käsiteltiin näytenumeroina koodattuna. Myöskään eettistä lupaa ei tarvittu. Opinnäytetyön tutkimukseen tarvittavat tarvikkeet menivät bakteriologian tarvikkeiluista ja kuuluivat näin perusmäärä-rahastoon. Lisäksi meitä sitoi vaitiolovelvollisuus. Lähteet merkittiin asianmukaisesti ja niitä ei ole plagioitu. Lisäksi käytössä oli Turnitin-plagioinnin tarkistustyökalu, jota hyödynnettiin niin opinnäytetyön suunnitelman kuin opinnäytetyön raportin kirjoitusvaiheessa.

6.3. Johtopäätökset

MALDI-TOF MS -menetelmällä ei tämän tutkimuksen perusteella voida tunnistaa mykobakteereita luotettavasti. Syynä voi olla esimerkiksi pakastetut mykobakteerikannat, mykobakteerien eri kasvuajat tai riittävän mykobakteerimassan saamisen haastavuus elatusaineelta inaktivoinnin yhteydessä.

Mykobakteerit tunnistuivat parhaiten 7H11-maljalta. Maljalla kasvusto näkyi selkeästi, joten saimme varmasti riittävästi bakteerimassaa tutkimukseen. L-J-putkessa sekä MGIT putkessa bakteerikasvusto ei ollut näkyvillä, joten bakteerimassan saaminen oli epävarmaa. Mykobakteerit tunnistuivat kaikilta elatusaineilta huonosti, joten tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa vaikuttaako elatusaine mykobakteerin tunnistamiseen.

MALDI-TOF MS -menetelmällä ei voida tällaisenaan korvata GenoType -menetelmää. Tulokset eivät olleet riittävän yhteneväisiä, tai tuloksia ei saatu ollenkaan. Mikäli Genotypesta on tarkoitus tulevaisuudessa siirtyä MALDI-TOF MS -menetelmään, voisi vastaavanlaisen tutkimuksen tehdä tuoreilla mykobakteeriviljelmillä.

6.4. Ammatillinen kasvu

Metropolia Ammattikorkeakoulun tavoitteena opinnäytetyöprosessille on, että opiskelija kehittää kykyjään ja valmiuksiaan toimia oman alansa asiantuntijatehtävissä. Tavoitteena on myös osata soveltaa jo opittua tietoa käytännön työssä. (Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma 2016.)

Opinnäytetyösuunnitelmaa tehdessämme tutustuimme mykobakteereihin, ja niiden aiheuttamiin sairauksiin eri lähteistä. Olimme opinnoissamme saaneet tietoa jo jonkin verran MALDI-TOF MS analyysilaitteesta, mutta pääsimme työskentelemään sillä ensimmäisen kerran vasta opinnäytetyötä tehdessämme. Pääsimme hyödyntämään myös koulussa opittua tietotaitoa bakteerien kanssa työskentelyssä.

Opimme paljon tiimityöskentelystä, turvalaboratoriotyöskentelystä ja opimme työskentelemään johdonmukaisesti. Opimme myös opinnäytetyöprosessin aikana raportoimaan saamamme tulokset ja opimme tarkastelemaan niitä.

Saimme ensimmäisenä päivänä kattavan perehdytyksen työhön. Kävimme englanninkieliset työohjeet ohjaajamme kanssa läpi, jonka jälkeen toimimme itsenäisesti. Saimme vastuuta riittävästi jo heti alusta alkaen, ja apua oli aina lähettyvillä, kun sitä tarvitsi. Kokoonnuimme säännöllisesti sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavaisen kanssa ja kävimme läpi mitä olimme tehneet ja minkälaisia tuloksia olimme saaneet. Pohdimme myös analyttisesti tuloksia, ja mistä syistä kaikille mykobakteereille ei saatu tunnistustulosta aikaiseksi MALDI-TOF MS -menetelmän avulla. Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi oli todella opettava ja ammatillisesti kasvattava.

