



Veriviljelynäytteiden analysointi MALDI-TOF-menetelmällä

Bakteerien tunnistus lyhennetyillä kas- vatusajoilla

Pia Mikkonen

Heidi Raitio

Opinnäytetyö
Syyskuu 2014
Bioanalytiikan koulutusoh-
jelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
11BIO

MIKKONEN, PIA & RAITIO, HEIDI:
Veriviljelynäytteiden analysointi MALDI-TOF- menetelmällä
Bakteerien tunnistus lyhennetyillä kasvatusajoilla

Opinnäytetyö 51 sivua, joista liitteitä 1 sivua
Syyskuu 2014

MALDI-TOF on menetelmä, jolla voidaan luokitella mikro-organismeja taksonomisesti niiden proteiiniprofiilin mukaan. Opinnäytetyön tavoite oli testata MALDI-TOF-menetelmään perustuvaa VITEK® MS-laitteen soveltuvuutta veriviljelylöydösten tunnistamiseen lyhyillä inkubaatioajoilla. Tavoitteena oli tuottaa tietoa MALDI-TOF-menetelmästä ja sen hyödyntämisestä veriviljelytutkimuksessa. Perimmäinen tavoite oli nopeuttaa veriviljelydiagnostiikkaa. Opinnäytetyön käytännön osuus toteutettiin Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriossa.

Tarkoitus oli testata MALDI-TOF- menetelmän kykyä tunnistaa aerobibakteereja entistä lyhyemmällä kasvatusajoilla. Testauksesta rajattiin pois muut mikrobit, kuten hiivat. Normaalisti näytteitä inkuboidaan 18-24 tuntia ennen MALDI-TOF-analyysiä. Testauksessa inkubaatioaikaa lyhennettiin kahteen, neljään ja kuuteen tuntiin. Inkubaatioajan lyhentämisen vaikutusta testattiin menetelmän toimintaan. Tutkimuskysymyksessä pyrittiin selvittämään, voidaanko kasvavien veriviljelyiden bakteerit tunnistaa luotettavasti suositusajaa lyhyemmällä kasvatusajoilla. Opinnäytetyö on kvantitatiivinen ja kokeellinen. Testauksessa analysoitiin 100 positiivista veriviljelynäytettä, jotka oli kerätty etukäteen testausta varten.

Suurin osa näytteistä oli 1-3 viikkoa vanhoja, mistä johtuen kovin hyviä tunnistustuloksia ei saatu valittujen aikapisteiden kohdalla. Selkeä ero oli kuitenkin tuoreiden ja vanhojen näytteiden välillä. Tuorenäytteitä oli testauksessa vähän, mutta ne saatiin tunnistettua paremmin kuin vanhat näytteet. Johtopäätöksenä todettiin, että kasvatusajan lyhentämisen vaikutusta menetelmän toimivuuteen ei voi testata vanhoilla näytteillä. Vanhoissa näytteissä bakteerit olivat huonossa kasvuvaiheessa tai alkaneet jo kuolla. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin arvella, että lyhyempää inkubaatioaikaa voitaisiin käyttää nopeasti kasvaville bakteerilajeille. Jatkotutkimuksena ehdotettiin testauksen toistamista tuoreilla veriviljelynäytteillä.

ABSTRACT

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

MIKKONEN, PIA & RAITIO, HEIDI:
Analysis of Blood Culture Samples with MALDI-TOF Method
Bacterial Identification with Reduced Incubation Time

Bachelor's thesis 51 pages, appendices 1 page
September 2014

MALDI-TOF is a technology used in clinical microbiology laboratories. It is used to identify different micro-organisms from various sample materials such as blood and urine samples. The objective of this study was to test MALDI-TOF to identify bacteria with short incubation time. The focus of this study was to examine how the reduced incubation time affects on aerobic bacteria identification with MALDI-TOF. As a sample material we used positive blood culture samples. The purpose of this study was to speed up bacterial identification results of positive blood culture samples.

In this study we analyzed 100 positive blood culture samples with MALDI-TOF. The data were analyzed using quantitative content analysis. The recommended incubation time for MALDI-TOF samples is 18-24 hours. In this study the incubation time was shortened to 2, 4, and 6 hours. Most of the samples used were collected 1-3 weeks before the analysis.

The results stated that this kind of study can not be made using samples preserved for several weeks. The bacteria in these kind of samples were in inappropriate phase of growth and this affected our results significantly. However the results suggest that short incubation time seemed to apply to fast growing bacteria. As a conclusion we recommend reconducting the study using fresh blood culture samples.

