



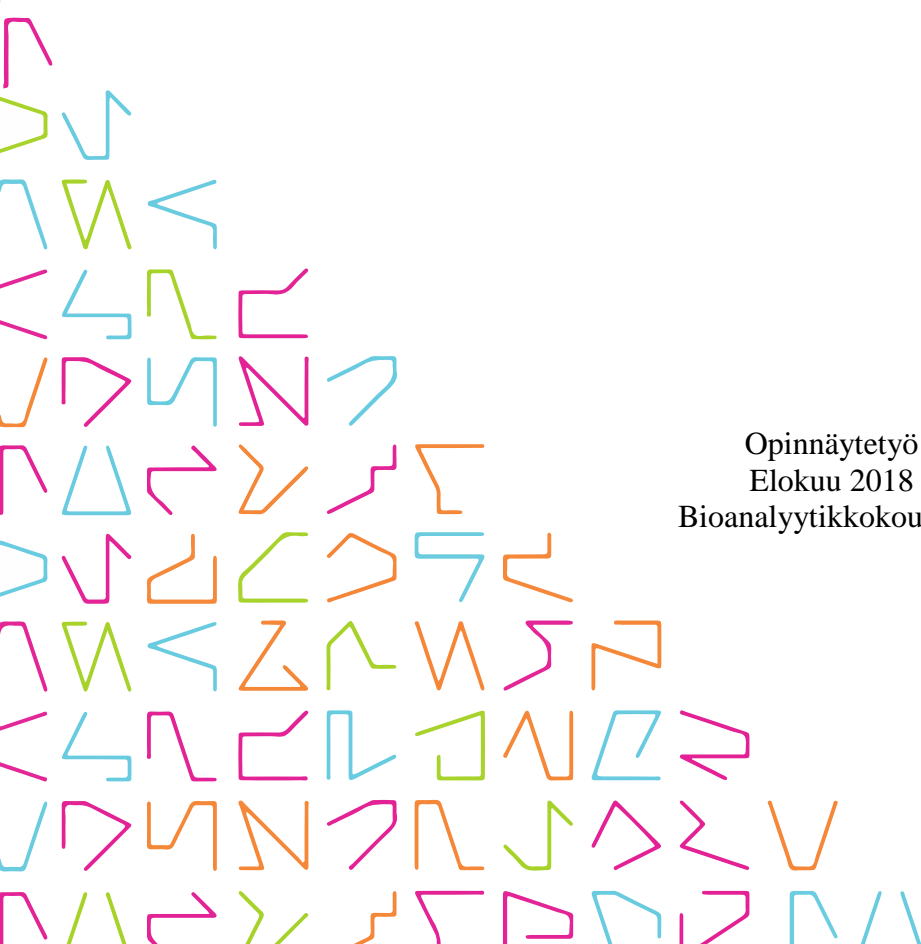
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

RIHMASIENTEN TUNNISTUS VITEK® MS- LAITTEELLA

Emmi Rannikko

Milja Sillanaukee

Opinnäytetyö
Elokuu 2018
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

RANNIKKO EMMI & SILLANAUKKEE MILJA:
Rihmasienten tunnistus VITEK MS-laitteella

Opinnäytetyö 62 sivua, joista liitteitä 1 sivu
Elokuu 2018

Dermatofyytit ja homeet eli rihmasienet aiheuttavat pinnallisia sieni-infektioita ihon ja kynsien sarveisaineessa. Tämän lisäksi homeet aiheuttavat myös syviä, invasoivia ja jopa kuolemaan johtavia infektioita immuunipuutteisilla potilailla. Diagnoosinnan nopeudella on suuri merkitys hoidon onnistumisessa. Sieniä tunnistetaan makroskooppisesti viljelyiltä maljoilta, joista tehdään tarvittaessa jatkoviljelmiä. Makroskooppisen tunnistuksen lisäksi apuna käytetään tarvittaessa värjäyksiä ja mikroskopointia. Nämä käytössä olevat rihmasienten tunnistusmenetelmät toimivat opinnäytetyön referenssimenetelmänä.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa Fimlab laboratoriot Oy:n Tampereen mikrobiologian yksikölle Biomeriëuxin Vitek MS Mould –reagenssipakkauksen esikäsitelymenetelmän toimivuudesta ja siitä, nopeuttaako sen käyttö rihmasienten tunnistusta niin, että se kannattaa ottaa käyttöön uutena tutkimusmenetelmänä. Tutkimusotoksen tavoitteena oli sata analysoitua näytettä. Tarkoituksena oli koestaa uusi rihmasienille tarkoitettu reagenssipakkaus VITEK MALDI-TOF massaspektrometrille.

Tässä opinnäytetyönä tehdyssä tutkimuksessa koestettiin uusi Biomeriëuxin rihmasienille tarkoitettu esikäsitelymenetelmän reagenssipakkaus VITEK® MS MALDI TOF-laitteelle. Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian sienilaboratoriossa oli varattu potilasnäytteitä tätä tutkimusta varten. Näytteet käsiteltiin reagenssipakkauksen avulla ja analysointi suoritettiin VITEK® MS-laitteella. Näitä analyysituloksia verrattiin referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin ja niiden yhteneväisyyttä tutkittiin Excel-tilukkolaskentaohjelmaa apuna käyttäen.

Tutkimuksessa oli mukana 68 rihmasieninäytettä, joista tulokset saatiin 49 näytteelle eli 72 prosentille kokonaisnäyttemäärästä. 49:stä onnistuneesti analysoidusta näytteestä 42 näytteen tutkimustulokset VITEK® MS-laitteella ja käytössä olevilla sienidiagnostiikan menetelmillä olivat yhteneväiset. Tulokset olivat siis 86 prosenttisesti yhteneväisiä. Tutkimuksessa havaittiin myös, että rihmasienten kasvunvaihe vaikuttaa VITEK® MS-laitteella tehtyjen analyysien onnistumiseen.

Asiasanat: Rihmasieni, diagnostiikka, koestus, massaspektrometri

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory

RANNIKKO EMMI & SILLANAUKKEE MILJA:
The VITEK ® MS Identification of filamentous Fungi

Bachelor's thesis 62 pages, appendices 1 pages
August 2018

Dermatophytes and molds cause superficial fungal infections in the skin- and nail keratin. Molds can also cause severe deep invasive infections for patients with immune deprivation. Filamentous fungi are identified macroscopically from cultures and microscopically with the help of staining methods.

The objective of this study was to provide information for Fimlab Laboratoriot Oy about the functionality of the Biomérieux Vitek ® MS Mold reagent kit pre-treatment method. The study intended to examine whether the method hastens the identification of filamentous fungi to such an extent that it could be adopted as a worthy new research method.

In this study a new Biomérieux preprocessing method for filamentous fungi was validated for VITEK ® MS MALDI TOF mass spectrometer. Samples were processed with a preprocessing reagent kit and VITEK ® MS was used for analysis. Analyzation results were compared to results gained with the reference methods.

There were 68 samples in the study, all of them containing a growing filamentous fungi. Test results were obtained for 49 samples, which equals to 72 percent of the samples. Out of 49 successfully mass spectrometry analysed samples, 42 had identical results with the reference methods. Therefore 86 percent of the results were identical. In this study it was also noticed, that the filamentous fungus stage of growth influences the success rate of the analyses performed with VITEK MS.

Key words: Filamentous fungi, diagnostics, validation, mass spectrometry

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	RIHMASIENET	7
2.1	Dermatofyytit ja niiden aiheuttamat infektiot.....	7
2.1.1	Trichophyton	7
2.1.2	Microsporum	8
2.1.3	Epidermophyton floccosum	9
2.1.4	Dermatofyyttien aiheuttamat infektiot	10
2.1.4.1.	Jalkasilsa	10
2.1.4.2.	Kynsisilsa	11
2.1.4.3.	Nivussilsa	12
2.1.4.4.	Hiuspohjan silsa	13
2.1.4.5.	Vartalon silsa.....	14
2.1.4.6.	Partasilsa	14
2.1.4.7.	Kämmenen silsa	15
2.2	Homeet ja niiden aiheuttamat infektiot.....	15
2.2.1	Aspergillus	15
2.2.2	Scopulariopsis	17
2.2.3	Fusarium.....	18
2.2.4	Scedosporium.....	19
2.2.5	Homeiden aiheuttamat infektiot.....	20
2.2.5.1.	Allerginen bronkopulmonaalinen aspergilloosi	21
2.2.5.2.	Aspergillooma	22
2.2.5.3.	Invasiivinen aspergilloosi	22
2.2.5.4.	Nenänielun, korvien ja silmien infektiot.....	23
3	RIHMASIENTEN TUNNISTUSMENETELMÄT	25
3.1	Näytteenotto, säilytys, kuljetus	25
3.2	Rihmasienten laboratoriodiagnostiikka	26
3.2.1	Natiivitutkimus.....	26
3.2.2	Viljelymaljat.....	27
3.2.3	Viljely.....	30
3.2.4	Punakoe	31
3.2.5	Peruna dekstroosi agar -putki.....	31
3.2.6	Homeiden mikroviljely	32
3.2.7	Makroskooppinen ja mikroskooppinen tunnistaminen	33
3.3	VITEK MS MALDI-TOF.....	34
3.3.1	Tomintaperiaate.....	34

3.3.2	Rihmasienten esikäsittely	35
4	TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT	36
5	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	37
6	RIHMASIEN TEN TUNNISTUSMENETELMÄN KOESTUS VITEK MS- laitteelle	38
6.1	Suunnitteluvaihe	38
6.2	Toteutusvaihe	38
6.2.1	Näytteiden esikäsittely	38
6.2.2	Näytelevyn valmistaminen	40
6.2.3	Näytteiden ja tulosten analysointi	41
6.3	Aseptiikka ja työturvallisuus	42
7	TULOKSET	44
7.1	Analyysitulokset ja näytteiden kasvuajan vaikutus	44
7.2	Analyysitulosten yhteneväisyys referenssimenetelmän kanssa	46
7.3	Esikäsittelymenetelmän käyttökelpoisuus	46
8	POHDINTA	49
8.1	Tutkimuksen käytännön suoritus	49
8.2	Tutkimusaineisto	50
8.3	Eettisyys ja luotettavuus	51
8.4	Sienilaboratorion henkilökunta	51
8.5	Aikaisemmat tutkimukset	52
8.6	Yhteenveto	53
	LÄHTEET	55
	KUVALÄHTEET	61
	LIITTEET	62
	Liite 1. Tulostaulukko	63

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena on koestaa VITEK® MS MALDI TOF massaspektrometrille rihmasienten esikäsitelymenetelmän reagenssipakkaus Biomeri ux Vitek MS Mould kit. Työ tehd n Fimlab laboratoriot Oy:n Tampereen mikrobiologian yksikölle. Rihmasieni  ei ole pystytty vielä aikaisemmin VITEK® MS laitteella tunnistamaan. Mikäli esik sitelymenetelm  saadaan toimivaksi ja kannattavaksi, potilaat tulevat saamaan tutkimustulokset nopeammin ja hoitokin kyet n aloittamaan aikaisemmin.

Dermatofyytit eli silsasienet ovat yleisimpiä kehon pinnallisten sieni-infektioiden aiheuttajia. Homesienten itiöitä on normaalisti kaikkialla ympäristössä ja ne voivat aiheuttaa allergisia oireita p astess n limakalvoille. Immuunipuutteisilla potilailla homesienet voivat aiheuttaa kuolemaan johtavia infektiota. On siis tärkeä, että sieni-infektiot pysyt n tunnistamaan laboratoriossa tehokkaasti ja nopeasti. (Käypähoito suositus 2010, a; Hedman ym. 2010, 301, 315.)

Rihmasienin ytteet viljell n selektiivisille agarmaljoille, joita kasvatetaan noin 2-4 viikkoa riippuen sienen kasvuominaisuuksista. Pesäkkeet tunnistetaan maljoilta makroskooppisesti, tarvittaessa voidaan tehdä värjäys ja tunnistaa sieni mikroskooppisen tarkastelun avulla. (Fimlab ohjekirja. 2017; Huslab ohjekirja. 2017; Korhonen 2017.) VITEK® MS MALDI-TOF on automatisoitu massaspektrometriaan perustuva, mikrobien tunnistukseen tarkoitettu systeemi, joka antaa tutkimusvastauksen mikrobin lajin tai suvun tasolla. Tutkimusvastaus saadaan nopeammin verrattaessa muihin rihmasienidiagnostiikan menetelmiin. (VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system.)

Tutkimusaineistona tässä opinnäytetyössä on 68 potilaan VITEK® MS-laitteella tutkittujen sienin ytteiden tulokset. Työssä tullaan vertailemaan VITEK MS-laitteella saatuja tuloksia Fimlabin sienilaboratorion morfologisesti ja mikroskopoiden saatuihin tunnistustuloksiin. Tutkimuksessa käytössä ollut VITEK MS V3 tietokanta pitää sisällön 1046 eri organismia, sisältäen bakteereita, homeita sekä dermatofyyttej  (VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system).

2 RIIHMASIENET

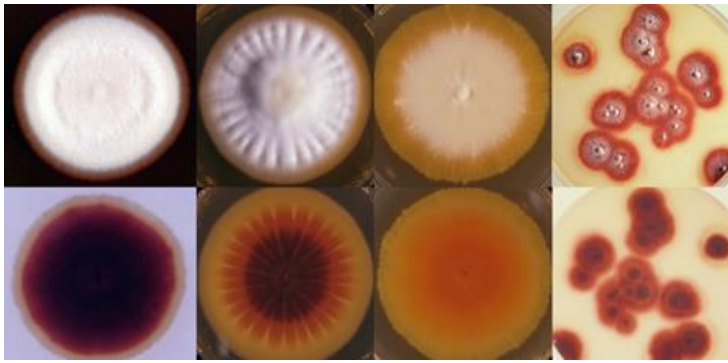
2.1 Dermatofyytit ja niiden aiheuttamat infektiot

Infektioita aiheuttavat dermatofyytit eli silsasienet jaotellaan kolmeen luokkaan: *Trichophyton*, *Microsporum* ja *Epidermophyton*. Eri sienilajien aiheuttamien tautien vaikeusaste ja epidemiologia vaihtelevat niiden ominaisuuksien mukaan. Dermatofyytit jaotellaan ryhmiin myös niiden aiheuttamien infektioiden tarttumistapojen mukaan antropofiilisiin, eli ihmisestä toiseen tarttuva, zoofiilisiin, eli eläimestä ihmiseen tarttuva ja geofiilisiin, eli maaperästä ihmiseen tarttuva. (Hedman ym 2010, 301) (Kauffman & Mandell 2007, 217.)

Dermatofyytit saattavat tuottaa konidioita, jotka havaitaan mikroskooppisella tarkastelulla. Konidiat ovat suvuttomasti lisääntyviä sienten itiöitä. Tavallisesti ne kasvavat sienirihmaston päästä tai sivulta, mutta rihmastossa voi olla myös konidiofori, joka on erilaistunut kuroumaitiöitä tuottava rakenne sienirihmastossa. Itiöt kuroutuvat irti konidioforista, kun ne ovat kypsyneet. Konidiat ovat hyvin erilaisia sienilajista riippuen ja niiden väri, muoto ja rakenne vaihtelevat. Suuria konidioita kutsutaan makrokonidioiksi ja pieniä mikrokonidioiksi. (Rogers 2008; Tieteen termipankki, konidiofori.)

2.1.1 *Trichophyton*

Trichophyton sukuun kuuluu kuusitoista eri lajia, joista yleisimmät kliinisesti merkittävät ovat *Trichophyton rubrum*, *violaceum*, *mentagrophytes*, *interdigitale* ja *tonsurans*. *Trichophytonin* pesäkkeet ovat vahamaisia tai pumpulimaisia, väriltään valkoisia, punaisia, vaaleanpunaisia, kerman tai vaaleanruskean värisiä. Agarin alapuolelta pesäkkeet voivat olla värittömiä, keltaisia, kellanruskeita, vaalean- tai viininpunaisia riippuen kasvustosta ja lajista (Kuva 1) Mikroskooppisesti tarkasteltuna makrokonidiat ovat kaksi tai useampisoluisia, lasimaisia ohut- ja sileäseinäisiä, lieriön tai sikarin muotoisia. Mikrokonidiat ovat näytteessä hallitsevia ja muodoltaan ovaaleja, sileitä, lasimaisia ja ohutseinäisiä yksisoluisia rakenteita (Kuva 2 & 3). (Ellis & Kidd. *Trichophyton*; De Hoog ym. 2000, 954.)



Kuva 1. *T. rubrumin* kasvu keltaista pigmenttiä vahvistavalla lactrimel-agarilla ja punaista pigmenttiä vahvistavalla mykobiottisella agarilla (Kuva: Ellis & Kidd)



Kuva 2. *T. rubrumin* makrokonidia (Kuva: Ellis & Kidd)



Kuva 3. *T. rubrumin* makrokonidiat (Kuva: Ellis & Kidd)

2.1.2 *Microsporium*

Microsporium sukuun kuuluu nykyään kolme lajia, jotka ovat *Microsporium audouinii*, *canis ja ferrugineum*. Aiemmin *Microsporium* sukuun on kuulunut muitakin geo- ja zoofiilisiä lajeja, jotka on sittemmin siirretty *Lophophyton*, *Nannizzia ja Paraphyton* sukuihin kuuluviksi. *Microsporumin* pesäkkeet ovat puuterimaisen pumpulisia ja väriltään valkoisia, kellertäviä tai lohen punaisia. Agarin alapuolelta pesäkkeiden väritys on kermanvalkoinen tai ruskea (Kuva 5). Makrokonidiat esiintyvät yleensä ryhmittäin. Niissä on ohut tai paksu seinämä ja ne ovat piikkikäitä ja karkeita värttinän tai sikarin muotoisia (Kuva 4). Mikrokonidiat esiintyvät yksittäisinä ja ne ovat lasimaisia, sileä- ja ohutseinäisiä sekä ovaalinmuotoisia ulkomuodoltaan. (Ellis & Kidd. *Microsporium*; De Hoog ym. 2000, 736.)