Lähteet

- BD BBL™ MGIT™. Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 ml. Verkkodokumentti. [https://www.bd.com/en-uk/products/diagnostics-systems/identification-and-susceptibility-systems/mgit-\(mycobacteria-growth-indicator-tube\)-system](https://www.bd.com/en-uk/products/diagnostics-systems/identification-and-susceptibility-systems/mgit-(mycobacteria-growth-indicator-tube)-system). Luettu 7.9.2019.
- BD BBL™ Middlebrook 7H11//7H11 Selective Agar 2014. Verkkodokumentti. [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8801671\(03\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8801671(03).pdf). Luettu 7.9.2019.
- Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. 2017. Suomen Bioanalytikkoliitto ry. Verkkodokumentti. https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf. Luettu 12.9.2019.
- Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma 2016. Helsinki: Metropolia. Verkkodokumentti. <http://opinto-opas-ops.metropolia.fi/index.php/fi/88094/fi/70303/SXJ16S1/year/2016>>. Luettu 19.12.2018.
- Eskola, Jussi – Soini, Hanna 2004. Nykyaikainen mykobakteeridiagnostikka. Lääketieteellinen aikakusikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <https://www.duodecim-lehti.fi/lehti/2004/18/duo94522>. Luettu 31.12.2018.
- GenoType Mycobacterium CM 2016. Hain Lifescience GmbH. Verkkodokumentti. https://immunodiagnostic.fi/wp-content/uploads/GenoType-CM-V2_kit-insert.pdf. Luettu 25.10.2019.
- Huang, Tsi-Shu – Lee, Chia-Chien – Tu, Hui-Zin – Shin-Jung Lee, Susan 2018. Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. Plos One, A Peer-Reviewed Open Access Journal. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796708/>. Luettu 26.10.2019.
- Kulin, Milla 2018. Mykobakteerilaboratorion turvallisuusohjeet. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Palvelutuotanto, työturvallisuusohje.
- Lévesque, Simon – Dufresne, Philippe J. – Soualhine, Hafid – Domingo, Marc-Christian – Bekal, Sasjia – Levebvre, Birgitte – Tremblay, Cecile 2015. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. Plos One, A Peer-Reviewed Open Access Journal. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689555/>. Luettu 11.1.2019.
- Lumio, Jukka 2018. Tuberkuloosi. Terveyskirjasto Duodecim. Verkkodokumentti. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00611. Luettu 9.1.2019.
- Mykobakteeri, viljely ja värjäystutkimukset 2019. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <https://huslab.fi/ohjekirja/17411.html>. Luettu 19.1.2019.

Soini, Hanna – Liippo, Kari – Vasankari, Tuula 2010. Mykobakteerit. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki. 140–144.

Soini, Hanna – Liippo, Kari – Vasankari, Tuula 2010. Nokardiat. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki. 149–150.

Soini, Hanna – Vasankari, Tuula 2014. Monilääkeresistentti tuberkuloosi. Verkkodokumentti. <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2014/16/duo11782>. Luettu 26.10.2019.

Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. Infektiotaudit. Mykobakteeri 2019a. Verkkodokumentti. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/mykobakteeri>. Luettu 16.10.2019.

Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta 2019b. Verkkodokumentti. <https://www.thl.fi/ttr/gen/rpt/tilastot.html>. Luettu 16.10.2019.

van Belkum, Alex – Walker, Martin – Pincus, David – Cherrier, Jean-Philippe – Girard, Victoria 2017. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues?. *Annals of laboratory medicine*. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587819/>. Luettu 09.1.2019.

VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system. Biomérieux. Verkkodokumentti. <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-ms-0>. Luettu 26.12.2018.

VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT / VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT. Menetelmäohje. Biomérieux. 2016.

VITEK® MS. Reagents/Accessories. Biomérieux. Verkkodokumentti. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-ms-accessories-reagents>. Luettu 18.11.2018.

Vrioni, Georgia – Tsiamis, Constantinos – Oikonomidis, George – Theodoridou, Kalliopi – Kapsimali, Violeta – Tsakris, Athanasios 2018. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of translational medicine*. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6046294/>. Luettu 11.11.2018.