Key words: MALDI-TOF, blood culture, identification of aerobebacteria

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	BAKTEERIEN TAKSONOMIA JA OMINAISUUDET	7
2.1	Taksonomia.....	7
2.2	Bakteerisolun rakenne.....	8
2.3	Bakteerien kasvu	9
2.4	Bakteerien metabolian säätely	10
3	VERIVILJELYTUTKIMUKSEN KULKU	12
3.1	Mitä veriviljelyssä tutkitaan?.....	12
3.2	Veriviljelynäytteet	12
3.3	Veriviljelytutkimus	13
4	PERINTEISET MIKROBIEN TUNNISTUSMENETELMÄT.....	16
4.1	Tunnistusmenetelmien käyttö	16
4.2	Tunnistusmenetelmät eri bakteerilajeille	18
4.2.1	Grampositiiviset kokkibakteerit	18
4.2.2	Gramnegatiiviset sauvabakteerit	20
4.2.3	Kaupalliset biokemialliset tunnistuskitit	20
5	MALDI-TOF- MENETELMÄ.....	22
5.1	Näytteenvalmistus.....	24
5.2	Mikrobien tunnistus tietokantojen avulla	27
5.3	Vaikeasti tunnistettavat lajit.....	29
6	TULOKSEEN VAIKUTTAVIA SEIKKOJA.....	30
6.1	Näytteen esivalmistelu	30
6.2	Matriisi.....	31
6.3	Inkubaatioaika.....	33
6.4	Laitteisto	35
7	TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE.....	36
8	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	37
9	TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	39
10	TULOKSET	41
10.1	Aineiston analyysi.....	41
10.2	Tulokset ja johtopäätökset	41
11	POHDINTA.....	47
	LÄHTEET.....	48
	LIITTEET	51
	Liite 1 <i>E.colin</i> spektrejä.....	51

ERITYISSANASTO

Proteomi	Käsittää kaikki proteiinit, jotka ovat läsnä solussa kudoksessa tai eliössä
Kapseli	Tiivis määritelty polysakkaridi tai proteiinkerros solun läheisessä ympäristössä
Chaperon	Proteiini, joka avustaa muiden proteiinien laskostumista oikein
kDa	Kilodalton on atomimassayksikkö, joka kuvaa atomin tai molekyylin massaa. Yksi dalton vastaa 1/12 osaa hiili-12:a yhden atomin massasta.
Reaaliaikainen PCR	Tekniikka, joka perustuu tutkittavan DNA:n monistamiseen polymeerasiketjureaktion avulla reaaliaikaisesti
Fermentaatio	Mikrobiologinen käymisprosessi, joka tapahtuu hapettomissa oloissa
Peptonit	Hydrolysoituneita proteiineja

1 JOHDANTO

Mikrobien tunnistaminen on kehittynyt perinteisistä, käsityötä vaativista tunnistusmenetelmistä ja kaupallisista tunnistustesteistä aina automatisoituihin massaspektrometriamenetelmiin ja reaaliaikaisiin PCR-tekniikoihin. Mikrobiologian laboratoriossa veriviljelydiagnoosiin avainasia on tunnistaa todelliset patogeenit mikrobit. Tautia aiheuttavien mikrobien esiintyminen verenkierron saattaa aiheuttaa vakavia komplikaatioita potilaalle, joten oikeanlaisen antibiootihoidon aloittaminen nopeasti on kriittistä. Vääränlainen antibioottihoito nostaa kuolleisuutta sepsispotilailla (Leibovici, Shraga, Drucker, Kohnsberger 1998). Mikrobin nopea tunnistus veriviljelynäytteestä auttaa lääkäreitä hoidon oikeanlaisessa suuntauksessa. Bakteerien tunnistus perinteisin biokemiallisin menetelmin voi kestää jopa kaksi vuorokautta positiivisen veriviljelylöydöksen havaitsemisen jälkeen. MALDI-TOF (Matrix –assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) menetelmän avulla tunnistustulos saadaan vuorokauden kuluttua.

Opinnäytetyön aihe oli testata MALDI-TOF-menetelmään perustuvaa aerobibakteerien tunnistusta veriviljelyistä lyhennetyillä kasvatusajoilla. Opinnäytetyön tavoite oli tuottaa tietoa MALDI-TOF-menetelmän sopivuudesta positiivisten veriviljelylöydösten tunnistamisessa nopeammin. Tarkoitus oli testata menetelmää käyttäen kahden, neljän ja kuuden tunnin inkubaatioaikaa positiivisille veriviljelynäytteille. bioMérieux:n suositusaika mikrobien inkubaatioajaksi on 18-24 tuntia (Hirvonen 2014). Testauksesta rajattiin pois kaikki muut mikrobit kuten anaerobit ja hiivat.

Opinnäytetyön toimeksiantaja oli Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian osasto, jossa opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin. Testauksella pyrittiin selvittämään, voiko positiivisten veriviljelybakteerien inkubaatioaikoja lyhentää niin, että bakteerit voitaisiin edelleen luotettavasti tunnistaa. Tulokset analysoitiin MALDI-TOF-menetelmään perustuvalla bioMérieux:n VITEK® MS-massaspektrometrillä.