Kuva 4. *M. caniksen* makrokoni-
diat (Kuva: Ellis & Kidd)



Kuva 5. *M. canis* peruna-dekstroo siagarilla
(Kuva: Ellis & Kidd)

2.1.3 *Epidermophyton floccosum*

Epidermophyton floccosum kuuluu antropofiilisiin dermatofyytteihin. Se aiheuttaa infek-
tioita jaloissa (*tinea pedis*), nivusissa (*tinea curis*), käsien ja jalkojen iholla (*tinea corpo-
ris*) sekä kynsissä (*tinea onychomycosis*). *E. floccosumin* pesäkkeet ovat poimuttuneita,
samettisia, joskus puuterimaisia, huopamaisia tai villaisia ja väriltään ne ovat keltaisia,
rusehtavia tai okran värisiä. Pesäkkeet muuttuvat nopeasti valkoiseksi ja hiutalemaiseksi.
Agarin alapuolelta pesäkkeet ovat väriltään syvän kellanruskeita. Makrokoniidiat esiinty-
vät 2-5 solun ryhmissä, ne ovat sileä- ja ohutseinäisiä mailan muotoisia, eli ne ovat pak-
sumpia päästä ja ohuempia keskeltä (Kuva 6). Klamydosporit (Kuva 7) eli yksisoluiset
paksuseinäiset sisäsyntyiset suvuttomat kestoitiöt ovat yleisiä pidempään kasvaneissa vil-
jelmissä. (Ellis & Kidd. *Epidermophyton floccosum*; De Hoog ym. 2000, 642; Tieteen
termipankki, klamydospori.)



Kuva 6. *E. floccosumin* makrokoniidiat
(Kuva: Ellis & Kidd)



Kuva 7. *E. floccosumin* klamydosporit
(Kuva: Ellis & Kidd)

2.1.4 Dermatofyyttien aiheuttamat infektiot

Dermatofyytit aiheuttavat tyypillisesti pinnallisia infektioita sarveisaineessa eli ihon sarveiskerroksessa, kynsissä ja hiuksissa, mutta infektio voi myös levitä syvälle hiuspohjan tai parranalueen karvatuppeen aiheuttaen syvän märkäisen infektion. Dermatofyyttien aiheuttamaa silsainfektiota kutsutaan tineaksi. Jotta dermatofyytti voi tunkeutua sarveisaineeseen, täytyy sen ensin tarttua isäntäeliöstä toiseen itiöiden avulla. Sen jälkeen se tarttuu keratinosyytteihin, eli ihon sarveiskerroksen soluihin, tämä kestää noin 1-2 tuntia. Tartuttuaan keratinosyytteihin dermatofyytti alkaa itää ja tuottaa proteiineja pilkkovia entsyymejä, proteaaseja. Näiden proteaasien tuotanto ja toiminta saavat aikaan elimistön puolustusreaktion ja infektioalueelle syntyy inflammaatio eli tulehdus. (Hedman ym. 2010, 301; Kauffman ym 2007, 218.)

Infektoituneella iholla nähdään usein eri asteista akantoosia, eli ihon tummumista ja paksuuntumista, hyperkeratoosia, eli ihon sarveiskerroksen paksuuntumista, mikä voi aiheuttaa ihon hilseilyä ja halkeilua, epidermoksen turvotusta tai parakeratoosia. Mikäli näitä oireita havaitaan, on kehon immuunivaste usein lievä ja mononukleaarisesti vallitseva. Jos infektio ylettyy ihon syvempiin kerroksiin, on se usein märkäinen ja immuunipuolustuksesta vastaa tällöin usein granulositytit. Lisäksi myös eosinofiilit saattavat osallistua infektion torjuntaan. Taudinaiheuttaja löydetään tavallisesti ihon uloimmasta- eli sarveiskerroksesta. (Larone 2011. 42.)

2.1.4.1. Jalkasilsa

Jalkasilsa eli *tinea pedis* on yleisin esiintyvä dermatofyyttien aiheuttama infektio. Jalkasilsan muodoista taas yleisimmät ovat varvasvälisilsa ja jalkaterän silsa. Varvasvälisilsa on useimmiten neljännen ja viidennen varpaan välissä ja sen oireina ovat kutina, paha haju, hilseily, ihorikot, vaaleat katteet, rakkulat ja reuna-alueiden punoitus, kuten kuvassa 8. Kuvassa 9 on varvasvälisilsa, jossa on myös bakteerin aiheuttama infektio. Infektio voi levitä myös muihin varvasväleihin, kynsiin, jalkapöytään tai -pohjaan. Varvasvälisilsainfektiota hoidetaan ensisijaisesti 1-4 viikkoa kestäväällä paikallishoidolla. Mikäli varvasvälisilsainfektiota ei hoideta, saattaa infektioalueelle muodostua hyperkeratoottinen tulppa tai kivulias pehmeä känsä, joka olisi hyvä poistaa kirurgisesti. (Hedman ym. 2010, 302-303; Kauffman ym. 2007, 219.)

Jalkaterän silsainfektio oireilee pitkäaikaisena hilseilynä jalkapohjan, kantapään ja jalkaterän sivujen alueella, myös ihorakkuloita voi ilmaantua. Oireiden ilmentymisalueiden vuoksi jalkaterän silsaa kutsutaan myös mokkasiinisilaksi. Jalkaterän silsa voi levitä myös kämmeniin ja sormiväleihin. Jalkaterän silsaa hoidetaan sisäisellä sienilääkityksellä 1-4 viikon ajan. Geneettinen taipumus jalkasilsaan voi aiheuttaa uusintainfektioita. Jalkasilsainfektion aiheuttajia ovat yleisimpänä *T. rubrum* sekä hieman vähemmän yleisinä *T. mentagrophytes* ja *E. floccosum*. (Hedman ym. 2010, 302-303; Käypähoito 2010, a.)



Kuva 8. Varvasvälisilsa
(Kuva: Suhonen Raimo)



Kuva 9. Varvasvälisilsa
(Kuva: Suhonen Raimo)

2.1.4.2. Kynsisilsa

Kynsisilsa eli *tinea unguium* on erittäin yleinen ja sitä esiintyy 3 prosentilla väestöstä. Useimmiten infektiota löydetään varpaiden kynsissä. Kynsisilsa saattaa esiintyä myös sormien kynsissä, mutta se on erittäin harvinaista. Altistavana tekijänä ovat urheiluun liittyvä kynnen vaurioituminen ja ikä. Kynsisiltaa voi olla joko yhdessä tai useammassa kynnessä. Tavallisimmin silsa alkaa kynnen sivustasta tai sen kärjestä ja etenee kynnen tyveä kohti ruskeana tai kellertävänä värimuutoksena, kuten kuvassa 10. Infektion leviessä kynsipedissä kynnen alla kynnenalus muuttuu hyperkeratoottiseksi ja lopulta koko kynsi vaurioituu (Kuva 11). Kynsientä hoidetaan sisäisellä sienilääkityksellä. Yleisimmät kynsisilsan aiheuttajat ovat *T. rubrum* (90 % tapauksista) ja *T. metagrophytes*. (Hedman ym. 2010, 303; Kauffman ym. 2007, 224.)



Kuva 10. Kynsisilsa varpaan
kynnessä
(Kuva: Suhonen Raimo)



Kuva 11. Edennyt kynsisilsainfektio varpaan
kynnessä
(Kuva: Suhonen Raimo)

2.1.4.3. Nivussilsa

Nivussilsa eli *tinea cruris* esiintyy yleisimmin lämpimässä ilmastossa ja tropiikissa. Useimmiten sitä tavataan miehillä etenkin puolustusvoimissa. Infektio alkaa toisesta nivusesta ja alkaa levitä laajemmalle alueelle. Nivussilsan oireina ovat vallireunaiset punottavat hilseilevät vähitellen kasvavat ihomuutokset (Kuva 12), jotka alkavat parantua niiden keskustasta. Ihomuutokset voivat levitä niin, että niistä muodostuu yhtenäinen alue reiden, pakarän ja välilihan seudulle tai jopa vielä suuremmalle alueelle. Hoitona nivussilsan lievissä tapauksissa käytetään paikallista sienilääkitystä 1-2 viikon ajan. Mikäli infektio on levinnyt laajalle, käytetään lisäksi sisäistä sienilääkitystä 1-4 viikon ajan. Tartunta on yleensä saatu omasta jalkaterästä tai varvasväleistä, joten yleisimmät nivussilsan taudinaiheuttajat ovat samat, kuin jalkasilsan aiheuttajat, eli *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ja *E. floccosum*. (Hedman ym. 2010, 303-304; Kauffman ym. 2007. 220.)



Kuva 12. Nivussilsa (Kuva: Suhonen Raimo)

2.1.4.4. Hiuspohjan silsa

Hiuspohjan silsaa eli *tinea capitis* esiintyy lähinnä lapsilla. Suomessa hiuspohjan silsaa löydetään pääosin Afrikasta maahan muuttaneilla lapsilla. Afrikassa ja Aasiassa hiuspohjan silsa on yleinen ja sitä on myös jonkin verran Itä- ja Etelä-Euroopassa. Tartunta saadaan usein kotieläimiltä, kuten kissalta tai koiralta, mutta hiuspohjan silsa voi levitä myös ihmisestä toiseen yhteisten hiustenhoitotuotteiden ja pyyhkeiden välityksellä. Myös päiväkodeissa on ollut joitakin epidemioita. Hiuspohjan silsan oireita ovat erikokoiset hilseilevät pyöreät läiskät, jonkin asteinen hiustenlähtö (Kuva 13 ja 14), märkänäpyt ja paineet (Kuva 15). Infektio voi levitä myös koko hiuspohjan alueelle. Oireet vaihtelevat tapauskohtaisesti lievistä hilseilystä koko hiuspohjan infekioon ja laaja-alaiseen arpeuttavaan hiustenlähtöön. Antropofiilisten lajien aiheuttamat infektiot ovat usein lievempiä, zoofiiliset lajit taas saattavat aiheuttaa voimakkaan tulehdusreaktion. Hiuspohjan silsan oireet riippuvat myös siitä, kuinka syvälle infektio ulottuu, hiusjuuren ulko- vai sisäpuolelle. On myös mahdollista, että sieni-infektio aiheuttaa sekundaarisen bakteeri-infektion, jolloin oireina ovat kuumeilu ja imusolmukkeiden aristus. (Hedman ym. 2010, 304-305; Kauffman ym. 2007, 222.)

Hoitona hiuspohjan silsaan on useimmiten sisäinen sienilääkitys 4-6 viikon ajan sekä lisäksi paikallinen sienilääkehoito. Hoito kuitenkin katsotaan aina tapauskohtaisesti ja tarkistetaan myös, onko mahdollista, että potilaan läheiset olisivat saaneet tartunnan. Hiuspohjan silsan yleisimmät taudinaiheuttajat Suomessa ovat *T. violaceum* ja *M. audouinii*, mutta myös esimerkiksi *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* ja *M. canis* voivat aiheuttaa hiuspohjan silsainfektion. (Hedman ym. 2010, 304-305; Kauffman ym. 2007, 222.)



Kuva 13. Hiuspohjan silsan aiheuttamaa hiusten lähtöä

Kuva 14. Hiuspohjan silsan aiheuttamaa hiusten lähtöä

Kuva 15. Hiuspohjan silsan märkänäppyjä

(Kuva 13-15: Suhonen Raimo)

2.1.4.5. Vartalon silsa

Vartalon silsa eli *tinea corporis* voi tarttua kotieläimistä, karjasta tai potilaan oman kehon infektoituneesta osasta toiseen terveeseen osaan tai ulkopuolisesta tartunnan lähteestä mihin vain kehon osaan. Oireet vaihtelevat kehon osan, tartunnanaiheuttajan ja infektion keston mukaan. Tyypillisiä oireita ovat pyöreät tai soikeat punoittavat, hilseilevät ja kuivat tarkkarajaiset alueet. Infektoituneen alueen keskikohta alkaa parantua, kun infektio leviää reuna-alueilta. Tämä aiheuttaa alueen punareunaisuuden ja alueen keskellä terveen alueen (Kuva 16). Etenkin immuunipuutteisilla infektoituneet alueet saattavat kasvaa kokoa, levitä ja yhtyä suureksi infektiotalueeksi. Vartalon silsaa hoidetaan paikallisella sienilääkityksellä 1-4 viikon ajan, hankalissa infektiotapauksissa käytetään lisäksi myös sisäistä sienilääkitystä. Vartalon silsan taudinaiheuttajia ovat kehon osasta toiseen tarttuvissa infektioidissa *T. tonsurans*, lemmikkieläinten omistajilla ja hoitajilla *T. mentagrophytes* ja *M. canis*, karjanpitäjillä *T. verrucosum* ja hevosten kanssa työskentelevillä *T. equinum*. (Hedman ym. 2010, 305-306; DermNet New Zealand. 2003.)



Kuva 16. Vartalon silsa (Kuva: Suhonen Raimo)

2.1.4.6. Partasilsa

Partasilsa eli *tinea barbae* on parran ja viiksien alueen silsainfektio, joka tarttuu eläimistä ja sitä tavataan tavallisesti vain miehillä. Oireita ovat voimakkaasti tulehtuneet nystyräiset punaiset alueet, märkärakkulat ja karvoja ympäröivät absessit. Karvat lähtevät irti helposti kevyesti vetämällä. Lievää infektiota hoidetaan paikallisella sienilääkityksellä, mutta useimmiten infektio kuitenkin vaatii sisäisen sienilääkityksen. Partasilsan taudinaiheuttajia ovat *T. verrucosum* ja *T. mentagrophytes*. (DermNet New Zealand 2003.)

2.1.4.7. Kämmenen silsa

Kämmenen silsan eli *tinea manumin* aiheuttamat infektiot ovat todella harvinaisia. Oireina ovat ekseeman kaltainen oireilu ja kuivan ihon hilseily. Tartunnan voi saada oman kehon infektoituneesta alueesta, kuten jalasta, kotieläimistä tai kämmensilsainfektiota sairastavalta henkilöltä. Kämmenen silsainfektiota hoidetaan samalla tavalla kuin vartalon silsainfektiota. Taudin aiheuttajina kämmenen silsassa ovat *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* ja *T. verrucosum*. (Hedman ym. 2010, 306.)

2.2 Homeet ja niiden aiheuttamat infektiot

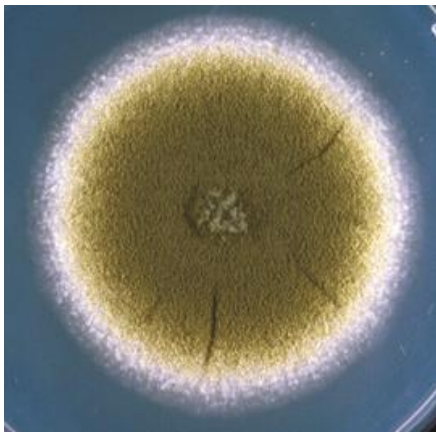
Infektioita aiheuttavat homesienilajit ovat opportunistisia taudinaiheuttajia eli ne kykenevät aiheuttamaan infektion, kun olosuhteet ympärillä muuttuvat niille suotuisiksi. Mikäli immuunipuolustusjärjestelmä toimii normaalisti, homeet ovat suhteellisen harmittomia, mutta saattavat aiheuttaa allergiaoireita ja astman pahenemista. Immuunipuutteisille potilaille nämä opportunistiset taudinaiheuttajat voivat kuitenkin aiheuttaa vakavia infektiota. Tyypillisimmät infektiopaikat ovat keuhkot, nenä ja limakalvot, joihin itiöt pääsevät hengitysilman mukana. (Hedman ym. 2010, 315.)

2.2.1 *Aspergillus*

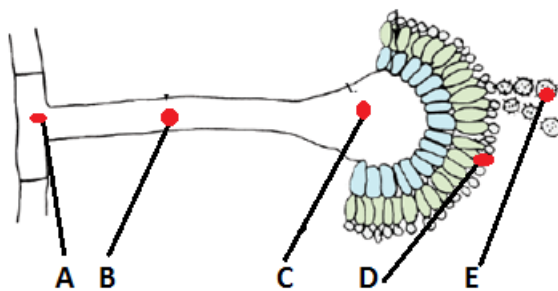
Aspergillus-sukuun kuuluu 250 lajia, joista yleisimmät taudin aiheuttajat ovat *Aspergillus fumigatus*, *flavus*, *terreus*, ja *niger*. *Aspergillus*lajien aiheuttamia infektiotauteja kutsutaan aspergilloosiksi. Tauti voi olla invasiivinen infektio, kolonisaatio, myrkytys tai allergia. *Aspergilluksen* itiöitä tavataan normaalisti kaikkialla ympäristössä, sekä maaperässä että ilmassa. *Aspergillukset* ovat myös yleisiä kontaminanteja laboratorio-olosuhteissa. (Ellis & Kidd. *Aspergillus*; Kauffman ym. 2007, 145; Larone 2011, 281; Hedman ym. 2010, 315; De Hoog ym. 2000, 442.)

Aspergilluksen pesäkkeet ovat ensin valkoisia, sitten niihin alkaa lajista riippuen kehittyä eri vihreän sävyjä, keltaista, oranssia, ruskeaa tai mustaa. Pesäkkeet ovat samettimaisia tai pumpulimaisia (Kuva 17). Agarin alapuolta tarkasteltaessa pesäkkeet ovat väriltään

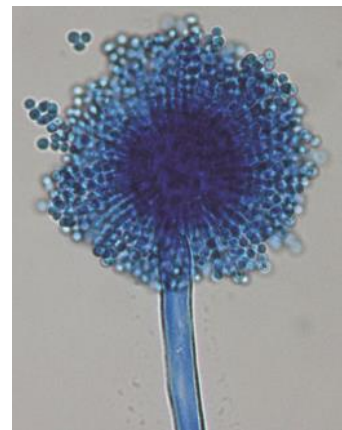
valkoisia, kultaisia tai ruskeita. Mikroskooppisesti tarkasteltuna *Aspergilluksen* rihmat ovat erillisiä ja halkaisijaltaan 2,5-8 μm kokoisia. Haarautumaton konidiofori kasvaa erikoistuneesta jalkasolusta (Kuva 18, A, B). Konidioforin päähän muodostuu turvonnut vesikkeli (Kuva 18, C), joka on kokonaan tai osittain pullonmuotoisten ulokkeiden peitossa (Kuva 18, D). Ulokkeet tuottavat konidiaketjuja (Kuva 18, E). Konidiat ovat joko pyöreitä tai karkeanmuotoisia. Kuvissa 19 ja 20 näkyy selkeästi *Aspergillus*-lajeille tyypilliset jalkasolut sekä konidiaketjut. (Larone 2011, 281.)