Vitek® MS Mycobacterium Kit -pakkauseloste

REF 415659 / 42156420294 C - en - 2016/10 **EN****VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT /
VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT****IVD**Sample processing method by protein extraction and inactivation for *Mycobacterium* and *Nocardia* identification.**SUMMARY AND EXPLANATION**

The VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT provides the reagents and consumables needed to process samples by protein extraction and inactivation for *Mycobacterium* and *Nocardia* identification using the VITEK® MS System.

To process samples for *Mycobacterium* from liquid media use the additional consumables provided in the VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT.

PRINCIPLE

The VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT method uses:

- ethanol and vials with glass beads to inactivate *Mycobacterium* and *Nocardia* by disrupting the cells
- formic acid and acetonitrile to complete the extraction of proteins.

CONTENT OF THE KIT

REF 415659	R1 = Ethanol* (ready to use, 70%) (2 x 25 mL)
	R2 = Formic acid** (ready to use, 70%) (4 x 0.5 mL)
	R3 = Acetonitrile*** (ready to use, 100%) (4 x 0.5 mL)
	RBT = 2 mL Round-bottomed tubes (2 x 50 units)
	BEAD = Tubes with glass beads (2 x 50 units)
REF 421564	CBT = 5 mL conical bottom tubes (2 x 50 units)
	WIPE = 250 absorbent pads with protective backing (wipes)

* Signal word: DANGER

**Hazard statement**

H225: Highly flammable liquid and vapour.

H319: Causes serious eye irritation.

Precautionary statements

P210: Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P403 + P235: Store in a well-ventilated place. Keep cool.

** Signal word: DANGER

**Hazard statement**

H314: Causes severe skin burns and eye damage.

Precautionary statements

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P301+P330+ P331: IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting.

P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P303+P361+P353: IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.

*** Signal word: DANGER

**Hazard statements**

H225: Highly flammable liquid and vapour.

H302+H312+H332: Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.

H319: Causes serious eye irritation.

Precautionary statements

P210: Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of water.

P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

For further information, consult the Safety Data Sheet.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 1 µL inoculating sterile loops.
- Cytology brush (for *Nocardia* species).
- Vortex-type mixer with adaptor or bead beater-type homogenizer.
- Vortex-type mixer [maximum speed].
- Swing bucket centrifuge 3000 g.
- 15 mL adapter.
- Microcentrifuge [10000 - 14000 g].
- VITEK® MS-DS.
- VITEK® MS-CHCA matrix.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- For professional use only.
- Special precautions must be taken when using these reagents. Refer to the hazard statements "H" and precautionary statements "P" indicated above.
- For US Only: Caution: US Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner.
- All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "CLSI[®] M29-A, Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Current revision". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Latest edition", or to the regulations currently in use in each country.
- Do not use the VITEK[®] MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT after the expiration date.
- Before use, check that the cardboard box is intact.
- The VITEK[®] MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT reagents contain a high concentration of solvents. It is recommended to close all packaging after dispensing to avoid evaporation.
- The absorbent pads with protective backing (WIPE) contain natural rubber latex.

STORAGE CONDITIONS

- Before use, store the VITEK[®] MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT at +2°C/+25°C.
- After opening, the reagents in the VITEK[®] MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT can be kept for up to 4 weeks at room temperature.

SPECIMENS

Refer to the VITEK[®] MS Workflow User Manual and to the VITEK[®] MS Knowledge Base.

INSTRUCTIONS FOR USE

All manipulations of *Mycobacterium* must be performed using Biosafety Level 3 practices before the inactivation of the sample.

Solid medium

1. For each organism to be tested, transfer 0.5 mL of R1 to a tube with glass beads (BEAD).
2. For *Mycobacterium*, use a 1 µL loop to pick up and transfer one loopful of the test organism to the tube and then cap securely.
For *Nocardia*, use a 1 µL loop (one loopful) or a curved cytology brush (in case of embedded strain) to gently pick up and transfer material from the medium to the tube and then cap securely.