2 BAKTEERIEN TAKSONOMIA JA OMINAISUUDET

2.1 Taksonomia

Taksonomia tarkoittaa bakteerien luokittelua ja se koostuu bakteerien tunnistamisesta ja nimeämisestä. Fylogenia puolestaan tarkoittaa evolutiivisen puun rakentamista bakteerien luonnollisten suhteiden avulla. Bakteerien taksonomia perustuu bakteerien fenotyypin analysoimiseen. Fenotyypin analysoimiseen kuuluvat mm. miltä mikro-organismi näyttää, millainen sen energiametabolia on, mitä entsyymejä sillä on, miten bakteeri liikkuu jne. Nykyään taksonomisessa luokittelussa voidaan ottaa huomioon myös bakteerin genotyypin ominaisuuksia, jolloin taksonomiaa voidaan tehdä myös molekulaarisilla menetelmillä. (Madigan, Martinko, Parker 2003, 341-346.) MALDI-TOF-menetelmällä mikrobeja voidaan luokitella taksonomisesti niiden proteiiniprofiilin mukaan.

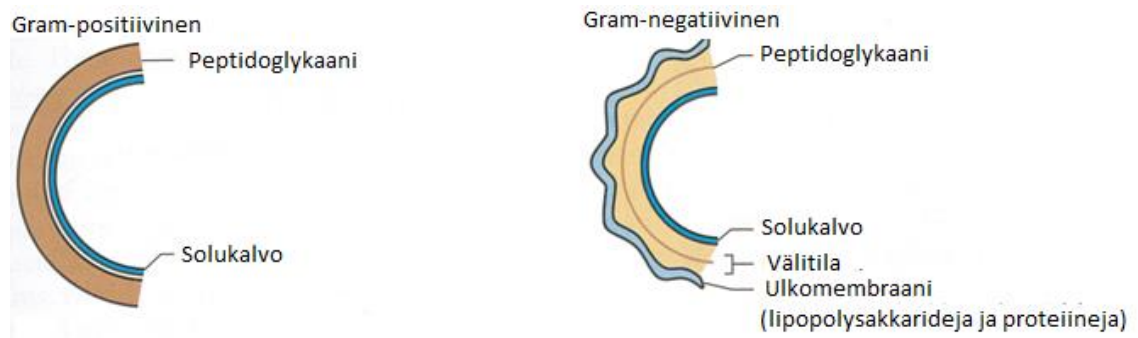
Taksonomisessa jaottelussa ylimpänä lohkona on eliökunta (domain), joka määrittelee mihin eliökuntaan biologinen organismi kuuluu. Kolme suurinta eliökuntaa ovat bakteerit, arkkibakteerit ja eukaryootit. Seuraavaksi eliö jaetaan pääjaksoon (phylum), luokkaan (class), lahkoon (order), heimoon (family), sukuun (genus) ja lajiin (species). (Madigan ym. 2003, 341-346.) Esimerkkinä *Escherichia coli* (E.coli) taksonominen luokittelu kuvassa 1.

Eliökunta: <i>Bacteria</i>
Pääjakso: <i>Proteobacteria</i>
Luokka: <i>Gammaproteobacteria</i>
Lahko: <i>Enterobacteriales</i>
Heimo: <i>Enterobacteriaceae</i>
Suku: <i>Escherichia</i>
Laji: <i>Escherichia coli</i>

KUVA1. Bakteerien taksonominen luokittelu (NCBI taksonomy-Encyclopedia of life)

2.2 Bakterisolun rakenne

Bakterisolu rakentuu solukalvosta ja soluseinästä eli peptidoglykaanista. Solukalvo koostuu lipidikaksoiskerroksesta, johon on integroituneena kalvoproteiineja. Kalvoproteiinit kuljettavat aineita solun sisälle ja ulos. Bakteereita voidaan jaotella soluseinämän rakenteen perusteella gramnegatiivisiin ja grampositiivisiin bakteereihin. Grampositiivisilla bakteereilla on paksu peptidoglykaanista koostuva soluseinä, kun taas gramnegatiivisilla on ohuempi soluseinä. Lisäksi gramnegatiivisilla bakteereilla on ulompi solukalvo, joka koostuu lipopolysakkarideista ja proteiineista (Kuva 2). Peptidoglykaanin kemiallinen rakenne vaihtelee myös hieman gramnegatiivisten ja grampositiivisten bakteerien välillä. (Madigan ym. 2003, 74-81, 23.)