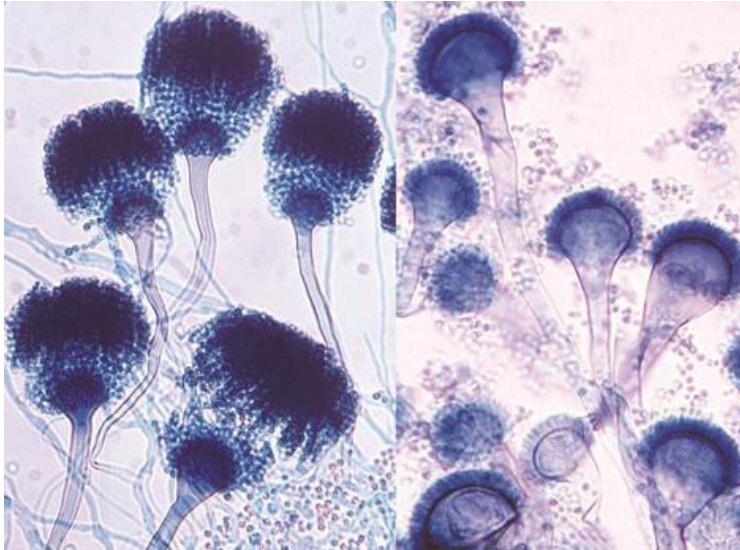
Kuva 17. *A. flavuksen* kasvu maljalla
(Kuva: Ellis & Kidd)



Kuva 18. *Aspergilluksen* rakenne
(Kuva: Ellis & Kidd)



Kuva 19. *A. flavus* mikroskoopissa
(Kuva: Ellis & Kidd)

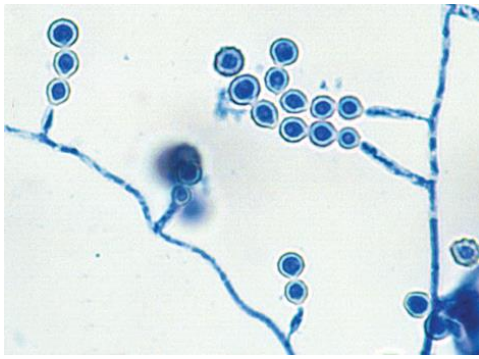


Kuva 20. *A. fumigatus* aspergilluksille tyypilliset rakenteet jalkasolut sekä konidia-ketjut (Kuva: Ellis & Kidd)

2.2.2 *Scopulariopsis*

Suurin osa *Scopulariopsis*-sukuun kuuluvista sienilajeista on lähtöisin maaperästä. Ne ovat myös yleisiä kontaminanteja laboratorio-olosuhteissa. Monet lajit aiheuttavat kynsisilsää etenkin varpaiden kynsissä. *Scopulariopsis*-suvun lajit harvoin aiheuttavat subkutaanisia tai invasiivisia infektiota. Yleisimmät kliinisesti merkittävät lajit ovat *S. brevicaulis*, *S. gracilis* ja *S. bumptii*. (Ellis & Kidd. *Scopulariopsis*; Larone 2011, 297.)

Scopulariopsis pesäkkeet ovat ensin sileitä ja valkoisia, kunnes ne yleensä muuttuvat puuterimaisiksi vaaleanruskeiksi keltaruskeareunaisiksi pesäkkeiksi. Agarin alapuolta tarkasteltaessa pesäke on väriltään keltaruskea ja keskeltä hieman tummemman ruskea. Mikroskooppisesti tarkasteltuna nähdään erillään olevia rihmoja, joista lähtee konidioforeja, joiden päässä on annelide, solu, joka muodostaa itiöitä kuroutumalla. Annelidesta muodostuu yksisoluisia rengasmaisia konidioita ketjuissa (Kuva 21). Nuorin konidia on lähimpänä annelidea. Konidiat ovat pallomaisia tai päärynän muotoisia. (Larone 2011. 297; Ellis & Kidd. *Scopulariopsis*; Tieteen termipankki 2014.)

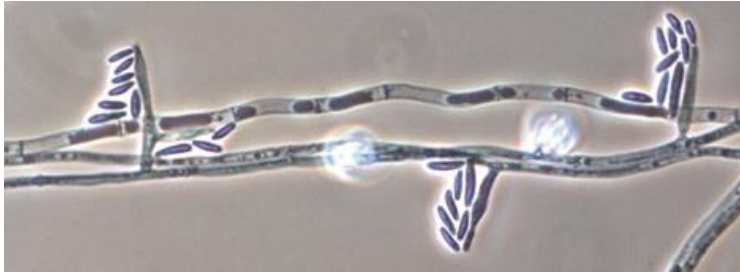


Kuva 21. *S. brevicaulis* konidiaketjut (Kuva: Ellis & Kidd)

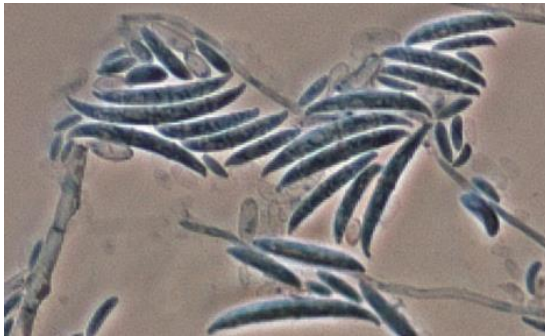
2.2.3 *Fusarium*

Kuten *Scopulariopsis*-suvussa, myös suurin osa *Fusarium*-sukuun kuuluvista sienilajeista on lähtöisin maaperästä ja ne ovat myös yleisiä kontaminanteja laboratorio-olosuhteissa. Yleisimmin *Fusarium*-suvun sienet aiheuttavat infektiota silmien sarveiskalvolla. Toisiinsa ne aiheuttavat myös muita infektiota, kuten mysetoomaa (krooninen subkutaaninen infektio), poskiontelotulehdusta, septistä niveltulehdusta tai kynsien infektiota. Kliinisesti merkittävimmät taudinaiheuttajat ovat *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum-equiseti* sekä *F. chlamydosporum*. (Ellis & Kidd. *Fusarium*; Larone, 2011, 305.)

Fusariumin pesäkkeet ovat ensin valkoisia ja pumpulimaisia. Pesäkkeen kasvaessa, sen väri muuttuu pinkiksi tai violetiksi. Pesäkkeen keskusta on väriltään tummempi, kuin sen reunat. Joidenkin lajien pesäkkeet pysyvät valkoisina tai muuttuvat vaalean oranssiksi. *F. solani* on pesäkemorfologialtaan ainutlaatuinen, sillä se saa sinivihreän tai siniruskean värin. Agarin alapuolelta *Fusariumin* pesäkkeet ovat väriltään vaaleita. Mikroskooppisesti tarkasteltuna *Fusarium* tuottaa sekä mikro- että makrokonidioita siroista vesikkelin ulokkeista (Kuva 22). Makrokonidiat ovat kaksi- tai useampisoluisia, sukkulamaisia tai sirpinmuotoisia (Kuva 23). Mikrokonidiat ovat yksi- tai kaksisoluisia, päärynän-, ovaalin- tai sukkulanmuotoisia, suoraa tai kaarevia. *Fusariumissa* saattaa olla myös klamydosporeja. (Larone. 2011, 305; Ellis & Kidd. *Fusarium*.)



Kuva 22. *F. oxysporum*in lyhyitä vesikkelin ulokkeita ja mikrokonidioita (Kuva: Ellis & Kidd)



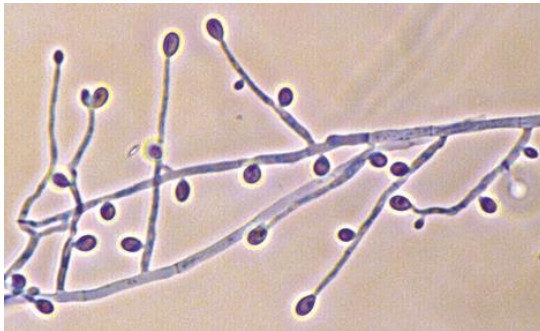
Kuva 23. *F. oxysporum*in makrokonidioita (Kuva: Ellis & Kidd)

2.2.4 *Scedosporium*

Scedosporium-suvussa on kolme lajia, jotka ovat opportunistisia taudinaiheuttajia. Nämä lajit ovat *Scedosporium apiospermum*, *S. boydii* ja *S. aurantiacum*. *Scedosporiumia* kuitenkin harvoin löytyy kliinisen laboratorion tutkimuksissa. Infektioita *Scedosporium* aiheuttaa tavallisimmin keuhkoissa, mutta myös silmissä, korvissa, keskushermostossa ja sisäelimissä. (Ellis & Kidd. *Scedosporium*.)

Scedosporiumin pesäkkeet ovat untuvaisen mokkaisia ja väriltään harmaanruskeita. Agarin alapuolelta pesäkkeiden väri on mustanharmaa. *Scedosporiumin* konidiat ovat yksisoluisia ovaalin tai pullonmuotoisia ja väritykseltään haalean ruskeita (Kuva 24). Konidiat muodostuvat yksittäin tai pienissä ryhmissä konidiforeista tai rihmastosta sivusuuntaisesti. Konidioiden muodostuminen on samankaltaista, kuin annelidien kondioiden tuotto, mutta *Scedosporiumin* annelidemuodostumia on erittäin vaikea havaita mikroskooppi-

sesti. *Scedosporiumin* tunnistaminen morfologisesti on melko epäluotettavaa ja tunnistamiseen suositellaan käytettävän molekulaarisia tunnistusmenetelmiä. (De Hoog ym. 2000, 899; Ellis & Kidd. *Scedosporium*.)



Kuva 24. *S. apiospermum* mikrokonidioita (Kuva: Ellis & Kidd)

2.2.5 Homeiden aiheuttamat infektiot

Homeiden itiöt pääsevät elimistöön yleisimmin hengitysteiden kautta sisäänhengitysilman välityksellä, mutta suotuisissa olosuhteissa infektioporttina voi olla rikkoontunut ruumiinpeite, kuten iho tai limakalvot. Yleisimmin esiintyvä infektio on aspergilloosi, joka on *Aspergillus*-sukuun kuuluvien lajien aiheuttama infektio. Elimistö puolustautuu *Aspergillus*itiöitä vastaan makrofagien fagosytoinnin ja neutrofiilien avulla. Immuunipuutteisilla tämä elimistön ensimmäisen asteen puolustusmekanismi ei toimi ja itiöt kykenevät aiheuttamaan infektion. Immuunipuutos voi olla synnynnäinen tila tai se voi olla esimerkiksi jonkin viruksen, kantasolusiirron, lääkehoidon tai leukemian aiheuttama. Inaktiiviset konodiat kulkeutuvat keuhkoihin, joissa ne juuttuvat alempiin hengitysteihin. Konodiat alkavat turvota, makrofagit saartavat ne ja estävät niitä turpoamasta, jolloin konodiat alkavat kasvattaa rihmoja. Rihmat tunkeutuvat kudoksiin, joiden kautta ne invasoivat verisuoniin ja leviävät muualle kehoon. Normaalisti joko makrofagit tuhoavat konodiat fagosytoosin avulla tai neutrofiilit estävät rihmojen kasvun ja leviämisen oksidatiivisten sekä nonoksidatiivisten mikrobien tuhoamiseen tarkoitettujen mekanismien avulla. (Kauffman ym. 2007, 145,155; Immuunipuutospotilaiden yhdistys; CDC 2017.)

Homeet voivat aiheuttaa infektoita myös dermatofyyttien tapaan sormien ja varpaiden kynsissä sekä iholla. Yleisimmät taudinaiheuttajat ovat *S. brevicaulis* sekä *Fusarium*- ja *Aspergillus*-suvun lajit. Oireet ovat samankaltaisia kuin *tinea unguiumissa* ja *pediksessä*

infektiopaikasta riippuen. Homeen aiheuttamat kynsi-infektiot ovat vaikeahoitaisia. Hoitona voidaan käyttää suun kautta nautittavia ja paikallisia sienilääkkeillä, kuten itrakonatsoli ja terbinafiini tai poistamalla infektoitunut kynsi. (Oakley 2003.)

2.2.5.1. Allerginen bronkopulmonaalinen aspergilloosi

Allerginen bronkopulmonaalinen aspergilloosi (ABPA) on hengitysteiden tulehdus, joka hiljalleen vahingoittaa keuhkokudosta, jonka vaurioituminen hoitamattomana voi johtaa kudostuhon ja fibroosin muodostumiseen. ABPA:ta tavataan yleisimmin astmaatikoilla ja kystistä fibroosia sairastavilla. Taudin patogeneesiä ei kunnolla tunneta, mutta tärkeänä ominaisuutena taudin kehittymisessä pidetään IgE-vasta-ainevälitteistä allergiaa *Aspergillusta* kohtaan, *Aspergilluksen* elinkykyisten itiöiden pitkään pysymistä hengitysteissä, *Aspergilluksen* suoraa kudoksia tuhoavaa vaikutusta ja sen aikaansaamaa immunologista reaktiota. (Hodgson 2010; Aspergillus and Aspergillosis Website 2012.)

ABPA:n oireita ovat perifeerisen veren eosinofilia, pitkään jatkunut vaikeahoitoinen astma, johon on kuulunut pahenemisvaiheita, hengenahdistusta, limaista yskää sekä lisäksi ysköksistä voi löytyä ruskeita limatulppia. Kystistä fibroosia sairastavan tila huononee ja yskä, vinkuna ja limaneritys lisääntyvät. Spirometria tutkimuksessa todetaan keuhkoputkien ahtautumista, *Aspergilluksen* ihopistokokeessa välitön positiivinen reaktio ja keuhkojen röntgenkuvasta nähdään kertymät keuhkoissa. (Hodgson 2010; Aspergillus and Aspergillosis Website 2012.)

Ensisijaisen tärkeää ABPA:n hoidossa on saavuttaa astman tai kystisen fibroosin hyvä hoitotasapaino, jolloin keuhkojen toimintakyky pysyy mahdollisimman hyvin yllä. Myös infektiot tulee hoitaa mahdollisimman tehokkaasti ja limaa voidaan poistaa hengitysteistä fysikaalisesti. Lääkityksenä käytetään keuhkoputkia avaavia ja tulehdusta lieventäviä inhaloitavia lääkkeitä. Itse ABPA:n lääkehoitona käytetään kortikosteroideja suun kautta nautittuna. Kortikosteroidit hillitsevät immunologista tulehdusreaktiota laajentamalla ahtautuneita keuhkoputkia, vähentämällä veren eosinofiilien ja IgE-vasta-aineiden pitoisuutta sekä korjaamalla kertymiä keuhkoissa. (Hodgson 2010; Aspergillus and Aspergillosis Website 2012.)

2.2.5.2. Aspergillooma

Aspergillooma kehittyy jonkin taudin, kuten tuberkuloosin, keuhkosyövän tai keuhkofibroosin vaurioittamaan keuhkoon. Rihmasieni kasvaa keuhkossa pallomaisesti onteloon. Aluksi infektio voi olla oireeton, mutta edetessään se aiheuttaa yskää, hengenahdistusta, rintakipua, kuumetta, veristä yskää, huonovointisuutta ja painonlaskua. Verinen yskä aiheutuu sienien kasvusta verisuonten läpi. Lämpäistessään suuria verisuonia, sieni-infektio voi johtaa kuolemaan. Onteloon voi muodostua myös sekundaarinen bakteeri-infektio. Yleisimpänä taudin aiheuttajana on *A. fumigatus*, myös muut *Aspergillus*-lajit, *S. apiospermum* ja *Mucorales*-lajit voivat aiheuttaa aspergilloomaa. (Hedman ym. 2010, 315-316; CDC 2017.)

Ensisijaisesti aspergillooman hoitoon suositellaan sienirihmaontelon kirurgista poistoa, mikäli potilaan yleistilatila ja keuhkojen toiminta ovat sellaiset, että leikkaus voidaan suorittaa. Komplikaatiot leikkauksen jälkeen ovat kuitenkin yleisiä. Mikäli aspergilloomaa ei voida kirurgisesti poistaa, ontelo jatkaa kasvuaan pahentaen oireita ja lisäten komplikaation mahdollisuuksia. Aspergillooman aiheuttama verenvuoto voidaan hoitaa embolisaation avulla, jossa verisuoneen laitetaan katetri, mikä estää veren kulun vuotavaan verisuoneen. Aspergillooman hoidossa sienilääkkeiden tehosta ei ole tutkittua näyttöä. Mikäli sienilääkkeitä aspergillooman hoitoon halutaan kokeilla, itrakonatsoli ja vorikonatsoli ovat ensimmäisiä vaihtoehtoja. (Hedman ym. 2010, 315-316; Medline Plus 2016.)

2.2.5.3. Invasiivinen aspergilloosi

Vahvasti immuunipuutteisilla invasiiviset *Aspergillus*-infektiot johtavat usein kuolemaan, sillä ne on vaikeita diagnosoida ja hoito aloitetaankin yleensä epäilyn perusteella. Elinodotteeseen vaikuttaa huomattavasti se, kuinka nopeasti diagnoosi saadaan tehtyä. *Aspergillus* invasoituu keuhkoista verisuonien kautta muihin elimiin, kuten sydämeen, ihoon, aivoihin ja munuaisiin samalla tavalla kuin aspergilloomassa ja voi aiheuttaa infektiopesäkkeen lisäksi paikallisia kuolioita kudoksissa. Aivot ovat *Aspergillukselle* yleinen elin, jonka se invasoi, immuunipuuteisen potilaan aivoinfarktin aiheuttajaksi voikin löytyä verisuonen tukkinut sienirihmasto. Invasiivisen aspergillusinfektion oireita ovat kuume, yskä, veriyskä, rintakivut ja hengitysvaikeudet, joita ei saada antibiooteilla hoi-

dettua. Hoitona invasiiviseen aspergilloosiin käytetään sienilääkkeitä, kuten voriconazolea, caspofunginia, itraconazolea tai amphotericin B:tä infuusiona tai suun kautta nautittuna. (Aspergillus and Aspergillosis Website 2012; Hedman ym. 2010, 317.)