Note: Be careful not to pick any agar when picking up the colonies.

3. Use a vortex-type mixer with adaptor (at maximum speed) to disrupt the cells for 15 minutes, or a bead beater-type homogenizer for 5 minutes.
4. Remove from the mixer or the bead beater-type homogenizer and incubate the tube at room temperature for 10 minutes to complete the inactivation.

Note: The following steps can be performed outside the Biosafety Level 3 laboratory.

5. Mix with a vortex-type mixer for 5 to 10 seconds and immediately transfer suspension into an empty 2 mL round-bottomed tube (RBT) using a pipette and avoiding transfer of any glass beads. Discard the pipette tip.
6. Centrifuge sample for 2 minutes at a speed between 10,000 and 14,000 g to create a pellet.
Note: Before the centrifugation steps, note the position of the expected pellet. This could be helpful in case of low intensity pellet.
7. Discard all the R1 supernatant using a pipette.
8. Add 10 µL of R2 to the pellet. Resuspend by aspiration/dispensing using a pipette until the pellet is uniformly dispersed, or directly with a vortex-type mixer.
9. Add 10 µL of R3 and mix using a vortex-type mixer.
10. Centrifuge for 2 minutes at a speed between 10,000 and 14,000 g to create a pellet.
11. For each organism to be tested, immediately transfer 1 µL of the supernatant onto the target slide spots.
12. Allow each spot to dry completely.
13. Add 1 µL of VITEK[®] MS-CHCA matrix to each target slide spot using a new pipette tip after each addition of matrix. Allow matrix to dry.

IMPORTANT: Once the VITEK[®] MS-DS target slide is prepared, it must be tested within 72 hours. Before spectra acquisition, it must be stored at room temperature in its original packaging.

Liquid medium (for *Mycobacterium* only)

Note: Test positive BacT/ALERT[®] MP bottles, BACTEC[™] MGIT[™] 960 tubes (BD), or VersaTREK[™] Myco Media (Thermo Fisher) bottles between 24 and 72 hours post-positivity as determined by the detection instrument. If bottles or tubes are removed from instrument for other tests, continue to incubate the bottles or tubes at +35°C/+37°C in an incubator until they have been incubated for 24-72 hours post-positivity.

1. Mix the bottle or the tube using a vortex-type mixer for 5 to 10 seconds and immediately aseptically transfer 3.0 mL of medium from the culture bottle into the 5 mL CBT.

Notes:

- When testing BacT/ALERT[®] MP bottles, use an 18 G needle or larger for aspiration of sample.
 - After the initial aliquot is removed, place the positive bottle or tube at +35°C/+37°C in an incubator for further testing, if needed.
2. Centrifuge sample for 10 minutes at 3,000 g using a swing bucket centrifuge with a 15 mL adapter to create a pellet.

3. Decant medium into a waste container and completely blot dry onto an absorbent pad with protective backing (WIPE). Discard pad after use, avoiding touching the absorbent surface.
4. Add 500 µL of R1 to the 5 mL CBT and use a pipette to gently mix up and down to resuspend the pellet.
5. Transfer to a tube with glass beads (BEAD).
6. Use a vortex-type mixer with adaptor (at maximum speed) to disrupt the cells for 15 minutes or a bead beater-type homogenizer for 5 minutes.
7. Remove from the mixer or the bead beater-type homogenizer and incubate the tube at room temperature for 10 minutes to complete the inactivation.

Note: The following steps can be performed out of a Biosafety Level 3 Cabinet.
8. Mix with a vortex-type mixer for 5 to 10 seconds and immediately transfer suspension into an empty 2 mL round-bottomed tube (RBT) using a pipette and avoiding transfer of any glass beads. Discard the pipette tip.
9. Centrifuge sample for 2 minutes at a minimum speed of 14,000 g to create a pellet.

Note: Before the centrifugation steps, note the position of the expected pellet. This could be helpful in case of low intensity pellet.
10. Discard all the R1 supernatant using a pipette.
11. Add 10 µL of R2 to the pellet. Resuspend by aspiration/dispensing using a pipette until the pellet is uniformly dispersed, or directly with a vortex-type mixer.