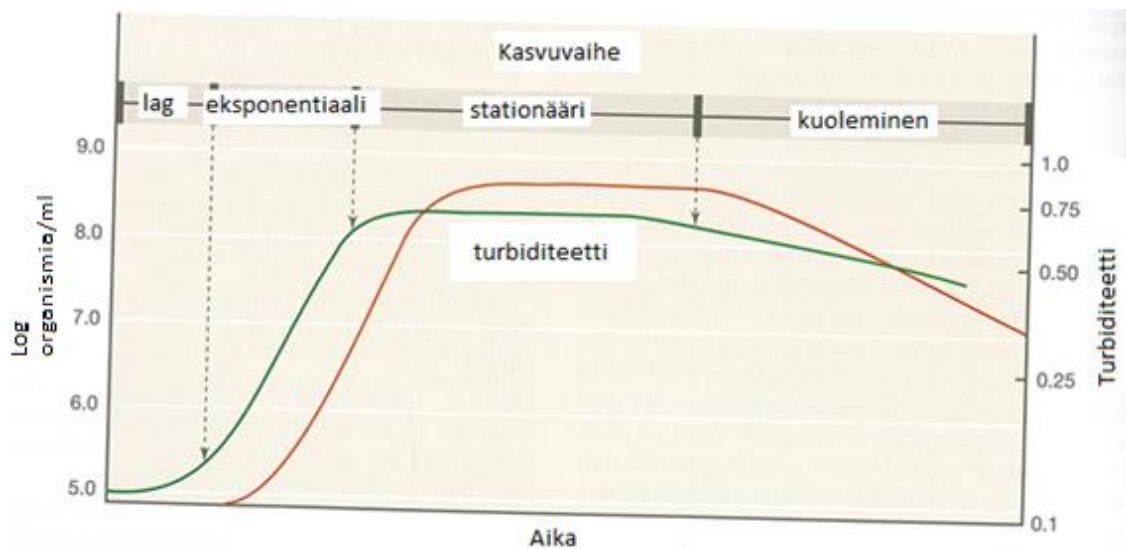


KUVA 2. Grampositiivisen ja gramnegatiivisen bakteerin soluseinän rakenne (mukaillen Madigan ym. 2003, 75).

Bakteereilla ei ole tumaa, vaan solun DNA sijaitsee sytoplasmassa. Sytoplasmassa on myös runsaasti ribosomeja. Ribosomeissa tapahtuu solun proteiinisynteesi. Ribosomit ovat pieniä proteiinikomplekseja, jotka ovat vuorovaikutuksessa lähetti-RNA:n ja sytoplasmian muiden proteiinien kanssa. (Madigan ym. 2003, 74-81,23). Näitä ribosomaalisia proteiineja analysoidaan runsaasti MALDI-TOF -analyysin aikana (Croxatto, Prodrom & Greub 2011, 382).

2.3 Bakteerien kasvu

Bakteerit lisääntyvät jakautumalla. Jakautuminen on monimutkainen sarja kemiallisia reaktioita, joita tapahtuu solussa yli 2000. Jakautumiseen kuluva aika vaihtelee suuresti riippuen geeneistä ja ympäristöstä saatavista ravinteista. *E.coli* pystyy optimaalisissa olosuhteissa käymään läpi yhden jakautumissyklin 20 minuutissa. Jakautumiseen vaadittava aika vaihtelee suuresti eri bakteerilajeilla, monet muut bakteerilajit kasvavat huomattavasti *E.colia* hitaammin ja jotkut harvat jopa nopeammin. Bakteerien kasvaminen on siis eksponentiaalista. Bakteeripopulaation kasvun vaiheet voidaan jakaa neljään vaiheeseen: lag-vaiheeseen, eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen, stationäärivaiheeseen ja kuolemisvaiheeseen. Bakteeripopulaation kasvu on esitetty kuvassa 3. (Madigan ym. 2003, 142-147.)



KUVA 3. Bakteeripopulaation kasvun vaiheet (vihreä käyrä) (mukaillen Madigan ym. 2003, 144)

Kun bakteeripopulaatio siirrostetaan uudelle kasvualustalle, kasvu ei yleensä ala heti. Kasvun alussa on viipymävaihe eli lag-vaihe, joka voi olla lyhyt tai pitkä riippuen bakteerin aikaisemmista kasvuolosuhteista. Jos eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat bakteerit siirrostetaan uudelle kasvualustalle, lag-vaihetta ei yleensä ole vaan kasvu alkaa

välittömästi. Jos puolestaan siirrostettavat bakteerit ovat olleet stationäärisen kasvun vaiheessa, lag-vaihe tulee tapahtumaan kasvatuksen alussa, vaikka kaikki bakteerit olisivatkin jakautumiskykyisiä. Tällöin bakteerisolujen tärkeät ainesosat voivat olla jo hupenneet ja solut tarvitsevat enemmän aikaa niiden uudelleen syntetisoimiseen. Lag-vaihe tapahtuu myös, jos solut ovat altistuneet niitä vahingoittaville tapahtumille kuten lämpökäsittelylle, säteilylle yms. (Prescott Harley & Klein. 2002, 113-114; Madigan ym. 2003, 142-145.)

Lag-vaihetta seuraa eksponentiaalisen kasvun vaihe. Eksponentiaalisessa kasvun vaiheessa solut ovat kaikista elinvoimaisimpia ja ne jakautuvat kullekin lajille ominaisella kasvunopeudella. Kasvua voi rajoittaa ympäristötekijät kuten käytetty kasvualusta ja lämpötila. (Prescott ym. 2002, 114; Madigan ym. 2003, 142-145.)

Eksponentiaalisen kasvun jälkeen bakteeri saavuttaa stationäärisen kasvuvaiheen. Eksponentiaalisen jakautumisen lopussa ympäristötekijät alkavat rajoittaa bakteerien jakautumista. Usein bakteereilta loppuvat kasvatusalustan tärkeät ravinteet tai kasvuympäristöön kertyy kasvua rajoittavaa metaboliatuotetta. Stationäärivaiheessa kasvua ei tapahdu vaan solujen toiminnot jatkuvat solun toimintaa ylläpitävinä. Joskus myös osa soluista kuolee ja osa jakautuu siten, että kokonaisuudessaan solujen lukumäärä pysyy vakiona. (Prescott ym. 2002, 114-115; Madigan ym. 2003, 142-145.)