2.2.5.4. Nenänielun, korvien ja silmien infektiot

Aspergilluksen aiheuttama infektio poskionteloissa voi olla allerginen poskiontelontulehdus, aspergillooman kaltainen kotelomainen rakenne tai invasiivinen aspergilloosi. Allergisen poskiontelotulehduksen oireena on pitkittynyt tukkoinen tai vuotava nenä ja se voi hoitamattomana johtaa polyyppeihin. Hoitona allergiseen poskiontelontulehdukseen on paikallisesti käytettävät sekä suun kautta nautittavat sienilääkkeet ja steroidit, poskionteloiden tyhjentäminen sekä polyyppien poistaminen kirurgisesti. Poskionteloiden aspergillooman kotelomainen rakenne kehittyy samalla tavoin, kuin keuhkoissa. Normaalin immuunipuolustuksen omaavilla henkilöillä oireena on tukkoinen nenä, krooninen päänsärky ja epämiellyttävä tunne kasvojen alueella. Hoitona poskionteloiden aspergilloomaan on poskionteloiden kirurginen tyhjennys. (Aspergillus and Aspergillosis Website 2012; Hedman ym. 2010, 316.)

Immuunipuutteisilla poskionteloiden aspergilloosi on yleensä invasiivinen infektio ja sen oireina ovat kuume, kipu kasvoissa, vuotava nenä sekä päänsärky. Tauti diagnosoidaan etsimällä taudinaiheuttajasieni nenäeritteestä tai poskionteloiden kudoksesta. Limakalvojen läpi invasoitunut aspergilloosi vaatii aina kirurgisen poskionteloiden tyhjentämisen, lisäksi käytetään voimakkaita sienilääkkeitä, kuten vorikonatsoli ja itrakonatsoli. (Aspergillus and Aspergillosis Website 2012; Hedman ym. 2010, 316.)

Otomykoosia eli korvan homeinfektiota esiintyy yleisimmin lämpimässä kosteassa ilmassa ja sen yleisin taudinaiheuttaja on *Aspergillus niger*. Otomykoosi on pinnallinen akuutti tai krooninen opportunistinen infektio, joka kehittyy immuunisuppression, bakteeri-infektion tai fyysisen vamman herkistämään korvakäytävään tai välikorvaan. Oireina ovat korvan kutina ärsytys, epämukava tunne, kipu ja vähäinen märkäerite. Hoitona otomykoosiin on korvan tarkka puhdistaminen ja puhtaana pitäminen, lisäksi voidaan käyttää sienilääkitystä paikallisesti voiteena tai tippoina. (Hopsu, Närkiö-Mäkelä, & Silvola 2011; Chander 2012; Hedman ym. 2010, 316.)

Aspergilloosi voi infektoida silmän sidekalvon osana systeemistä *Aspergillus*-infektiota tai se voi invasoida silmän sarveiskalvoin sen rikkoutuneen pinnan kautta. Hoitona käytetään itrakonatsolia systeemisesti tai muita sienilääkkeitä paikallisesti, tarvittaessa voidaan käyttää kirurgisia menetelmiä. (Hedman ym. 2010, 316.)

3 RIIHMASIENTEN TUNNISTUSMENETELMÄT

3.1 Näytteenotto, säilytys, kuljetus

Näytteenottajan tulee tarkistaa potilaalta ennen näytteenottoa, onko hän käyttänyt lääkitystä mahdolliseen sieni-infektioon. Jos infektiota on yritetty hoitaa ulkoisella sienilääkkeellä, näytettä ei saa ottaa ennen kuin on kulunut vähintään kaksi viikkoa lääkityksen lopettamisesta. Jos infektiota taas on yritetty hoitaa sisäisellä sienilääkkeellä, ihonäytteen voi ottaa aikaisintaan kahden kuukauden ja kynsinäytteen aikaisintaan kuuden kuukauden kuluttua lääkityksen lopetuksesta. Jos kynsien ulkoisessa hoidossa on käytetty amorolfiinilakkaa, näytteen saa ottaa vasta kolmen kuukauden kuluttua lääkityksen lopettamisesta. (Käypähoito 2010.)

Pinnallisten sieni-infektioiden diagnostiikassa (Sk-SienVi) näytteenottoalue tulee puhdistaa kontaminoivista mikrobeista käyttämällä 80-prosenttista alkoholia. Kuivat näytteet otetaan matalaan kierrekorkilliseen muovipurkkiin raaputtaen tylpällä steriilillä veitsellä näytteenottoa. Kosteaa aluetta otetaan geeliin kostutetulla vanupuikolla ja ne kuljetetaan geelikuljetusputkessa. Kuivat näytteet säilyvät hyvin huoneenlämmössä, mutta kosteat näytteet tulee lähettää laboratorioon kylmäkuljetuksena. Pintasieninäytteet tulee toimittaa laboratorioon kolmen vuorokauden kuluessa. (Fimlab ohjekirja 2017; Huslab ohjekirja 2017.)

Kynnestä näyte otetaan yleensä kynsilevyn alapinnasta sairaan ja terveen alueen rajalta, jotta näytteessä olisi kasvukyvylisiä sientä. Kynnen kärkiosa tulee leikata ja vuolla veitsellä terveet pintakerrokset kynnen päältä pois, kunnes vaurioitunut kerros tulee näkyviin. Näytteeksi vuollaan vaurioituneesta kynnestä veitsellä ohuita lastuja. Jos infektoitunut kynsi on valkoinen ja vain kynnen pinnassa, tällöin riittää, että näyte raaputetaan suoraan kynnen pinnasta. (Fimlab ohjekirja 2017; Huslab ohjekirja 2017.)

Myös ihonäytteet otetaan infektoituneen ja terveen alueen rajalta raaputtaen steriilillä veitsellä. Infektoitunut iho on yleensä hilseilevä, punoittava ja hieman koholla, joten taudin etenemisreuna on helppo erottaa. Jos näytteenottokohdassa on rakkula, sen katto leikataan näytteeksi pinsettejä ja saksia käyttäen. (Fimlab ohjekirja 2017; Huslab ohjekirja 2017.)

Hiuspohjanäytettä otettaessa on huomioitava, että näytteeksi otetaan sairaita hiuksia juurittupineen sekä runsaasti hilsettä. Sairaat hiukset ovat esimerkiksi katkenneita hiusten tynkiä. Jos niitä ei ole, pitkien hiusten latvat leikataan pois ja tyviosasta jätetään noin 1-2 senttimetrin pituiset osat näytteeksi. Hiuspohjan infektio voi myös märkiä, jolloin hiusten lisäksi otetaan kuivalla vanutikulla märkäeritteestä näyte, joka laitetaan geelikuljetusputkeen. (Fimlab ohjekirja 2017; Huslab ohjekirja 2017).

Syvää sieni-infektiota epäiltäessä (Pu-SienVi) näytelaatuna on kudospala-, biopsia-, märkä- ja yskösnäytteet. Myös erilaisista nesteistä, kuten likvor, BAL-, dialyysi- ja pleuranesteet, voidaan tehdä sieniviljely. Näytteet kerätään tehdaspuhtaisiin purkkeihin tai putkiin, joihin lisätään 0,9-prosenttista keittosuolaliuosta, jotta näytteet eivät kuivu. Ennen kuljetusta jääkaappilämpötilassa tulee säilyttää ne näytteet, jotka on otettu sellaisista kehonosista, jotka eivät ole steriilejä. Näytteet tulee toimittaa laboratorioon viimeistään vuorokauden kuluttua näytteenotosta. Ilmassa olevat itiöt sekä näytteenottokohdan normaaliflooran bakteerit voivat kontaminoida näytteen, mutta useammin tulos on kuitenkin sieniviljelyssä negatiivinen. Tämän takia on hyvä ottaa natiivinäyte, jolloin voidaan heti mikroskooppisesti tarkistaa, onko löydös tyypillistä *Aspergillus*-sienirihmaa. (Fimlab ohjekirja 2017; Hedman ym. 2010, 316.)

3.2 Rihmasienten laboriodiagnostiikka

Rihmasienidiagnostiikassa selvitetään iho- ja kynsimuutoksia, jotka ovat pääosin dermatofyyttien aiheuttamia. Sienten tunnistamiseen voi mennä muutamia viikkojakin joutuessa niiden hitaasta kasvamisesta viljelymaljoilla. Pelkästään viljely ei riitä tunnistamiseen, vaan kasvatetuista pesäkkeistä tehdään lisäksi jatkoviljelyitä sekä värjäyksiä, jotka mikroskopoidaan. (Käypähoito 2010.)

3.2.1 Natiivitutkimus

Näytteen saapuessa laboratorioon viljelyn lisäksi näytteestä tehdään natiivitutkimus, joka sisältyy Pu-SienVi-tutkimuspyyntöön. Natiivitutkimuksessa tehdään preparaatti, jossa on

vain itse näytemateriaalia. Sienilääkkeiden vaikutuksen, bakteerien ylikasvun, kontaminanttisienten tai sienen keinotekoiselle maljalle sopeutumattomuuden vuoksi, halutun patogeenisien kasvu voi kokonaan estyä elatusaineella. Tämän vuoksi natiivitutkimus on usein välttämätön normaalin viljelyn yhteydessä. (Huslab ohjekirja 2017.)

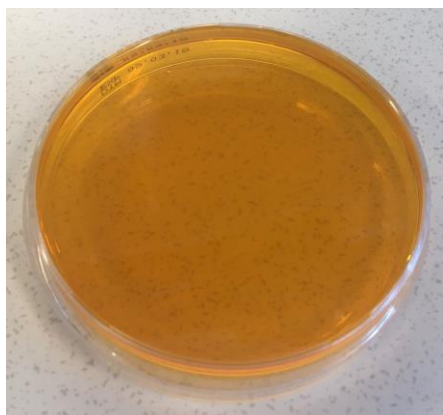
Natiivitutkimuksen tarkoituksena on siis vahvistaa tautiepäily eli löytää patogeenisen näytemateriaalista mikroskopoimalla ja saada alustava tulos näytteestä. Löydös vastataan sienirihmastoksi tai sieni-itiöiksi. Vastaus saadaan usein muutamassa päivässä. Vaikka natiivitutkimus olisi negatiivinen, se ei tarkoita sitä, etteikö sieniviljely voisi olla positiivinen. Tutkimusta ei voida tehdä tikku-, virtsa- eikä ulostenäytteistä. (Hedman ym. 2010, 316.)

Natiivitutkimuksessa tehdään preparaatti näytteestä. Näyteastiassa olevaan näytteeseen lisätään pieni määrä kaliumhydroksiliuosta (KOH), jonka annetaan vaikuttaa vähintään kymmenen minuuttia. Objektilasini päälle lisätään ensin KOH-liuosta sisältävää näytemateriaalia, jonka jälkeen laitetaan fluoresoivaa Calcofluor White-väriainetta, joka sitoutuu sienten soluseinien pinnoille. Näyte mikroskopoidaan fluoresenssimikroskoopilla, jossa UV-valon aallonpituuden täytyy olla alle 400 nanometriä. Mikroskoopin toiminta perustuu fluoresoivien väriaineiden käyttöön. Mikroskoopin voimakas viritinvalo ohjataan näytteeseen, joka emittoi valoa takaisin mikroskoopin okulaareihin näyttäen mahdollisen sienen näytteestä fluoresoivana valona. Sienet näyttävät mikroskoopissa kirkkaan vihreältä, johtuen niiden soluseinän selluloosasta tai kitiinistä. Vaihtoehtoisesti myös faasimikroskoopilla pystytään havaitsemaan sienirihmasto näytteestä (Ellis & Kidd. KOH with Calcofluor White; Huslab ohjekirja 2017.)

3.2.2 Viljelymaljat

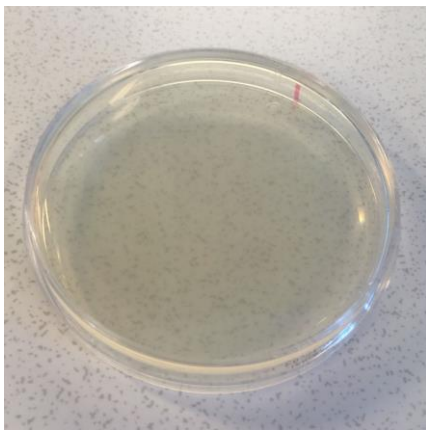
Sienille on tarkoitettu neljä erilaista selektiivistä elatusainetta sisältävää viljelyalustaa. Alustat voivat olla joko petriمالjoilla tai putkissa. Karkeasti jaoteltuna DTM sopii dermatofyyteille, maltoosia sisältävä elatusaine homeille ja Sabouraud sopii hiivojen, dermatofyyttien ja muiden sienten eristämiseen. (Hirvonen 2017.) Kaikki elatusaineet sisältävät agaria, joka on polysakkaridiseos. Se on eristetty valtameren punaleivistä ja toimii mikrobien kasvualustana. (Lee, Costumbrado, Hsu, Kim 2012).

DTM eli Dermatophyte Test Medium on selektiivinen elatusaine (Kuva 25), jota suositellaan patogeenisten dermatofyyttien viljelyyn ja eristämiseen. Vaikka elatusaine on tarkoitettu dermatofyyttien kasvuun, kasvualustalla voi kuitenkin kasvaa muitakin sieniä. Elatusaine sisältää soijapeptonia, joka on erinomainen ravintolähde korkean hiilihydraattipitoisuutensa vuoksi, lisäksi se tuottaa typpipitoisia ja hiilipitoisia yhdisteitä, jotka ovat välttämättömiä mikrobien kasvuun. Dekstroosi eli D-glukoosi toimii energianlähteenä aineenvaihdunnassa. Kloramfenikoli tai muu vastaava laaja-alainen antibiootti estää useimpien grampositiivisten ja -negatiivisten bakteerien kasvun alustalla. Saprofyttisten sienien kasvun estämiseksi elatusaineessa on myös sykloheksimidiä. Fenolipunainen pH-indikaattori on dermatofyyttien tunnistamiseen oleellinen keino, koska ne tuottavat alkalisia metaboliitteja, jotka saavat aikaan sienien kasvaessa keltaisen, oranssin tai punaisen värin kasvatusalustalla. Lopullinen pH alustalla on 5,6, jolla on 0,2 toleranssi. Happamuus estää bakteerien kasvua, mutta sallii sienien kasvun. (Hardy Diagnostics. 1996.)



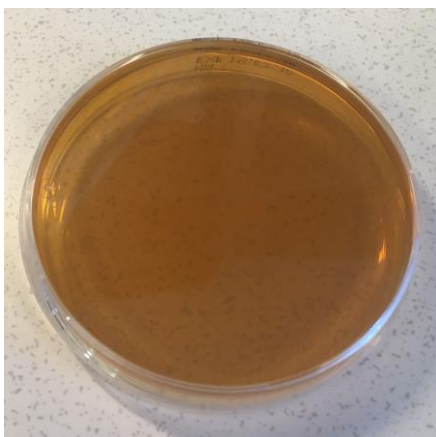
Kuva 25. Dermatofyyteille selektiivinen DTM-malja (Kuva: Sillanaukee, M. 2018).

Sabouraud Dextrose Agar, jota kutsutaan SAB-maljaksi (Kuva 26), on selektiivinen hiivojen ja rihmasienten kasvualusta. Elatusaine sisältää DTM:n lailla dekstroosia ja kloramfenikolia sekä Sabouraudille ominaista mykologista peptonia. Peptoni muodostuu kaseiinin ja eläinkudosten entsyymaattisessa digestiossa, jossa tuotetaan aminohappoja ja typpipitoisia yhdisteitä sienien ja hiivojen ravinteiksi. SAB-maljan elatusaineen pH on 5,6 ja toleranssi 0,2. Jälleen happamuus estää bakteerien kasvua ja mahdollistaa hiivojen ja rihmasienten kasvun. (Microbe Online. 2015; Thermo Scientific. 2017).



Kuva 26. Rihmasienille selektiivinen SAB-malja (Kuva: Sillanaukee. 2018).

Maltoosia sisältävä elatusaine eli Sabouraud Maltose Agar (Kuva 27) eroaa Sabouraud Dextrose Agarista ainoastaan siten, että siihen on sisällytetty eri hiilihydraatti. Dekstroosin korvaa tällä elatusaineella maltoosi eli mallassokeri, joka on selektiivinen homeille ja hiivoille. Tämänkin elatusaineen pH on 5,6 ja toleranssi 0,2, kuten edellisilläkin elatusaineilla (Thermo Scientific. 2017.)



Kuva 27. Homeille ja hiivoille selektiivinen maltoosimalja (Kuva: Sillanaukee. 2018).

BHI-liemi eli Brain Heart Infusion lihaliemi on hyvin ravitseva infuusioväliaine, joka toimii steriilien ja niukkojen näytteiden rikastusliemenä. Niukkoja näytteitä kasvatetaan ensin useampi vuorokausi BHI-liemessä, kunnes niistä saadaan tarpeeksi näytemateriaalia maljoille kasvamaan. Kun agaria ja BHI-lientä on suhteessa niin, että litrassa BHI-lientä on yksi gramma agaria, se soveltuu hyvin sienten eristykseen ja niiden viljelyyn. BHI-liemi koostuu aivojen ja naudan sydämen infuusionesteistä, proteose peptonista,

joka sopii hyvin ravitsemuksellisesti vaativien mikrobien viljelyyn, glukoosista, natriumkloridista ja dinatriumfosfaatista. Muihin viljelyalustoihin verrattuna, BHI-liemi on emäksisempi eli sen pH on 7,4 ja toleranssi 0,2. (Thermo Scientific. 2017.)

3.2.3 Viljely

Kun näytteet saapuvat laboratorioon, ne viljellään tietyille maljoille riippuen näytemateriaalista. Kynsi-, iho-, hilse- ja hiusnäytteissä voidaan olettaa, että epäilty taudinaiheuttaja on dermatofyytti, sillä yleensä näissä näytteissä kasvavat homeet ovat merkityksettömiä löydöksiä. Näytettä viljellään kahdelle DTM-maljalle ja jos näytettä riittää, sitä viljellään myös Sabouraud-maljalle. Kuivat näytteet asetellaan maljalle niin, ettei agarin pinta mene rikki. Palaset eivät kuitenkaan saa olla irrallaan, vaan ne tulisi asetella pinsettejä apua käyttäen niin, että ne tarrautuvat agarin pinnalle. Toinen maljoista jää kasvamaan huoneenlämpöön ja toinen malja laitetaan 35 asteiseen lämpökaappiin. Sieniä viljellään keskimäärin 2-4 viikkoa, mutta hitaasti kasvavia sieniä viljellään vieläkin pidempään. (Fimlab ohjekirja. 2017; Korhonen, M. 2017.)