Note: If pellet is not visible, wash sides of tube with R2 to ensure re-suspension.
12. Add 10 µL of R3 and mix using a vortex-type mixer.
13. Centrifuge for 2 minutes at a minimum speed of 14,000 g.
14. For each organism to be tested, immediately transfer 1 µL of the supernatant onto the target slide spots.
15. Allow each spot to dry completely.

Note: If the spot is not completely dry before addition of VITEK® MS-CHCA, optimal crystallization of sample may not be achieved and could potentially interfere with VITEK® MS results (No Identification).
16. Add 1 µL of VITEK® MS-CHCA matrix to each target slide spot using a new pipette tip after each addition of matrix. Allow matrix to dry.

IMPORTANT: Once the VITEK® MS-DS target slide is prepared, it must be tested within 72 hours. Before spectra acquisition, it must be stored at room temperature in its original packaging.

For the further steps on processing the target slide on the VITEK® MS, refer to the VITEK® MS Workflow User Manual.

QUALITY CONTROL

Quality control is systematically performed on the VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT at various stages throughout the manufacturing process.

The results of the batch by batch quality control are provided on the quality control certificate available on the technical library that can be accessed via our corporate website (www.biomerieux.com).

For those users who wish to perform their own Quality Control tests with the kit, it is preferable to use one of the following strains:

- ATCC® 19420™ *Mycobacterium smegmatis*
or
- ATCC® 3308™ *Nocardia farcinica*

- Negative test:

Spot 0.5 µL R2 and 0.5 µL R3 directly on a target slide.

Allow the spot to dry completely.

Add 1 µL of VITEK® MS-CHCA matrix.

The criterion for quality control conformity is identification to a species level with a high level of confidence for the QC strain and no identification for the negative test.

It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any applicable local regulations.

PERFORMANCE

Refer to the VITEK® MS Knowledge Base.











WASTE DISPOSAL

Dispose of unused reagents following procedures for hazardous chemical waste.

Dispose of all used reagents as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious products or hazardous chemical waste.

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

INDEX OF SYMBOLS

Symbol	Meaning
	Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Manufacturer
	Temperature limit
	Use by date
	Batch code
	Consult Instructions for Use
	Contains or presence of natural rubber latex
	For US Only : Caution : US Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner
	Date of manufacture

LIMITED WARRANTY

bioMérieux warrants the performance of the product for its stated intended use provided that all procedures for usage, storage and handling, shelf life (when applicable), and precautions are strictly followed as detailed in the instructions for use (IFU).

Except as expressly set forth above, bioMérieux hereby disclaims all warranties, including any implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose or use, and disclaims all liability, whether direct, indirect or consequential, for any use of the reagent, software, instrument and disposables (the "System") other than as set forth in the IFU.

REVISION HISTORY

Change type categories

N/A	Not applicable (First publication)
Correction	Correction of documentation anomalies
Technical change	Addition, revision and/or removal of information related to the product
Administrative	Implementation of non-technical changes noticeable to the user
Note:	<i>Minor typographical, grammar, and formatting changes are not included in the revision history.</i>

Release date	Part Number	Change Type	Change Summary
2015/05	20894B	N/A	N/A
2016/10	20894C	Technical change	Added VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT SUMMARY AND EXPLANATION / CONTENT OF THE KIT / REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED / WARNINGS AND PRECAUTIONS / INSTRUCTIONS FOR USE
		Administrative	STORAGE CONDITIONS / INDEX OF SYMBOLS / LIMITED WARRANTY

BIOMERIEUX, the blue logo, Bact/ALERT and VITEK MS are used, pending and/or registered trademarks belonging to bioMérieux, or one of its subsidiaries, or one of its companies.

CLSI is a trademark belonging to Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

Any other name or trademark is the property of its respective owner.



 bioMérieux SA
378 Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Étoile - France

673 620 399 RCS LYON
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com