Jos solujen kasvatusta jatketaan stationäärivaiheen yli, solut alkavat pikkuhiljaa kuolla. Ne siirtyvät kuolemisvaiheeseen. Tällöin kasvatusalustalla on vielä eläviä soluja, mutta kuolleita ilmaantuu koko ajan enemmän. Kuolemisvaihe ei silti ole eksponentiaalinen. (Prescott ym. 2002, 115; Madigan ym. 2003, 142-145.)

2.4 Bakteerien metabolian säätely

Bakteerit säätelevät metaboliaansa ympäristön vaikutuksen mukaan ja ne reagoivat nopeasti ympäristön muutoksiin. Säätely tapahtuu erilaisilla mekanismeilla, joilla solu vaikuttaa geenien ekspressioon. Bakteerisoluilla on toimintoja, joita solun täytyy ylläpitää jatkuvasti. Monet näistä ovat esimerkiksi tiettyjä entsyymireaktioita. Kuitenkin on tavallista, että solulla on toimintoja, joita tarvitaan vain kun olosuhteet ovat tietynlaiset.

Esimerkiksi entsyymi, jota tarvitaan laktoosin hajottamiseksi, on hyödyllinen bakteerisolulle vain silloin, kun laktoosia on läsnä kasvualustalla. Tällaisen entsyymin toimintaa voidaan säädellä joko geeniekspression tasolla tai post-translaationaalisesti säätelemällä entsyymin aktiivisuutta. Säätelymekanismeja voi käynnistyä myös bakteerisolun altistuessa lämpötilan vaihteluille. Esimerkiksi bakteerin altistuessa kuumalle lämpötilalle bakteerisolun lisää lämpöshokista johtuen tiettyjen proteiinien synteesiä. Tällainen on mm. DnaK, jonka määrä lisääntyy voimakkaasti esim. *E.colissa* bakteerin altistuessa kuumuudelle. DnaK on chaperonin proteiini, joka auttaa muita proteiineja laskostumaan eli muodostamaan tertiäärirakenteita oikein. Edellä mainituilla tavoilla ympäristötekijät voivat vaikuttaa kokonaisuudessaan bakteerisolun proteomiin. (Madigan ym. 2003, 223,207.) Ympäristöön ja kasvuun liittyvien tekijöiden huomiointi on siten muistettava MALDI-TOF -analytiikassa, joka perustuu bakteerisolun proteiinirakenteiden tunnistamiseen ja vertailtavuuteen.

3 VERIVILJELYTUTKIMUKSEN KULKU

3.1 Mitä veriviljelyssä tutkitaan?

Mikro-organismit voivat päästä ihmisen verenkiertoon monia eri reittejä pitkin. Useimmiten pääsy verenkiertoon mahdollistuu erilaisten tulehdusten tai traumausten seurauksena. Verenkiertoon tunkeutuneet sinne kuulumattomat mikrobit voivat aiheuttaa vakavia välittömiä seurauksia. Erilaisten mikrobien esiintyminen verenkierron yhtäjaksoisesti, ajoittaisesti tai vain ohimenevästi saattaa aiheuttaa shokin, elinten toimintahäiriön, DIC-oireyhtymän tai jopa kuoleman. Vakavissa infektio-tilanteissa aikainen taudinaiheuttajan havaitseminen ja patogeenin tunnistaminen ovat tärkeitä toimintoja mikrobiologian laboratoriossa. Mikrobilöydösten havaitseminen ajoissa auttaa taudin diagnoosissa sekä potilaan hoidossa. (Forbes, Sahm & Eissfeld ym.2007,778.)

Veriviljely kuuluu bakteriologian perustutkimuksiin ja se tarkoittaa verestä tehtävää bakteeriviljelyä. Indikaatioina veriviljelylle on yleensä korkea kuume, bakteremian, sepsiksen tai meningiitin epäily. Veriviljelynäyte pyritään ottamaan silloin, kun potilaan kuume on koholla, oletuksena, että mikro-organismit ovat tällöin runsaimmillaan potilaan verenkierron. (Moini 2012, 156.) Veriviljelynäytteet pyritään ottamaan aina ennen mikrobilääkityksen aloittamista, koska lääkitys saattaa vaikuttaa tuloksiin virheellisesti. Näytteenotto, näytteen laadukkuus, säilytys ym. preanalyttiset tekijät ovat ratkaisevia tekijöitä tuloksen luotettavuuden kannalta. (Hautala 2007.)

3.2 Veriviljelynäytteet

Veriviljelynäytteet otetaan niihin tarkoitettuihin rikastusviljelypulloihin. Anaerobiviljelypullot ovat tarkoitettu organismeille, jotka kasvavat parhaiten hapettomissa oloissa, kun taas aerobiviljelypullot ovat organismeille, jotka kasvavat parhaiten hapen läsnäollessa. (Moini 2012, 156.) Näytteet on otettava tarkkaa aseptiikkaa noudattaen, jotta välttyttäisiin ihokontaminaatioilta. Yksikin veriviljelypulloon iholta tullut kontaminanttibakteeri voi rikastua veriviljelypullossa ja aiheuttaa väärän positiivisen tuloksen. (Hellsten 2005, 102-103.)