Limakalvo- ja yskösnäytteet viljellään Sabouraud- ja maltoosimaljoille. Märkänäytteet viljellään Sabouraud- ja maltoosimaljan lisäksi kromogeenimaljalle. Biopsia-, BAL-, likvor- ja pleuranäytteet, sekä dialyysi- ja ravintonesteet ja kudospalat viljellään kaikki Sabouraud ja maltoosimaljalle. Jos näytettä on niukasti, se laitetaan kasvamaan muutamaksi päiväksi ensin BHI-rikastusliemeen. BAL-, pleuranäytteet, dialyysi- ja ravintonesteet tulee sentrifugoida ennen viljelyä, jolloin sedimentistä otetaan näytettä maljalle. Likvorista tehdään pyydettyä kryptokokkiantigeenin osoitus. (Korhonen. 2017.)

Nestemäiset näytteet viljellään maljalle näyteputken mukana tulleen tikun avulla tai levitetään puhtaalla pumpuli- tai puutikulla mahdollisimman tasaisesti ympäri maljaa. Tällöinkin tulee välttää rikkomasta agarin pintaa. Maljat kasvatetaan 35 asteisessa lämpökaapissa. Kun epäillään *Aspergillus fumigatus*, tehdään jatkoviljely uudelle maljalle ja se laitetaan kasvamaan yli 40 asteen lämpökaappiin, tällöin saadaan varmistettua epäily kyseisestä sienestä. *A. fumigatus* kasvaa ainoana rihmasienenä korkeassa lämpötilassa, jopa 45 - 47 asteessa. (Korhonen. 2017.)

3.2.4 Punakoe

Punakoetutkimus on tarkoitettu dermatofyyttien alustavaan tunnistukseen. DTM-malja sisältää fenolipuna pH-indikaattoria, joka muuttaa väriään happamasta keltaisesta emäksisen punaiseen riippuen maljalla kasvavan mikrobin pH:sta. Dermatofyytit tuottavat siis kasvaessaan alkalisia eli emäksisiä metaboliitteja. Emäksisyyden ja fenolipunan vuoksi pesäkkeen ympärille muodostuu punainen rengas (Kuva 28), jonka tunnistamista kutsutaan punakokeeksi. Punakokeen tarkoituksena on saada alustava tieto siitä, kasvaako maljalla dermatofyytti vai jokin muu sieni. Tulos vastataan ensimmäisen kahden viikon aikana viljelyn aloittamisesta. Monet kontaminanttihomeet ja -bakteerit muuttavat helposti fenolipunan punaiseksi, joten tulokset eivät ole erityisen luotettavia. (Hardy Diagnostics. 1996; Fimlab ohjekirja. 2017; Käypähoito. 2010.)



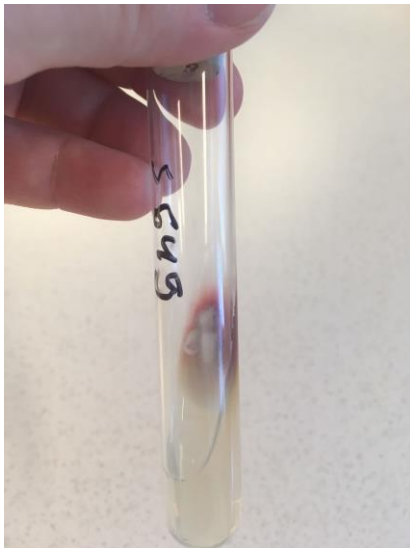
Kuva 28 *Tricophyton rubrum* DTM-maljalla (Kuva: Sillanaukee Milja 2018).

3.2.5 Peruna dekstroosi agar -putki

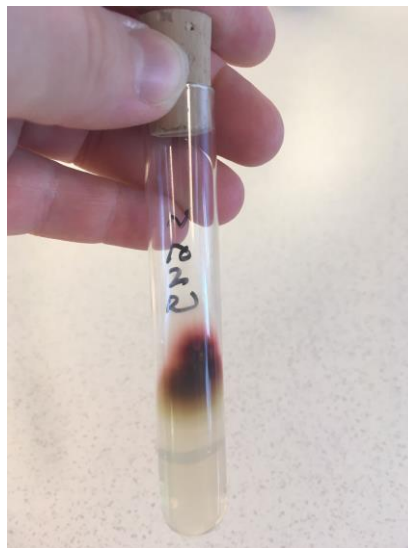
Peruna dekstroosi agar –putki eli perunaputki on dermatofyyteille tarkoitettu kasvatusalusta. Se koostuu dehydroidusta perunan infuusiosta ja dekstroosista, jotka edistävät sienien kasvua. Ravitsemuksellisesti rikas perunan infuusio edesauttaa sienien itiöintiä sekä vilkastaa sienien pigmenttituotantoa. Useat standardimenetelmät käyttävät steriiliä kymmenen prosentista viinihappoa alustan pH:n alentamiseksi, mikä estää bakteerien kasvun. Tällöin alustan pH on 3,5, jonka toleranssi on 0,1. Seokseen lisätään antibioottia

estämään bakteerien lisääntyminen. Agarilla annostellaan kolmasosa putkien tilavuudesta niin, että agar hyytyy vinottain, jolloin kasvupintaa on enemmän. (Sagar Aryal. 2015.)

Perunaputkeen viljeleminen on jatkoviljely, jolla halutaan tunnistaa maljalla kasvaneen dermatofyytin laji. Etenkin Suomessa yleisimmin esiintyvä dermatofyytti *Trichophyton rubrum* on helppo tunnistaa kyseisellä viljelyllä, sillä sen kasvaessa putkessa, väri muuttuu punaiseksi *T. rubrumin* tuottaman pigmentin ansiosta (Kuva 29 ja 30). DTM-maljalla kasvaneesta pesäkkeestä siirretään perunaputkeen näytettä ja sitä kasvatetaan niin kauan, kunnes värimuutos tai muu morfologinen tunnistus on havaittavissa. Tämä jatkoviljely on tarkoitettu vähentämään suurten näytemäärien mikroskopointia. Koska suurin osa näytteistä on *T. rubrumia*, punaisen värin esiintyminen perunaputkessa riittää vastauksen antamiseen. (Korhonen. 2017.)



Kuva 29. *Trichophyton rubrum* viljeltynä perunaputkeen (Kuva: Sillanaukee. 2018).



Kuva 30. *Trichophyton rubrum* kasvaa punaisena perunaputkessa (Kuva: Sillanaukee. 2018)

3.2.6 Homeiden mikroviljely

Homeille tehdään jatkotutkimuksena mikroviljely, jos näytteen lajitunnistus on jäänyt epäselväksi. Kun mikroskoopilla on yritetty tunnistaa näytteen sientä, näkymä lasilla on voinut olla täynnä pelkästään itiöitä, rihmastoja tai sellaisia rakenteita, jotka ovat niin erilaisia, ettei niitä pystytä tunnistamaan tunnetuiksi sienilajeiksi. Jos näyte on ylikasvanut

ennen tunnistusta, tulisi näyte viljellä uudelle maljalle tai tehdä mikroviljely, jotta itiöiden tuotto olisi aktiivista ja rakenteet pystytään kunnolla tunnistamaan. (Mould Under The Microscope. 2017.)

Mikroviljelyssä leikataan agarpalanen, joka on noin yhden neliösenttimetrin kokoinen. Agarneliö sijoitetaan petrimaljan pohjalla olevan objektilasin päälle, joka on laitettu esimerkiksi pienten lasiputkien päälle niin, ettei lasi koske maljaan. Agarneliön jokaisen sivun keskelle tehdään pienet viillot, joihin näytettä viljellään. Agarneliön päälle laitetaan vielä toinen objektilasi, jotta mahdollinen kasvu tarttuu lasien pintaan. Petrimaljan pohjalle lisätään vettä tai kostea suodatinpaperi, jotta viljelmä saa tarpeeksi kosteutta. Tämän jälkeen näytettä inkuboidaan huoneenlämmössä, kunnes kasvustoa esiintyy, kuitenkin enintään viisi vuorokautta. Kasvuston esiintyessä objektilaseille on tarttunut näytemateriaalia, jolloin ne värjätään ja mikroskopoidaan samanlailla kuin muutkin näytteet. (Mould Under The Microscope. 2017.)

3.2.7 Makroskooppinen ja mikroskooppinen tunnistaminen

Rihmasienet tunnistetaan aina lajitasolle asti. Tunnistusprosessiin kuuluu makroskooppinen eli silmännähtävä tunnistus, jolla pyritään alustavasti selvittämään, mikä sieni on kyseessä. Makroskooppisessa tunnistuksessa tarkastellaan agarille viljeltyä pesäkettä ja sen morfologiaa. Pesäkettä tunnistessa tulee huomioida sen ulkonäkö eli onko pesäke enemmän esimerkiksi pumpulimainen vai limainen. Pesäkkeen ja kasvun taustan väri tulee myös huomioida pesäkemorfologiassa. Väriä ja pesäkkeen muita ominaisuuksia vertaillaan referenssielatusaineilla, jolloin saadaan luotettavammin oikea lajiejäily näytteelle. (Käypähoito. 2010.)

Mikroskooppisessa tutkimuksessa näytteestä tehdään preparaatti, josta saadaan selville tunnistettavan näytteen sienilaji. Preparaatti tehdään siirtämällä osa maljalla kasvanutta pesäkettä objektilasille, jonka päälle tiputetaan muutama pisara laktofenolipuuuvasiniliuosta. Fenoli tappaa sienen ja estää lyysauksen, laktaasi säilyttää sienen rakenteen ja hapan puuvillasiniväri kiinnittyy kitiiniin, jota esiintyy sienten soluseinissä. Puuvillasini värjää siis sienten rakenteet siniseksi, jolloin makro- ja mikrokonidiat näkyvät selkeästi mikroskoopissa. Tällöin nähdään lajikohtaiset rakenteet ja sienilaji pystytään nimeämään. (Hardy Diagnostics. 2017.)

3.3 VITEK MS MALDI-TOF

VITEK® MS MALDI-TOF on automatisoitu massaspektrometriaan perustuva, mikrobien tunnistukseen tarkoitettu systeemi. MALDI-TOF koostuu sanoista Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight, eli matriisi avustettu desorptio ionisaatiolentoaika. Desorptiolla tarkoitetaan tässä yhteydessä mikrobin proteiinien vapautumista sen sisältä. VITEK MS sisältää laajan bakteeri- ja sienilajien tietokannan ja se antaa vastauksen mikrobin lajin tai suvun tasolla. Tutkimusvastaus saadaan nopeammin verrattaessa nykyisiin laboratoriodiagnostiikan menetelmiin. Kun tutkimustulokset saadaan nopeammin, myös potilaan hoito saadaan optimoitua aikaisemmassa vaiheessa ja täten potilas-hoito ja hoidon tulokset ovat paremmalla tasolla (VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system).

3.3.1 Tomintaperiaate

Viljelymaljalta otetaan mikrobipesäkettä, jota laitetaan sähköä johtavan metallisen näytelevyn näyteympyrälle. Jokaisessa näytelevyssä on myös näytealue kontrollikannan näytteelle. Kontrollikantana toimii *Escherichia Coli*, jonka avulla varmistetaan laitteen luotettavuus. Mikäli kontrollikannan näytteen analysointi ei onnistu, ei VITEK MS anna ajaa näytelevyn näytteitä. Näytteiden päälle laitetaan matriisiliuosta, joka koostuu orgaanisesta haposta. Matriisi lyysaa eli hajottaa vegetatiivisia organismeja ja se myös ionisoi- tuu näytteen mukana. Vaikeammin lyysautuvat mikrobit tarvitsevat erillisen esikäsitte- lyn, jotta niiden proteiinit saadaan vapautumaan, tällaisia mikrobeja ovat muun muassa rihmasienet ja mykobakteerit. (Dingle, T. & Butler-Wu, S. 2013. 590-591.)

Kun matriisiliuos on lisätty, laitetaan näytelevy VITEK MS:n vakuumitilaan, jossa näyte ionisoidaan lyhyiden laserpulssien avulla. Tämä saa aikaan näytteen proteiinien ionisaa- tion kaasumaiseen muotoon. Ionisoituneet, eri lailla varautuneet, proteiinipartikkelit kiih- dytetään lentämään vakuumitilassa olevan sähkökentän läpi. Proteiinipartikkelin lento- aika, eli se aika, kauanko sillä kestää saavuttaa detektori, riippuu sen massasta ja varauk- sesta. Lentoaika mitataan detektorilla, johon partikkelit osuvat vakuumitilassa lentämi- sensä jälkeen. Muodostuu mikrobispesifinen proteiinispektri, jota verrataan tuhansiin tie- tokannan referenssiproteiinispektreihin ja näin mikrobi saadaan tunnistettua. Vallitseva

partikkelilöydös, jonka VITEK MS tunnistaa, ovat ribosomaaliset proteiinit, mutta myös sytoplasman proteiineja havaitaan. (Dingle, T. & Butler-Wu, S. 2013. 590-591.)

3.3.2 Rihmasienten esikäsittely

Rihmasienet esikäsitellään ennen analysointia VITEK MS-laitteella, toisin kuin bakteerit ja hiivat, jotka ovat analysoitavaksi kelpaavaa materiaalia sellaisenaan. Rihmasienten seinämä on paljon paksumpi kuin bakteereilla ja hiivoilla ja ilman esikäsittelyä laite ei pysty ionisoimaan niiden proteiineja. Reagenssipakkauksena Fimlab Laboratoriot Oy:ssä toimii Biomerieuxin VITEK MS Mould Kit, joka koostuu kolmesta eri reagenssista. (Korhonen. 2017; Hirvonen. 2017.)

Ensimmäinen käytettävä reagenssi on 70 % etanoli, joka uuttaa rihmasienten proteiinit. Lisäksi se inaktivoi sienet, jonka jälkeen sieni-itiöiden leviämisvaaraa ei pitäisi olla. Kuitenkin varmuuden vuoksi koko esikäsittely tulee tehdä vetokaapissa. Etanolia pipetoidaan mikroputkeen, johon suspensoidaan myös viljelymaljalta kerätty näyttemateriaali. Mikroputkessa oleva näyte sekoitetaan vorteksoimalla ja sentrifugoidaan, jonka jälkeen mikroputkesta poistetaan supernatantti niin, että jäljelle jää pelkkä sienisakka. Vorteksointi sekoittaa nestemäisen näytteen värähtelyn avulla luomalla siihen pyörteen. Tämän jälkeen putkeen lisätään 70 % muurahaishappoa, joka hajottaa sienen seinämää. Mikroputki sekoitetaan vorteksoimalla, jonka jälkeen lisätään asetonitriiliä, joka kerrosta muurahaishappo-etanoliseoksessa olevat proteiinit kerroksiin, jolloin laite pystyy ionisoimaan ja tunnistamaan sienien proteiinit. Näyttemateriaali sekoitetaan vorteksoimalla ja sentrifugoidaan, jonka jälkeen sienten proteiinit ovat supernatantissa. Näytteen esikäsittely on valmis ja supernatanttia pipetoidaan yksi mikrolitra analysaattorin näytelevylle. Supernatantin annetaan kuivua näytelevyn ympärään ja siihen lisätään näytematriisia, joka vielä helpottaa proteiinien ionisoitumista. (Korhonen. 2017; Hirvonen. 2017.)

4 TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT

Tavoitteena on tuottaa tietoa Fimlabille Biomeriéuxin Vitek MS Mould –reagenssipakkauksen esikäsittelymenetelmän toimivuudesta, nopeuttaa hoitoketjua sekä saada reagenssipakkauksella tehtävästä tutkimuksesta toimiva sienidiagnostiikan menetelmä. Tavoitteena on siis saada selville kyseisen esikäsittelymenetelmän toimivuus VITEK MS MALDI-TOF laitteella ja vertailla, nopeuttaako sen käyttö rihmasienten tunnistusta niin, että se kannattaa ottaa käyttöön uutena tutkimusmenetelmänä. Tutkimukseen käytettävät näytteet koostuvat potilasnäytelöydöksistä, joita esikäsitellään reagenssipakkauksen reagensseilla ja tunnistetaan VITEK MS-laitteella. Tavoitteena on tutkia noin 100 näytettä. Opinnäytetyön tarkoituksena on koestaa rihmasienten tunnistusreagenssipakkaus Fimlab laboratoriot oy:n Tampereen mikrobiologian yksikölle Vitek MS –laitteelle. Vertailua tehdään tämän uuden menetelmän ja nyt käytössä olevan sienten laboriodiagnostiikan välillä.

Työn pääpaino on näytteiden esikäsittelyssä ja niiden tunnistuksessa Vitek MS-laitteella. Tämän tutkimusprosessin jokaisessa työvaiheessa tarkkuutta vaaditaan näytteiden käsittelyssä ja identifioinnissa. Tutkimusmenetelmän käyttöominaisuuksia ja tulosten luotettavuutta vertaillaan.

Tutkimustehtäviä ovat:

1. Onko koestettava reagenssipakkaus käyttökelpoinen rihmasienten diagnostiikassa?
2. Ovatko saadut tulokset luotettavia ja vertailukelpoisia?
3. Vaikuttaako rihmasienen kasvunvaihe massaspektrometrianalyysin onnistumiseen?

5 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tutkimus on kvantitatiivinen tutkimus, jossa kerätään ja analysoidaan tutkimusaineistoa. Tutkimusotoksena on 68 potilasnäytettä, joka on tavoitetta niukempi. Tutkimuksen analysoinnissa käytetään apuna tilastollista työkalua Exceliä. Tutkimusaineisto koostuu potilasnäytteistä saaduista analyysituloksista.

Fimlabin Tampereen yksikön mikrobiologian laboratoriossa on säilytetty tutkimusta varten oikeita potilasnäytteitä ja lisäksi käytössä on tuoreita potilasnäytteitä. Käytännön osuus toteutuu suunnitelman mukaisesti kahtena eri kertana. Ensimmäinen kerta toteutetaan 11.-12.5.2017 välisenä aikana, jolloin tutustutaan sienilaboratorion toimintaan ja kokeillaan näytteiden esikäsittelyä sekä VITEK MS-laitteen käyttöä. Tarkoituksena on tuolloin saada hieman rutiinia työn eri vaiheisiin, sillä sienten esikäsittely vaatii muista mikrobiologisista näytteistä poiketen enemmän aikaa. Toisella kerralla (vk 33) on jo tiedossa mitä odottaa, joten näytteiden käsittely ja analysointi pystytään aloittamaan nopeasti. Alla oleva taulukko (Taulukko 1) kuvaa tutkimuksen tekoaikataulua, joka tehtiin suunnittelu- vaiheessa.