Veriviljelyä varten tarkoituksenmukaisin määrä on kaksi aerobipulloa sekä kaksi anaerobipulloa. Näytteet näihin kahteen eri pulloon suositellaan otettavaksi eri pistopaikoista, mikäli mahdollista. Tällä varmistetaan mahdollisten patogeenien löytyminen. Näytteet otetaan sopivasta suonesta (useimmiten kyynärtaipeen laskimosta) steriilisti siipineulaa käyttäen. Pistokohta pyyhitään huolellisesti klooriheksidiinispriillä ja annetaan alkoholin haihtua. Pullojen korkit pyyhitään myös klooriheksidiinispriillä kostutetulla taitoksella. Näytettä otetaan aikuisilta kuhunkin pulloon 8-10 ml, jonka jälkeen pullot sekoitetaan. (Bakteeri, viljely 2012.) Lapsilta otetaan veriviljelyyn näytettä lapsen painon mukaan, vastasyntyneiltä ja pieniltä lapsilta 2-5 ml (Forbes ym. 2007, 785). Veriviljelypullot kuljetetaan ja säilytetään huoneenlämmössä (Bakteeri, viljely 2012).

3.3 Veriviljelytutkimus

Veriviljelyiden seulontaan käytetään automatiikkaa, jonka avulla positiiviset veriviljelyt havaitaan ja jatkotutkitaan. Pulloja inkuboidaan ja seulotaan niille tarkoitettussa veriviljelyautomaatissa. Yleisimmin käytetyt veriviljelypullot, kuten bioMérieux:n BacT/ALERT FA (aerobi) ja BacT/ALERT FN (anaerobi) sisältävät peptonirikastettua soijaliuosta. Niihin on lisätty mikrobeille hyödyllisiä ja mikrobien käyttämiä ravinteita kuten BHI-liuosta (brain heart infusion) sekä aktiivihiihtä. (Murray, Baron, Jorgensen & Pfaller 2003, 187.) Mikrobit rikastuvat pullossa ja kasvun seurauksena ne voidaan detektoida. Markkinoilla on erilaisia automaatteja, jotka käyttävät eri menetelmiä positiivisten veriviljelyiden seulontaan. Esimerkiksi BacT/ALERT-automaatti käyttää mittaamiseen pullon pohjassa olevaa kolorimetristä sensoria. Bakteerien metabolian tuotteena vapautuu hiilidioksidia, johon sensori reagoi. Hiilidioksidin tuotosta johtuva pH:n muutos aiheuttaa värimuutoksen pullon sensorissa. pH:n laskiessa pullon sisällä sensori muuttuu sinisestä vaaleanvihreäksi ja lopulta keltaiseksi. Automaatti lukee jokaisesta pullosta sensorin mahdollisen värinmuutoksen ja hälyttää sen mukaan. (Forbes ym. 2007, 789.)

Automaatin positiivisiksi hälyttämät veriviljelypullot jatkotutkitaan. Suuntaa antava vastaus mahdollisesta taudinaiheuttajasta saadaan tekemällä veriviljelystä gramvärjäys tai tarvittaessa akridiinioranssivärjäys. Värjäys tarkastetaan heti mikroskoopilla. Positiiviset näytteet voidaan vastata alustavasti gramvärjäyksen perusteella positiivisiksi jo yhden tai kahden vuorokauden kuluttua näytteenotosta. Taulukossa 1 on esitetty yleisimmät posi-

tiivisessa veriviljelyssä kasvavat mikrobit Suomessa vuonna 2010. Tulkinta riippuu eristetyistä bakteerista sekä potilaan taudinkuvasta. Tämä otetaan huomioon varsinkin, jos kasvua havaitaan vain yhdessä veriviljelyssä. Melko varma merkki bakteremiasta saadaan, jos samaa mikrobia kasvaa kahdessa veriviljelyssä. Kolmessa veriviljelyssä kasvava sama mikrobi on varma merkki bakteremiasta. Positiivinen mikrobilöydös ilmoitetaan aina välittömästi puhelimitse pyytävälle osastolle. (Bakteeri, viljely 2012.) Jotkin patogeenit laite detektoi jo huomattavasti nopeammin. Negatiiviset veriviljelut eivät aiheuta jatkotutkimuksia. Negatiivisia veriviljelypulloja kasvatetaan viisi vuorokautta veriviljelyautomaatissa, minkä jälkeen ne vastataan negatiiviseksi ja poistetaan automaattista. (Bakteeri, viljely 2012.)

TAULUKKO 1. Veriviljelylöydökset Suomessa 2010 THL:n mukaan (THL-raportti Tartuntataudit Suomessa 2010. 2011)

Yleisimmät veriviljelylöydökset vuonna 2010 (15-64 -vuotiaat)	Kappaletta
<i>Escherichia coli</i>	926
<i>Staphylococcus aureus</i>	578
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	413
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	261
Klebsiella-lajit	207
<i>Streptococcus viridans</i> –ryhmä	150
<i>Staphylococcus</i> , muu koagulaasinegatiivinen	138
<i>Streptococcus</i> , muut betahemolyttiset	131
<i>Streptococcus pyogenes</i>	113
<i>Streptococcus agalactiae</i>	110
<i>Bacteroides fragilis</i> –ryhmä	110
Enterobacter-lajit	98
<i>Enterococcus faecium</i>	89
<i>Enterococcus faecalis</i>	86

Veriviljelyssä kasvava mikrobi pyritään aina identifioimaan tarkemmin, jotta sille saadaan nimi. Lisäksi mikrobilöydöksestä tehdään lääkeaineherkkyysmääritys. Tunnistukseen voidaan käyttää perinteisiä, manuaalisia tunnistusmenetelmiä tai automatisoituja tunnistusmenetelmiä. Automatisoituja tunnistusmenetelmiä on esimerkiksi bioMérieux:n valmistamat VITEK® 2-tunnistus- ja herkkyysautomaatti sekä VITEK® MS-massaspektrometri (VITEK® 2; VITEK® MS). Automatisoitu tunnistusmenetelmä nopeuttaa ja parantaa mikrobin tunnistusta. VITEK® MS-massaspektrometrillä tunnistus saadaan lähes kaikista lajeista samana päivänä, eikä tulos ole tulkitsijasta riippuvainen. Näytemäärien kasvaessa automatisoidut menetelmät lisäävät tehokkuutta ja vähentävät käsityötä vaativien tunnistusmenetelmien käyttöä. Ongelmina kuitenkin ovat laiteviat ja sähkökatkot, jolloin varamenetelmä on oltava. Automatisoidut menetelmät eivät poista myöskään asiantuntijuuden tarvetta, koska saatua tietoa pitää osata yhdistää muihin tuloksiin ja maljakasvuun. (Kauranen & Malila 2013.)

4 PERINTEISET MIKROBIEN TUNNISTUSMENETELMÄT

4.1 Tunnistusmenetelmien käyttö

Ennen kehittyneitä kaupallisia sekä automatisoituneita tunnistusmenetelmiä on käytössä ollut erilaisia manuaalisia tunnistusmenetelmiä. Näihin lukeutuu mm. pesäkemorfologia ja pesäkkeen haju, sokeriputkireaktiot ja agglutinaatiotestit. Pesäkemorfologian ja hajun arvioiminen ovat vieläkin tärkeä osa mikrobin tunnistusta. Tunnistusmenetelmät ovat tästä kuitenkin kehittyneet ja niiden kaupallistuminen on tarjonnut suuren joukon testejä pienessä formaatissa. Näissä kaupallisissa menetelmissä tutkitaan mikrobin metaboliaa /fermentaatiota käyttämällä biokemiallisia reaktioita (esim. API 20ETM). Testien tulos ilmenee positiivisena tai negatiivisena reaktiona. Positiiviset reaktiot pisteytetään. (Struthers & Westran, 2003, 42.) Reaktioiden tulokset ja pisteytys ilmentävät mikrobin metabolisen profiilin, jota verrataan tuotevalmistajan kehittämään tietokantaprofiiliin. Saadun profiilin yhteneväisyys tiettyyn tietokantaprofiiliin antaa mikrobille lajin ja tarkemman nimen.

Perinteiset tunnistusmenetelmät vaativat työntekijältä analyttisiä taitoja sekä myös tulosten luku- ja tulkintataitoja. (Murray ym. 2003, 191.) Menetelmissä on noudatettava tarkkaa työskentelyä sekä työohjeita, jotta vältetään virheellisiltä tulkinnoilta. Perinteisten menetelmien käyttö mikrobin tunnistuksessa on hidasta. Mikrobin kasvatukseen kuuluu yleensä 16-24 tuntia, ennen kuin niitä voidaan jatkotutkia tarkemmin. Biokemiallisten tunnistustestien inkubaatioajasta riippuen saattaa kestää vielä 4-24 tuntia ennen kuin tulokset ovat luettavissa. Esimerkiksi gramnegatiivisten sauvojen tarkempi tunnistus vaatii usein kaksi vuorokautta ennen kuin tulokset ovat luettavissa API 20ETM-liuskalta. (Hirvonen 2014.) Automaattisten tunnistusmenetelmien kehittyessä perinteisten menetelmien käyttöä on vähennetty ja mikrobin tunnistus on nopeutunut huomattavasti.

Mikään yksittäinen kasvatusmalja ei pysty erottelemaan kaikkia mikro-organismeja (Weinstein 1996, 41). Mikrobit vaativat tiettyjä ravintoaineita ja suotuisia ympäristöolosuhteita kasvaakseen ja selviytyäkseen (Cappuccino & Sherman ym. 1999, 83-84). Saatavilla on lukuisia kasvatusmaljoja, jotka tarjoavat ihanteelliset kasvuolosuhteet niille tarkoitetuille mikrobeille. Bakteerien erotteluun ja mahdolliseen ensivaiheen tunnistukseen

käytetään mm. rikastusmaljoja, kromogeenisiä maljoja ja selektiivisiä maljoja (Selective and differential media for identifying micro-organisms).