Taulukko 1. Työskentelyn aikataulu

Kevät 2017	Tutkimussuunnitelma valmiina, tutustuminen sienilaboratorioon, kokeellisen osuuden suorituksen aloitus viikolla 19
Syksy 2017	Kokeellisen osuuden suoritus loppuun viikolla 33 aineiston keruu, raportin kirjoittaminen
Talvi 2017-18	Raportin kirjoittaminen, aineiston analysointi
Kevät 2018	Pohdinta, raportin viimeistely ja työn palautus
Syksy 2018	Työn esittely

6 RIIHMASIENTEN TUNNISTUSMENETELMÄN KOESTUS VITEK MS-LAITTEELLE

6.1 Suunnitteluvaihe

Tutkimussuunnitelma tehtiin ja tarvittavat tutkimusluvut haettiin keväällä 2017. Mikrobiologian sienilaboratoriossa tehtäviin diagnostisiin menetelmiin tutustuttiin ja Biomeriëuxin VITEK ® MS Mould reagenssipakkauksella tehtävään esikäsitteilymenetelmän käyttöön perehdyttiin kahden päivän ajan myös keväällä 2017. Opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin Fimlab laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriossa syksyllä 2018, jolloin koestettiin uusi Biomeriëuxin VITEK ® MS Mould Kit rihmasienille tarkoitettu esikäsitteilymenetelmän reagenssipakkaus VITEK ® MS MALDI TOF-laitteelle.

6.2 Toteutusvaihe

Näytteet käsiteltiin reagenssipakkauksen avulla ja analysointi suoritettiin VITEK ® MS-laitteella. Referenssimenetelmänä oli laboratorioammattilaisten diagnostisessa käytössä olevat tutkimusmenetelmät. VITEK ® MS-laitteella saatuja tuloksia verrattiin siis referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin. Näillä menetelmillä saatujen tulosten yhtenevääsyyttä tutkittiin Excel-taulukkolaskentaohjelmaa apuna käyttäen.

6.2.1 Näytteiden esikäsitteily

Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian sienilaboratoriossa oli varattu potilasnäytteitä tätä tutkimusta varten. Sienilaboratorion työntekijät olivat viljelleet potilasnäytteissä olevat dermatofyytit DTM-maljoille ja homeet maltoosimaljoille. Osa säästetyistä näytteistä oli ehtinyt kasvaa maljoilla 4-5 kuukautta ja osa oli kasvanut 2-4 viikkoa. Otimme tutkimukseen mukaan myös sen hetkisiä diagnostisissa tutkimuksissa olevia potilasnäytteitä, jotka olivat kasvaneet alle 2 viikkoa. 4-5 kuukautta maljoilla olleet kasvustot olivat ylikasvaneita, 2-4 viikkoa kasvaneet kasvustot olivat eksponentiaalisessa kasvun vaiheessa ja alle viikkoa kasvaneet olivat hyvin tuoreita kantoja, eivätkä ne olleet vielä todennäköisesti saavuttaneet eksponentiaalista kasvun vaihetta.

Maljoille viljellyt potilasnäytteet esikäsiteltiin pakkauksen reagenssien avulla reagenssipakkauksen valmistajan ohjeiden mukaisesti. Suurimmassa osassa näytteistä kasvoi dermatofyytti ja muutamassa kasvoi home. Ensimmäiseksi pipetoitiin 70 % etanolia 900 µl muoviseen kartiopohjaiseen näyteputkeen, jota kutsutaan eppendorf-putkeksi. Tämän jälkeen suoritettiin näytteen keräys. Näytettä kerättiin kertakäyttöisellä puutikulla (Kuva 31) tai ionivaihdettuun veteen kostutetulla pumpulipuikolla viljelymaljalta 1-2 cm alueelta riippuen pesäkkeen koostumuksesta. Näyte lisättiin etanolia sisältävään eppendorf-näyteputkeen (Kuva 32 ja 33). Näyteputki sekoitettiin vorteksoimalla ja sentrifugoitiin 2 minuuttia 12 000 x g kierrosnopeudella, jotta näyttemateriaali saatiin putken pohjalle. Vorteksointi luo nestemäiseen näytteeseen voimakkaan pyörteen, jonka avulla näyte sekoituu.

Tämän jälkeen putkesta poistettiin kertakäyttöisellä lasipipetillä supernatantti eli neste-faasi, jolloin putken pohjalle pellettinä jäi näyttemateriaali. Supernatantti tuli poistaa tarkasti ja varoa, ettei näyttemateriaalia poista putkesta. Supernatantin poistaminen oli kuitenkin nopea työvaihe, sillä näyttemateriaali pysyi napakasti eppendorf-putken pohjalla. Näyteputkeen lisättiin 70 % muurahaishappoa 40 µl ja 100 % asetonitriiliä 40 µl. Pipettiin tuli vaihtaa kärki jokaisen pipetoinnin välillä kontaminaatioiden välttämiseksi. Putki sekoitettiin vorteksoimalla kummankin reagenssin lisäyksen jälkeen. Näyteputkea sentrifugoitiin 2 minuutin ajan 12 000 x g kierrosnopeudella, jotta näyttemateriaali saatiin putken pohjalle. Esikäsitellyt näytteet jätettiin laminaarikaappiin säilytykseen siihen asti, kunnes VITEK® MS-laitteelta oli saatu tulokset (VITEK® MS MOULD KIT. 2016. 1).



Kuva 31. Näyttemateriaalin keräys



Kuva 32. Näyttemateriaalin sekoitus etanoliin



Kuva 33. Näyttemateriaali etanolin seassa

(Kuva 31-33: Rannikko Emmi. 2017.)

6.2.2 Näytelevyn valmistaminen

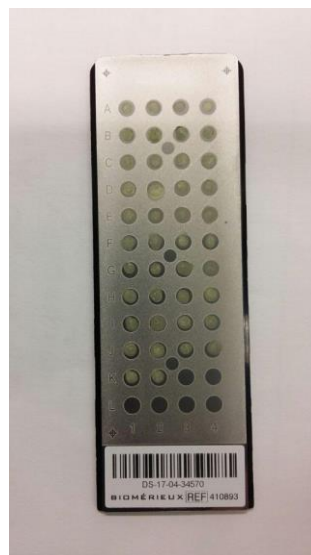
Näytteet pipetoitiin näytelevyn näyteympyröihin (Kuva 34). Jokaisesta näytteestä laitettiin 1 µl supernatanttia näyteympyrään. Yhdestä näytteestä laitettiin supernatanttia kahden eri näyteympyrään, tällä tavalla lisättiin todennäköisyyttä VITEK® MS-laitteen tunnistuksen onnistumiseen. Näytematriisi helpotti näytteen proteiinien ionisaatiota analyysivaiheessa.

Näytteiden esikäsittelyssä toinen suoritti laminaarikaapissa tapahtuvan työskentelyn. Toinen taas sentrifugoi ja sekoitti näyteputket vorteksoimalla sekä avusti laminaarikaapissa työskentelevää muun muassa antamalla työvälineitä ja laittamalla pois viljelymaljat, joista näytteet oli kerätty. Näytelevy (Kuva 35) valmistettiin niin, että toinen laittoi levyille ensin puolet näytteistä ja toinen laittoi loput näytteet. Näytteitä saatiin tehtyä näytelevylle 15-20 näytettä päivässä. Lisäksi edellisen päivän esikäsittelyt näytteet, joista ei oltu saatu tuloksia, pipetoitiin uudestaan näyteympyröihin.

Näytteet pipetoitiin näyteympyröihin yksitellen niin, että näytemateriaalin annettiin kuivua ympyrään, jonka jälkeen lisättiin 1 µl matriisiliuosta ennen kuin siirryttiin seuraavaan näytteeseen. Näytteen tuli kuivua täysin ennen näytematriisin lisäystä. Tämä näytteiden yksitellen kuivuminen oli eniten aikaa vievä työvaihe. Näytteet levitettiin mahdollisimman tasaisesti ympyröihin pipetinkärkeä apuna käyttäen, mutta näytteiden ollessa neste-mäisiä, osa niistä levittyi hyvin ja osa taas jäi pisaraksi ympyrään. Kun näyte jäi pisaraksi, sitä ei kannattanut yrittää levittää turhan pitkään, sillä näyte voi tarttua takaisin pipetin kärkeen, jolloin näyte on pipetoitava uudestaan.



Kuva 34. Näytemateriaalin pipetointi näytelevylle (Kuva: Rannikko. 2017.)



Kuva 35. VITEK ® MS-laitteen näytelevy (Kuva: Rannikko. 2017.)

6.2.3 Näytteiden ja tulosten analysointi

Näytteet esikäsiteltiin ja näytelevy valmistettiin sienilaboratorion laminaarikaapissa. VITEK ® MS MALDI TOF-laite sijaitsi toisaalla mikrobiologian laboratoriossa, joten näytteiden tiedot ja paikat näytelevyllä kirjattiin paperille ennen analysointia, jolloin sama järjestys pysyi myös kirjatessa tiedot laitteen tietokoneelle. Tietokoneelle kirjattiin siis näytenumerot ja niiden paikat näytelevyllä aiemmin kirjatun paperin mukaan. Kontrolliympyrään näytelevylle laitettiin *Escherichia coli*-bakteeria, jolla varmistettiin VITEK ®MS MALDI TOF-laitteen luotettava toiminta. Fimlab Oy:n henkilökunta laittoi kontrollinäytteen sille tarkoitettuun näyteympyrään näytelevyllä ja analysoi näytteet VITEK ® MS-laitteella.

Analyysien tulokset saatiin tulosteena aina seuraavana päivänä ja niistä nähtiin, minkä näytteiden analyysit olivat onnistuneet. Näiden tulosten perusteella valittiin näytteet uusinta-analyysiin. Näytteet, joista ei saatu tulosta massaspektrometrillä ensimmäisellä kerralla, analysoitiin toiseen kertaan edellisenä päivänä säästetyistä esikäsitellyistä näytemateriaaleista. Uusinta-analyysin avulla saatiin tulokset useammista näytteistä ilman, että koko esikäsitelyprosessi olisi täytynyt tehdä alusta asti uudestaan.

Näytteiden analysoinnin tulokset koottiin taulukkoon (Liite 1), johon näytteet kirjattiin näytteenumeron perusteella. Taulukkoon kirjattiin käytössä olevilla diagnostisilla menetelmillä saadut tunnistustulokset sekä VITEK® MS-laitteen antamat tulokset ja tunnistusprosentit, millä varmuudella tunnistuksen tulokseen voi luottaa. Lisäksi taulukkoon kirjattiin näytteiden kasvustojen iät. Tästä kerätystä informaatiosta tehtiin Excelillä tuloksia havainnollistavat kuvaajat näytteiden kasvuston iän vaikutuksesta tunnistuksen onnistumiseen sekä saatujen tulosten yhteneväisyydestä sienilaboratoriossa käytössä olevilla diagnostisilla menetelmillä ja VITEK® MS-laitteella.

6.3 Aseptiikka ja työturvallisuus

Rihmasienet, etenkin homeet, kontaminoivat ja kontaminoituvat erittäin helposti. Sienilaboratorion laminaarikaapissa on itsenäinen eristetty ilmankierto ja HEPA-suodatin (High Efficiency Particulate Air), joka pystyy imemään ilmassa olevia kontaminaatiopartikkeleita näytteenkäsittelyn aikana sekä tuottamaan steriilisuodatettua ilmaa työskentelytilaan. Laminaarikaappi suojaa työntekijää, ympäristöä ja näytteitä kontaminaatioilta (Laboline, laminaarivirtauskaapit).

Näytteiden käsittelyssä tuli olla erittäin tarkka varsinkin kontaminaatoriskin vuoksi. Näytemaljat oli suljettu parafilmillä, joustavalla muovikalvolla, jonka sai poistaa vasta, kun näytettä alkoi käsitellä laminaarikaapissa. Kaikki käytettävät maljat saivat olla yhtä aikaa laminaarikaapissa, mutta vain yksi malja kerrallaan sai olla avonaisena. Heti, kun näyttemateriaali saatiin kerättyä, maljoihin laitettiin uudestaan parafilmiä. Maljoja ei saanut myöskään kuljettaa ulos sienilaboratorion tiloista. Mikäli maljalla kasvava rihmasieni kontaminoisi toisen näytteen, aiheuttaisi tämä mahdollisesti väärän tunnistuksen kyseisestä näytteestä, mikä tarkoittaisi sitä, että potilaan sieni-infektiota alettaisiin mahdollisesti hoitaa väärin.

Sienilaboratorioon mentäessä on kaksi ovea, jotka eivät saaneet olla yhtä aikaa auki, tällä ehkäistiin sieni-itiöiden leviämistä ilman mukana muualle laboratorioon. Henkilökohtaisen aseptiikan toteutuminen, eli työvaatteiden ja suojakäsineiden käyttö sekä käsien pesu ja desinfiointi, ovat oleellisia kontaminaatioiden välttämiseksi ja työturvallisuuden takaamiseksi.

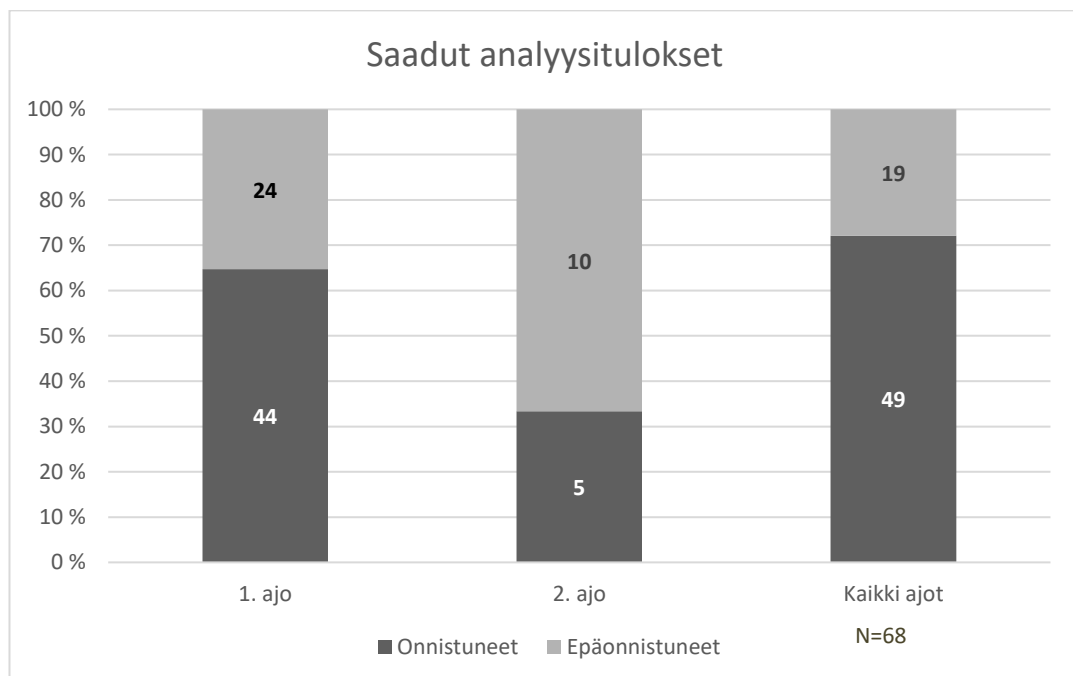
Ennen reagenssipakkauksen käyttöä tuli varmistaa, että kaikki reagenssia sisältävät purkit olivat ehjiä ja käyttökelpoisia. Näytteiden esikäsittelyyn käytetyt etanoli ja asetonitriili ovat erittäin helposti syttyviä, joten ne tuli pitää poissa kuumilta alueilta ja avoliekin sekä muiden tulentekolaitteiden läheisyydestä. Sekä etanoli, että asetonitriili voivat aiheuttaa voimakasta ärsytystä silmissä. Muurahaishappo eli metaanihappo on syövyttävää ja aiheuttaa vakavia palovammoja joutuessaan iholle tai silmiin. Kaikkia näitä reagensseja käsiteltäessä tuli olla varoivainen ja käyttää suojakäsineitä. (VITEK® MS MOULD KIT. 2016.)

7 TULOKSET

7.1 Analyysitulokset ja näytteiden kasvuajan vaikutus

Potilasnäytteitä oli kokonaisuudessaan 68, joista VITEK® MS-laite antoi joko saman tai eri tuloksen kuin referenssimenetelmä tai sitten laite ei onnistunut tunnistamaan näytettä ollenkaan. Jos laite ei ensimmäisellä kerralla tunnistanut näytettä, sille tehtiin uusinta-ajo samasta esikäsitellystä näytemateriaalista kuin aiemmin. Tällöin säästettiin aikaa, kun ei tarvinnut tehdä pitkää esikäsitelyä uudestaan. Ensimmäisellä analysointikerralla eli ensimmäisessä ajossa VITEK® MS antoi tunnistustulokset 44 näytteestä. Kokonaisuudessaan näytteitä oli 68, joten ensimmäisessä ajossa tulokset saatiin 65 prosentille näytteistä. 15 näytteelle tehtiin uusinta-ajo, jolloin tulokset saatiin 5 näytteelle. Tällöin tulokset saatiin 33 prosentille uudestaan ajetuista näytteistä. Yhdeksälle viimeisenä päivänä analysoidulle näytteelle ei ehditty tehdä uusinta-ajoa. Koko tutkimusaineiston 68 näytteestä tulokset saatiin 49 näytteelle eli 72 prosentille näytteistä (Taulukko 2).

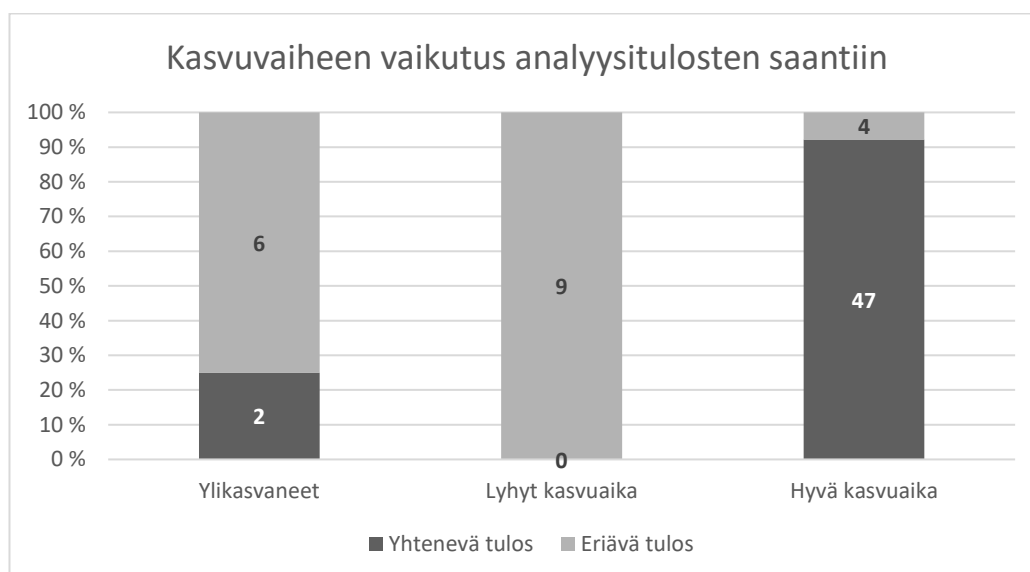
Taulukko 2. Saadut analyysitulokset.



Jotta näytteiden analysointi VITEK® MS-laitteella olisi onnistunut, olisi näytteissä kasvavien sienten tarvinnut olla eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa eli dermatofyyttien olisi pitänyt saada kasvaa viljelymaljalla 2-4 viikkoa ja homeiden muutamia päiviä tai maksimissaan viikko. Eksponentiaalista kasvunvaihetta on hankalaa määrittää, sillä siihen vaikuttavat monet tekijät, kuten esimerkiksi kasvunopeus, sienilaji ja -kanta. Voidaan kuitenkin yleistäen ajatella, että eksponentiaalinen kasvunvaihe sijoittuu yleensä päivästä viikkojen ikäisiin kasvustoihin. Sienikasvuston ollessa liian vanha, siihen on muodostunut liikaa mikrokonidioita ja sen pesäkemorfologia on alkanut muuttua rakeiseksi. Liian tuoreista tai ylikasvaneista näytteistä analysoinnin onnistuminen ei ole niin hyvin taattu kuin eksponentiaalisen kasvunvaiheen näytteistä. (Hirvonen. 2018; Korhonen. 2018.)

Ylikasvaneita näytteitä, jotka olivat 4-5 kuukautta vanhoja, oli kahdeksan, joista vain kahteen laite sai tunnistuksen. Alle 2 viikkoa kasvaneista näytteistä ei saatu ollenkaan analyysituloksia, tällaisia näytteitä tutkimuksessa oli yhdeksän kappaletta. Syynä sille, että tutkimustuloksia ei saatu näille yhdeksälle näytteelle, voi mahdollisesti olla myös se, että ensimmäisessä ajossa jokin muu asia vaikutti analyysin epäonnistumiseen ja niille ei myöskään ehditty tekemään uusinta-analyysia. 2-4 viikkoa kasvaneista, eli eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa olevista sieninäytteistä, jotka olivat kaikki dermatofyyttejä, tulokset saatiin 96 prosentille (Taulukko 3). Ylikasvaneet ja liian tuoreet näytteet alensivat koko tutkimuksen onnistumisprosenttia jopa 24 prosenttiyksikköä, joten todennäköisesti on merkittävää, että analysoitavien näytteiden sienten tulee olla eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa.

Taulukko 3. Kasvuvaiheen vaikutus analyysien saantiin.



7.2 Analyysitulosten yhteneväisyys referenssimenetelmän kanssa

49:stä onnistuneesti ajetusta näytteestä 42 näytteen tutkimustulokset VITEK® MS-laitteella ja käytössä olevin sienidiagnostisin menetelmin olivat yhteneväiset. Tulokset olivat noin 86 prosenttisesti yhteneväisiä. Eriäviä tuloksia suurimmaksi osaksi aiheuttivat *Trichophyton*-suvun sienet, mutta tähän todennäköisesti vaikutti se, että suurimassa osassa tässä tutkimuksessa mukana olleista näytteistä kasvoi *Trichophyton*-sukuun kuuluva sieni. VITEK® MS tunnisti käytössä olevien diagnostisten menetelmien avulla tunnistetun *Trichophyton mentagrophytes* aina *Trichophyton interdigitalena*, mutta koska *T. interdigitale* kuuluu *T.mentagrophytes* yläluokkaan, voidaan ajatella, että tunnistus on tapahtunut oikein. Lisäksi Fimlabin sienilaboratoriossa *T. interdigitalesta* potilasvastaus annetaan *T. mentagrophytes*enä (Taulukko 4).

Taulukko 4. VITEK® MS laitteen tulosten yhteneväisyys referenssimenetelmän kanssa

Laji	Yhtenevä tulos (kpl)	Eriävä tulos (kpl)	Ei tulosta VITEK® MS:llä	Yhteensä
<i>Trichophyton rubrum</i>	27	2	9	38
<i>Trichophyton tonsurans</i>	-	1	2	3
<i>Trichophyton violaceum</i>	2	1	1	4
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7	-	1	8
<i>Microsporum audouinii</i>	3	-	2	5
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	-	1	1
<i>Aspergillus terreus</i>	1	-	-	1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	-	-	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	-	-	1	1

7.3 Esikäsitelymenetelmän käyttökelpoisuus

Sarjatyöskentelyssä näytteitä oli 10-20, kun taas yksittäin tehtäessä koko esikäsitelyprosessi tehtiin vain yhdelle näytteelle. Sarja- ja yksittäistyöskentelyssä vertailtiin esikäsitelyyn kuluva aika, johon vaikutti kaikista eniten kuivumisaika eli se, annettiinko näyttemateriaalin kuivua rauhassa ennen matriisiin lisäystä ja siirtymistä seuraavan näytteen pipetointiin. Kuivumiseen meni aina noin viisi minuuttia ja nolla minuuttia tietenkin silloin, kun kuivumisaikaa ei odotettu, vaan siirryttiin heti seuraavaan näytteeseen. Sarja-

työskentelyssä, kun näytemateriaalin kuivuminen näyteympyrään odotettiin, yhden näytteen esikäsittelyyn kulunut aika oli 10 minuuttia. Kun kuivumista ei odotettu, oli yhden näytteen esikäsittelyyn kulunut aika 7,5 minuuttia. Kun esikäsiteltiin yksittäinen näyte, siihen kului aikaa 15 minuuttia (Taulukko 5).

Taulukko 5. Näytteiden tekoaikojen vertailua.

	kuivumisaika	min/näyte
sarjassa, kuivumisen odotus	5 min	10 min
yksittäin, kuivumisen odotus	5 min	15 min
sarjassa, ilman kuivumisen odotusta	0 min	7,5 min

Yksittäin tehtäessä näytteen tekoaika oli siis selkeästi pidempi sarjatyöskentelyyn verrattaessa. Jo pelkästään kolmasosa tekoajasta meni näyteympyrän kuivumiseen. Eri välineiden etsiminen ja putkien korkkien avaaminen ja sulkeminen vievät paljon ylimääräistä aikaa yhtä näytettä tehtäessä, kun taas sarjatyöskentelyssä niihin vievä aika ei ollut niin suuri osa koko tekoaikaan suhteutettuna.

Sarjatyöskentelyssä, missä kuivumisaika oli viisi minuuttia, eniten aikaa vievä työvaihe oli jälleen kuivuminen. Tällä kertaa muista työvaiheista oli saatu tekoaikaa lyhennettyä verrattaessa yksittäin tehtyyn näytteeseen, mutta silti kuivumiseen kulunut aika oli puolet yhden näytteen kuivumisajasta. Tällöin pipetoitiin siis mahdollisimman monet näytemateriaalit näyteympyröihin, kunnes huomattiin, että ensimmäiset näyteympyrät alkoivat olla kuivia. Matriisi tuli lisätä kuivuneen näytemateriaalin päälle mahdollisimman nopeasti, joten heti kun ensimmäiset ympyrät alkoivat kuivua, matriisin pipetoiminen aloitettiin. Kaikkia näytteitä ei pystytty pipetoimaan peräkkäin, koska välissä piti ehtiä pipetoimaan matriisi päälle. Kun matriisi oli saatu pipetoitua, jatkettiin näytemateriaalien pipetointia ympyröille kuten alussakin.

Rihmasienten esikäsittely on aikaa vievä prosessi, mistä johtuen se ei sovellu hyvin yksittäisten näytteiden käsittelyyn ja analysointiin. Sarjassa työskentely on huomattavasti

nopeampaa ja esikäsittelymenetelmä soveltuukin paremmin useamman näytteen yhtäaikaiseen analysointiin. Eniten VITEK® MS analysaattorista homeiden ja dermatofyyttien tunnistuksessa olisi apua harvinaisempien lajien tunnistuksessa, sillä sienilaboratorion henkilökunta tunnistaa yleisimmät sienilajit jo pesäkemorfologiasta, mutta harvinaisempien lajien tunnistus vaatii jatkotutkimuksia.

8 POHDINTA

8.1 Tutkimuksen käytännön suoritus

Rihmasieninäytteiden esikäsittely oli monivaiheinen prosessi ja työskentely vaati tarkkuutta. Sairaalamikrobiologi Jari Hirvosen hyvin laatima yksityiskohtainen työohje helpotti työn suoritusta etenkin alkuvaiheessa, kun työskentelyssä ei ollut vielä rutiinia. Työn suoritukseen saatiin apua Fimlabin sienilaboratorion henkilökunnalta aina, kun sitä tarvittiin.

Näytteen keräyksessä puutikku toimi vanutikkua paremmin, näytemateriaalia oli helpompi raaputtaa maljan pinnasta ja se myös irtosi paremmin puutikusta etanolin sekaan. Pumpulimaisista pesäkkeistä oli helpompi kerätä näytemateriaalia, kuin vahamaisista tasisista pesäkkeistä, sillä näytemateriaali oli maljassa kiinni löyhemmin ja irtosi helposti raaputtamalla. Vahamaisista pesäkkeistä tarvitsi saada irti pieniä palasia, jotta näytemateriaali saatiin kerättyä onnistuneesti. Kerätyn näytemateriaalin määrällä ei huomattu olevan vaikutusta tulosten saatavuuteen. Työvaiheena näytemateriaalin keräys oli aikaa vievä. Näytemaljojen ympärillä oleva parafilmi tuli poistaa, näyteputket identifioida, kerätä näyte ja maljat sulkea jälleen parafilmillä näytteen keräyksen jälkeen. Sentrifugoinnit ja supernatantin poistaminen näyteputkesta olivat nopeita työvaiheita suorittaa, vaikkakin sentrifugi sijaitsi viereisessä huoneessa.

Näytteiden pipetointi näytelevyn ympyröihin oli tarkkaa työskentelyä, sillä näyteympyrät olivat pieniä ja lähellä toisiaan. Ensimmäisillä kerroilla pipetointi oli hidasta, mutta rutii-
nin löytyessä työskentely nopeutui. Näytemateriaalia haluttiin ohut kerros mahdollisimman tasaisesti koko näyteympyrän alueelle, jotta VITEK® MS-laite pystyisi helpommin tunnistamaan näytteen. Näytemateriaali oli nestemäistä ja se levittyi melko huonosti näytelevyn ympyrään. Usein näytemateriaali jäi pisaraksi näytelevyn ympyrälle. Vaikka näyte jäi pisaraksi näyteympyrään eikä levinyt kunnolla, ei tämän kuitenkaan huomattu vaikuttavan tuloksiin.

8.2 Tutkimusaineisto

Reagenssipakkauksen koestuksen tulokset eivät ole yleistettävissä tutkimusaineiston jäädessä vähäiseksi. Tutkimusaineiston näytemäärä oli 68 näytettä, mikä jäi selkeästi vajaaksi tavoitellusta sadasta näytteestä. Laboratoriossa ei ollut sillä hetkellä enempää potilasnäytteitä analysoitavaksi. Tutkimusta varten oli säästetty vain harvinaisempia näytteitä, joita ei joka päivä tule vastaan. Muutoin tutkimusaineisto koostui sillä hetkellä sienilaboratoriossa tutkimuksessa olevista näytteistä. Rihmasienten esikäsitteilyyn kuluva aikaa ei myöskään osattu ennakoida etukäteen, joten ei tiedetty kuinka monta näytettä tutkimukseen varatun ajan puitteissa, eli viikon aikana ehdittäisi käsitellä.

Tutkimusaineiston eri sienilajien edustavuus oli todella suppea, sillä analysoitavat näytteet koostuivat suurimmaksi osaksi yleisimmistä dermatofyyteistä, kuten *Trichophyton*-suvun yleisimmistä lajeista. Pelkästään *Trichophyton rubrumia* kasvoi 38 näytteessä, mikä on yli puolet koko tutkimusaineiston koosta. *Microsporum audouinii* kasvoi viidessä näytteessä ja muiden lajien sieniä oli vain yksittäisiä. Luultavasti *Trichophyton* lajin suuren edustavuuden vuoksi, eriävät tuloksetkin olivat *Trichophyton* lajeissa. Homelajeja oli tutkimuksessa mukana neljä ja näistä kahdesta saatiin tulokset VITEK® MS-laitteella, tosin epäonnistuneiden homeiden analyysit olivat sellaisten näytteiden kohdalla, joiden kasvustojen ikä oli jo ylittänyt eksponentiaalisen kasvunvaiheen.

VITEK® MS-laitteen analyysitulokset eivät tämän koestuksen kohdalla kuitenkaan ole täysin luotettavia, sillä referenssimenetelmään verrattuna tulosten yhteneväisyys oli noin 86 prosenttia. Absoluuttisissa määrissä puhutaan kuitenkin vain siis neljästä eriävästä tuloksesta tutkimusaineiston ollessa kooltaan pieni. Pieni eroavaisuus laitteen ja referenssimenetelmän välillä on ymmärrettävää. Koestuksessa kuitenkin huomattiin yhdessä tapauksessa laitteen tunnistavan näytteen *Paecilomyces variotiiniksi* eli saprofyttiseksi homeeksi, kun kyseessä oli referenssimenetelmän mukaan *Trichophyton violaceum*. Tällaisen tapauksen kohdalla voidaan miettiä, onko VITEK® MS tunnistanut sienilajin väärin vai onko näytteessä mahdollisesti ollut kontaminaatio, jota ei silmin ole pystytty näytemaljalta havaitsemaan.

8.3 Eettisyys ja luotettavuus

Työn eettisyyden säilyttämiseksi potilasnäytteitä käsiteltiin noudattaen vaitiolovelvollisuutta sekä kunnioittaen näytteen ainutlaatuisuutta, potilaan yksityisyyttä ja oikeuksia. Sieninäytteet ovat erityisen ainutlaatuisia, sillä potilaan tulee olla pitkä aika käyttämättä sienilääkityksiä ennen näytteenottoa ja lisäksi näytteitä otetaan vain muutamissa näytteenottopisteissä, joten jonot näytteenottoon ovat pitkät. Ainutlaatuisuutta lisää vielä sienien pitkä kasvuaika ja osaamista vaativa laboratoriotyöskentely. Työskentelyssä oli otettava huomioon työturvallisuus, sillä käytettävät reagenssit olivat haitallisia, syövyttäviä ja helposti syttyviä. Reagenssien käyttöturvatieotteet luettiin etukäteen. Lisäksi sienet leviävät ja kontaminoivat helposti, joten työskentelyssä tuli olla erityisen huolellinen ja aseptinen. Tutkimuksessa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Opinnäytetyössä olevien kuvien käyttöön kysyttiin lupa niiden omistajilta. Opinnäytetyötutkimus on suoritettu ja koestus raportoitu yksityiskohtaisesti niin, että se on toistettavissa, mikä tekee tästä luotettavasti ja eettisesti suoritettua tutkimusta.

8.4 Sienilaboratorion henkilökunta

Fimlabin sienilaboratorion henkilökunta on saanut pitkän perehdytyksen sienilaboratorion tutkimusmenetelmiin ja käytäntöihin. He ovat tottuneet käyttämään nykyisiä tutkimusmenetelmiä ja sienilajien tunnistus sujuu nopeasti kyseisillä menetelmillä. Yksittäisten näytteiden analysointi VITEK® MS-laitteella on suhteellisen hidasta kaikkien esikäsittelyvaiheiden johdosta, analyysin onnistuminen ei ole varmaa ja analysointia saatetaan joutua tekemään toiseen tai kolmanteenkin kertaan tulosten saamiseksi. Sienilaboratorion henkilökunta kokee nykyisin käytössä olevat menetelmät toimiviksi, luotettaviksi ja nopeiksi. Mikäli VITEK® MS-laitteen toiminta saataisiin koestettua suuremmalla ja monipuolisemmalla tutkimusaineistolla, olisi massaspektrometriasta varmasti apua etenkin harvinaisempien lajien tunnistuksessa.

8.5 Aikaisemmat tutkimukset

Tutkimuksia dermatofyyttien ja homeiden tunnistamisesta käyttäen VITEK® MS:n MALDI-TOF tekniikkaa on tehty onnistuneesti. Useissa tutkimuksissa BioMérieuxin referenssitietokantaa oli muokattu ja siihen lisätty lajeja. Kaikkien näiden tarkasteltujen tutkimusten tarkoituksena on ollut nopeuttaa laboratoriodiagnostiikkaa.

McMullenin ym. vuonna 2016 julkaisemassa tutkimuksessa tutkittiin 319 Aspergillusta kasvavaa näytettä 43:sta eri suvusta, näistä 319 homeesta VITEK® MS tunnisti oikein 66,8 prosenttia. Tutkimuksessa referenssitietokantana oli VITEK® MS Knowledge base, versio 3.0. Kun tietokannan kokoa kasvatettiin SARAMIS-tietokannan (Spectral Archive and Microbial Identification System) avulla, tunnisti VITEK® MS 76,8 prosenttia homeista oikein. Tunnistamattomat homeet ajettiin uudestaan massaspektrometrillä, mutta niistä ei tunnistustulosta saatu. Suurin osa näistä lajeista ei sisältynyt tietokantaan. Vain kolme näytettä eli 0,9 prosenttia VITEK® MS tunnisti väärin. Kokonaisuudessaan tulosten yhteneväisyysprosentti referenssimenetelmän kanssa oli 93,6 prosenttia. Nopeasti kasvavat lajit analysoitiin 2-3 päivän kasvatuksen jälkeen ja hitaasti kasvavat 7-10 päivän kasvatuksen jälkeen.

Iriartin ym. vuonna 2012 julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin 36 Aspergillusta kasvavaa näytettä, joista tunnistettiin 93,2 prosenttia tutkimuksessa olleista Aspergillus-lajeista oikein VITEK® MS:llä käyttäen MS-ID versio 1.0 tietokantaa. Tutkimuksessa ei käytetty esikäsitteilymenetelmää, vaan kasvustosta kerätty materiaali levitettiin suoraan näyteympyrälle, johon lisättiin matriisiliuosta. Aspergillus-sieniä oli kasvatettu kymmenen viikkoa ennen analyysien tekoa. Näissä molemmissa homeista tehdyissä tutkimuksissa referenssimenetelmänä toimi ruutini laboratoriodiagnostiikan menetelmät, kuten tässäkin opinnäytetyönä tehdyssä tutkimuksessa.

L'Ollivierin ym. vuonna 2013 julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin 133 dermatofyyttiä VITEK® MS-laitteella, joista 97,8 prosenttia tunnistettiin oikein. Kaksi näistä dermatofyyteistä eivät kuuluneet referenssitietokantaan ja yhden dermatofyytin VITEK® MS tunnisti väärin. Tutkimusta varten rakennettiin referenssitietokanta 17:sta eri lajin yhteensä 48:sta dermatofyyttiä kasvavasta näytteestä, joiden ominaisuudet oli hyvin karakterisoitu. Nämä samat lajit tunnistettiin VITEK® MS:llä. Referenssimenetelmän ja VITEK® MS:llä saatujen tulosten yhteneväisyysprosentti oli 99,2 prosenttia. Tutkimuksen

tulokset saatiin 3-6 päivässä, jo ennen kuin dermatofyyttien morfologiset ominaisuudet näkyivät maljalla.

Theelin, Hallin, Mandrekarin ja Wengenackin vuonna 2011 tekemässä tutkimuksessa tutkittiin 171 dermatofyyttiä VITEK® MS-laitteella. Käytettäessä VITEK® MS versio 3.0-tietokantaa, tunnistettiin 37,4 prosenttia oikein sukutasolla ja 20,5 prosenttia lajitasolla. Kun tietokantaa kasvatettiin 20 lajilla, oikein tunnistettiin 93 prosenttia sukutasolla ja 59,6 prosenttia lajitasolla. Referenssimenetelmänä oli geenisekvensointi. Sieninäytteitä oli kasvatettu kolme päivää ennen tutkimusta.

8.6 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyönä tehdyn tutkimuksen tarkoituksena oli saada toimiva esikäsittelymenetelmä rihmasienille, jotta ne voitaisiin tunnistaa VITEK® MS MALDI-TOF-laitteella, jotta tutkimusvastaukset saataisiin potilaalle nopeammin. Tutkimuksen tulokset eivät ole yleistettävissä tutkimusaineiston ollessa kooltaan pieni ja yksipuolinen. Koestulla reagenssipakkauksen esikäsittelymenetelmällä olisi siis vielä aihetta jatkotutkimukseen monipuolisemmalla ja laajemmalla tutkimusaineistolla, joka pitäisi sisällään eri sukuihin kuuluvia rihmasienilajeja. Jatkotutkimuksessa voisi mahdollisesti myös miettiä referenssitietokannan koon kasvattamista, kuten useissa aiemmin tehdyissä tutkimuksissa on tehty, sillä se on kasvattanut VITEK® MS:llä tehtävien tunnistusten onnistumisprosenttia.

Reagenssipakkauksella tehtävää esikäsittelymenetelmää oli mielenkiintoista koestaa. Rihmasienten tunnistukseen ja sienilaboratorion toimintaan päästiin tutustumaan lähemminkin. Koulussa rihmasienten laboriodiagnostiikan opiskelu jää melko vähäiseksi ja oli hienoa päästä oppimaan syvällisemmin rihmasienilajeista, niiden aiheuttamista infektioista ja laboriodiagnostiikasta sekä tulevaisuuden diagnostiikan mahdollisuuksista.

Fimlabin sienilaboratoriossa työskentelee päivittäin yksi ihminen ja tilat ovat melko pienet, mutta kattavat. Työpiste saatiin järjestettyä niin, että työskentely sujui ergonomisesti ja mutkattomasti ilman turhia liikeratoja. Ainoana työskentelyvälineenä sentrifugi sijaitsi

toisessa huoneessa. Tämänkin työvaihe saatiin optimoitua niin, että toinen kävi sentrifugoimassa näytteet ja toinen viimeisteli edellisen työvaiheen ja valmisteli seuraavan.

Fimlabin mikrobiologian sienilaboratorion työntekijät ovat kokeilleet uutta esikäsittelymenetelmää käytännössä. Osan tutkituista näytteistä VITEK® MS tunnistaa hyvin. Yhdessä laaduntarkkailunäytteessä oli kuitenkin esiintynyt tunnistusvirhe, kun laite oli tunnistanut homenäytteestä tehdyt näyteympyrät toisen dermatofyytiksi ja toisen hiivaksi. VITEK® MS-laitteella tehtävä tunnistus ei siis ole vielä sellaisella tasolla, että työntekijä voisi siihen täysin luottaa, joten taito tunnistaa sieni muilla käytetyillä menetelmillä on ensiarvoisen tärkeää. Työntekijä luottaa tällä hetkellä vielä enemmän omiin mikrosko-pointitaitoihinsa kuin laitteen tunnistukseen, mutta uuden menetelmän kokeilu ja tulosten vertailu jatkuvat.

Olisimme halunneet päästä suorittamaan reagenssipakkauksen esikäsittelymenetelmän koestuksen laajemmalla monipuolisemmalla tutkimusaineistolla, jotta tämän tutkimuksen tulokset olisivat paremmin yleistettävissä ja olisimme nähneet kuinka hyödyllinen VITEK® MS-laite voisi olla rihmasienten tutkimuskäytössä. Saimme kuitenkin jo kattavaa tutkimustietoa näytteiden kasvuvaiheen vaikutuksista analyysitulosten saatavuuteen ja siitä, kuinka esikäsittelyn suorittaminen kannattaa optimoida ajan säästämiseksi.

LÄHTEET

Aspergillus and Aspergillosis website. What is Aspergillus and Aspergillosis? 2012. Luettu 2.5.2018

<https://www.aspergillus.org.uk/what-is-asp>

CDC. Aspergillosis. 2017. Luettu 17.3.2018.

<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/index.html>

Chander, J. Aspergillus and Aspergillosis website. Aspergillus Otomycosis. 2009. Luettu 2.5.2018.

<https://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-otomycosis>

De Hoog, G., Guarro, J. & Figueras, M. 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2. painos. Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili.

Dermnet New Zealand. Tinea barbae. DermNet New Zealand Trust. 2003. Luettu 30.11.2017.

<https://www.dermnetnz.org/topics/tinea-barbae/>

Dermnet New Zealand. Tinea corporis. DermNet New Zealand Trust. 2003. Luettu 14.5.2018.

<https://www.dermnetnz.org/topics/tinea-corporis/>

Dingle, T. & Butler-Wu, S. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. Automation and Emerging Technology in Clinical Microbiology. 2013. Artikkel. Luettu 27.11.2018.

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Aspergillus.

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/aspergillus/> Luettu 13.2.2018.

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Epidermophyton.

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/epidermophyton/> Luettu 30.11.2017.

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Fusarium. Luettu 14.2.2018.

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/fusarium/>

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. KOH with Calcofluor White. Luettu: 8.12.2017.

<https://mycology.adelaide.edu.au/laboratory/calc/>

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Microsporum.

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/microsporum/> Luettu
30.11.2017.

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Scedosporium. Luettu 14.2.2018

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/scedosporium/>

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Scopulariopsis. Luettu 13.2.2018.

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/scopulariopsis/>

Ellis, D. & Kidd, S. Mycology Online. Trichophyton.

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/> Luettu
30.11.2017

Fimlab ohjekirja. 2017. Sieni, viljely (pintasieniviljely, sisältää värjäyksen)

https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tpl?sivu_id=194;setid=6843;id=17168

Fimlab ohjekirja. 2017. Sieni, viljely (syvä sieniviljely, sisältää värjäyksen)

https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tpl?sivu_id=194;setid=8213;id=17169

Hardy Diagnostics. Dermatophyte Test Medium (DTM). Luettu: 28.11.2017.

https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/DTM.htm

Hardy, J. Hardy Diagnostics. Lactophenol Cotton Blue Stain. Luettu. 15.2.2018.

https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/LactophenolCotton-BlStn.htm

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., Vaara, M. & Ahola, T. 2010. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: 1, Mikrobiologia. Helsinki: Kustannus Duodecim Oy.

Hirvonen, J. sairaalamikrobiologi, laboratoriopäällikkö. 2017 Pikaohje hiiva- ja sieninäytteiden viljelyyn. Haastattelu: 1.5.2017. Haastattelija Rannikko E., Sillanaukee M.

Hirvonen, J. sairaalamikrobiologi, laboratoriopäällikkö. 2018. Rihmasienten esikäsittely. Haastattelu: 11.12.2017. Haastattelija Rannikko E., Sillanaukee M.

Hodgson, U. 2010. Allerginen bronkopulmonaalinen aspergilloosi – muistetaanko sitä edes epäillä? Duodecim Oy. Luettu 3.5.2018

<http://www.duodecimlehti.fi/lehti/2010/4/duo98608>

Hopsu, E., Närkiö-Mäkelä, M., & Silvola, J. 2011. Miten ja milloin käytän korvaan tippoja? Duodecim Oy. Luettu 2.5.2018

<http://www.duodecimlehti.fi/lehti/2011/14/duo99654>

Huslab ohjekirja. 2017. Luettu: 8.12.2017.

http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=2630&terms=natiivitutkimus

Immuunipuutospotilaiden yhdistys. Luettu 24.3.2018.

<https://www.immuunipuutospotilaidenyhdistys.fi/>

Iriart, X., Lavergne, R., Fillaux, J., Valentin, A., Magnaval, J., Berry, A. & Cassaign, S. Routine Identification of Medical Fungi by the New Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight System with a New Time-Effective Strategy. 2012. Luettu 15.7.2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3372123/>

Kauffman, C. & Mandell, G. 2007. Atlas of Fungal Infections. 2. painos. Current Medicine LLC.

Korhonen, M. laboratoriohoitaja. 2017. Rihmasienten viljely. Haastattelu: 7.8.2017. Haastattelija Rannikko E., Sillanaukee M.

Korhonen, M. laboratoriohoitaja. 2018. Rihmasienten esikäsittely. Haastattelu: 11.12.2017. Haastattelija Rannikko E., Sillanaukee M.

Käypähoito a. Sieni-infektiot ihossa, hiuksissa ja kynsissä (diagnostiikka). 2010. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecimin ja Suomen Ihotautilääkäriyhdistys ry:n ja Kliiniset Mikrobiologit ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Luettu 2.11.2017.

<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi13050>

Laboline, suojaus- ja olosuhteiden hallinta, laminaarivirtauskaapit

<http://www.laboline.fi/tuotteet/suojaus-ja-olosuhteiden-hallinta/laminaarivirtauskaapit/luokan-ii-mikrobiologinen-suojakaappi>

Larone, D. 2011. Medically Important Fungi. Washington D.C: ASM Press.

Lee, Costumbrado, Hsu, Kim. 2012. Luettu: 28.11.2017

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>

L'Ollivier, C., Cassagne, C., Normand, A., Bouchara, J., Contet-Audonneau, N., Hendrickx, M., Fourquet P, Coulibaly, O., Piarroux, R. & Ranque, S. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. 2013. Luettu 14.7.2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611419>

McMullen, A., Wallace, M., Pincus, D., Wilkey, K., & Burnham, C. Evaluation of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinically Relevant Filamentous Fungi. 2016. Luettu 14.7.2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963483/>

Medline Plus. Plumonary Aspergilloma. 2016. Luettu 24.3.2018

<https://medlineplus.gov/ency/article/000127.htm>

Moulds Under The Microscope. Luettu: 13.2.2018.

<http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Examination.html>

Nisha Rijal. Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Principle, composition, uses and colony morphology. Microbe Online. 2015. Luettu: 28.11.2017.

<https://microbeonline.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-principle-composition-uses-colony-morphology/>

Oakley, A. 2003. Dermnet New Zealand. Mould infektiions. DermNet New Zealand Trust. Luettu 3.5.2018.

<https://www.dermnetnz.org/topics/mould-infections/>

Rogers, K. Conidium. Encyclopedia Britannica. 22.1.2008. Artikkel. Luettu 30.11.2017

<https://www.britannica.com/science/conidium#Article-History>

Sagar Aryal. Potato Dextrose Agar (PDA)- Principle, Uses, Composition, Procedure and Colony Characteristics. 2017. Luettu: 15.2.2018.

<https://microbiologyinfo.com/potato-dextrose-agar-pda-principle-uses-composition-procedure-and-colony-characteristics/>

Salonen, J. Sienet syvien infektioiden aiheuttajina

<http://docplayer.fi/17597643-Sienet-syvien-infektioiden-aiheuttajina-juha-salonen-lt-paijat-hameen-keskussairaala.html>

Theel, E., Hall, L., Mandrekar, J. & Wengenack, N. Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. 2011. Luettu 15.7.2018.

<http://jcm.asm.org/content/49/12/4067.full>

Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Brain Heart Infusion Broth. Luettu: 12.2.2018.

http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1135&c=UK&lang=EN

Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Proteose Peptone. Luettu: 12.2.2018.

http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=LP0085

Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Sabouraud Dextrose Agar. Luettu 28.11.2017.

http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0041&org=149&c=UK&lang=EN

Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Sabouraud Maltose Agar. Luettu 28.11.2017.

http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0541&org=61&c=UK&lang=EN

Tieteen termipankki. Nimitys: annelide. Luettu 13.2.2018.

<http://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:annelide>

Tieteen termipankki. Nimitys klamydospori. Luettu 30.11.2017.

<http://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:klamydospori>

Tieteen termipankki. Nimitys:konidiofori. Luettu 30.11.2017.

<http://www.tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:konidiofori>

VITEK® MS. Mass spectrometry microbial identification system. Biomérieux. Luettu 27.11.2018.

<http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-ms-0>

VITEK ® MS MOULD KIT. Menetelmäohje. Biomérieux. 2016.

KUVALÄHTEET

KUVA 1-3: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>

KUVA 4-5: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/microsporum/>

KUVA 6-7: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/epidermophyton/>

KUVA 8-12,16: Suhonen, R. LKT, prof, ihotautien erikoislääkäri. <http://www.ihotauti.net/galleria4.htm>

KUVA 13-15: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/mycoses/cutaneous/>

KUVA 18-20: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/aspergillus/>

KUVA 21: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/scopulariopsis/>

KUVA 22-23: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/fusarium/>

KUVA 24: Ellis, D. & Kidd, S. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/scedosporium/>

LITTEET

Liite 1. Tulostaulukko

Näyttenumero	Perinteisten menetelmien tulos	Vitek MS-laitteen tulos 1. kerta	Uusinta-ajo	Tunnistusprosentti	Näytteen ikä
S171099	Trichophyton tonsurans	-	Trichophyton Interdigitale	99.9	Tuore
S171328	Trichophyton violaceum	Trichophyton violaceum		50.0	Tuore
S172146	Microsporium audouinii	Microsporium audouinii		99.9	Tuore
S172204	Trichophyton rubrum	-	-	-	4 kk
S172284	Scopulariopsis brevicaulis	-	-	-	4 kk
S173598	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173629	Trichophyton violaceum	Trichophyton violaceum		99.9	Tuore
S173207	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S171520	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton interdigitale		99.7	Tuore
A1710161	Aspergillus terreus	Aspergillus terreus		99.9	Tuore
S172334	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S172253	Microsporium audouinii	Microsporium audouinii		97.5	Tuore
S173809	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum		99.9	Tuore
S174001	Trichophyton interdigitale	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S173982	Trichophyton interdigitale	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S173783	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173741	Trichophyton rubrum	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S173695	Trichophyton rubrum	-	Trichophyton Interdigitale	99.4	Tuore
S173718	Trichophyton violaceum	-	Paecilomyces variotii	50.0	Tuore
S173793	Tunnistamaton home	-	Trichophyton violaceum	99.9	Tuore
S173840	Negatiivinen (Acremonium)	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S173584	Trichophyton violaceum	-	-		Tuore
S173787	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
A1706683	Scedosporium apiospermum	-	-		4-5 kk
S171180	Microsporium audouinii	-	-		4-5 kk
S171289	Trichophyton rubrum	-	-		4-5 kk
S172048	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		98.5	4-5 kk
S172253	Microsporium audouinii	Microsporium audouinii		99.9	4-5 kk
S172252	Microsporium audouinii	-	-		4-5 kk
S4001	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton interdigitale		99.9	Tuore
S173924	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173904A	Epidermophyton floccosum	-	-		Tuore
S173882	Trichophyton rubrum	-	-		Tuore
S173880	Trichophyton rubrum	-	Trichophyton rubrum	64.5	Tuore
S173857	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173854	Trichophyton rubrum	Trichophyton violaceum		99.9	Tuore
S173858	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173863	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173883	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173893	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173898	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173899	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173901	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173935	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173951	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173972	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173842	Trichophyton tonsurans	-	-		Tuore
S173866	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173983	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S4012	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173997	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S173978	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.4	Tuore
S173979	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S174004	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S4017	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S174054	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S174092	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		98.9	Tuore
S174080	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S174111	Trichophyton rubrum	Trichophyton rubrum		99.9	Tuore
S174005	Negatiivinen (Staphylococcus sap-	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S174029	Trichophyton rubrum	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S174032	Negatiivinen (Stafylococcus saproc-	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S174052	Trichophyton tonsurans	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S173931	Trichophyton rubrum	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S174031	Trichophyton rubrum	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S174028	Trichophyton rubrum	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S173842	Trichophyton tonsurans	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore
S174085	Trichophyton mentagrophytes	-	Ei uusinta-ajoa		Tuore