Selektiivisiä kasvatusaljoja ovat esimerkiksi MacConkey, MSA (Mannitol Salt Agar), PEA-malja (Phenylethyl Alcohol), XLD-malja (Xylose Lysine Deoxycholate) ja sappieskuliinimalja. MacConkey-malja estää grampositiivisten bakteerien kasvua ja tarjoaa suolistoperäisille enterobakteereille tarvittavat ravinteet ja kasvuolosuhteet. Mannitolisuola-maljalla voidaan erottaa mannitolisuolaa fermentoivat stafylokokit mikrokokkilajeista, jotka eivät kasva kyseisellä maljalla. Näissä molemmissa maljoissa on pH-indikaattori, jonka värinmuutoksen perusteella tietyssä pH:ssa kasvavat bakteerit voidaan erottaa. PEA-malja estää gramnegatiivisten bakteerien kasvua ja on ihanteellinen ravintoalusta grampositiivisille bakteereille. Myös XLD-malja estää grampositiivisten bakteerien kasvua. XLD-malja sisältää sappisuoloja, jonka vuoksi maljalla kasvavat esimerkiksi *Salmonella* ja *Proteus mirabilis*. Sappieskuliinimaljaa käytetään tunnistamaan mikrobin kykyyn hydrolysoida eskuliinia saponin läsnäollessa. Malja mm. erottaa enterokokit (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*) muista kokkibakteereista. *E. faecalis* ja *E. faecium* kasvavat maljalla mustana pesäkkeenä, joka kertoo eskuliinin hydrolyysistä sappiolosuhteissa. (Struthers & Westran 2003, 12-15;37.)

Tietyt bakteerit voidaan eristää ja erotella muusta sekakasvusta myös erilaisten kromogeenimaljojen avulla. Maljat sisältävät kromogeenista elatusainetta, jotka on tarkoitettu bakteerien tunnistukseen värireaktioiden avulla. Näissä kasvatusalustoissa kromogeeni on kiinnitetty spesifiseen entsyymiaktiivisuuteen reagoivaan substraattiin. Kromogeeni irtoaa substraatista ja kehittää itselleen tyypillistä väriä kohdemikrobin kasvaessa ja tuottaessa entsyymiä. Tästä muodostuu värillinen saostuma, jonka voi tulkita paljaalla silmällä suoraan maljalta. Kromogeenimaljoja inkuboidaan 18 - 24 tuntia, jonka jälkeen värireaktiot voidaan tulkita. CHROMagar on yksi kromogeenisten elatusaineiden valmistajista. Valikoimasta löytyy esimerkiksi *Staphylococcus aureus* eristämiseen CHROMagar™ Staph aureus, jolla aureus kasvaa vaaleanpunaisesta roosan väriseen. CHROMagar™ Orientation-maljalla voidaan erotella esim. *E. coli* (tummanpinkistä punertavaan), Klebsiella, Enterobacter (metallinsinisiä) sekä Enterococcus (turkoosinsinen). (CHROMagar 2013).

4.2 Tunnistusmenetelmät eri bakteerilajeille

Perinteisiä tunnistusmenetelmiä on useita erilaisia ja suoritettavat testit valitaan tutkittavana olevan mikrobin tai mikrobiryhmän mukaan. Tässä tarkastellaan tunnistusmenetelmiä vain yleisempien veriviljelybakteereiden osalta. Yleisimmät veriviljelylöydökset THL:n mukaan on esitetty taulukossa 1. Oikeaa tunnistustestiä valittaessa käytetään avuksi tunnistuspolkuja, joita pitkin edetään tulosten perusteella tunnistuspolun ohjaamaan suuntaan.

Ensimmäinen vaihe mikrobien identifiointissa on eristää tutkittavaa mikrobia puhtaana. Jos elatusainemaljalla on sekakasvua eikä tutkittavaa mikrobia ole erillisinä pesäkkeinä, on tehtävä puhdasviljelmä uudelle sopivalle kasvatusmaljalle. Jos mikrobia ei saada jatkotutkimuksiin puhtaana, voi se johtaa virheellisiin tuloksiin (Crocker & Burrett 2005, 136.)

Seuraavissa alaluvuissa on esitetty perinteisiä tunnistustestejä veriviljelyssä useimmin esiintyville grampositiivisille kokkibakteereille ja gramnegatiivisille sauvabakteereille. Bakterikasvatuksia inkuboidaan happi- tai hiilidioksidiatmosfäärissä, +37 °C. Yleensä 18-24 tunnin inkuboinnin jälkeen kasvatusmaljoilla on havaittavissa kasvua, jolloin jatkotutkimukset on mahdollista tehdä. (Struthers & Westran 2003, 36.) Yleisesti veriviljelyiden kasvatukseen käytetään veri- ja suklaamaljoja, jotka tarjoavat mikrobeille hyvän kasvuympäristön.

4.2.1 Grampositiiviset kokkibakteerit

Grampositiiviset bakteerit esiintyvät gramvärjäyksessä siniviolettina. Yleisimmät veriviljelyssä kasvavat grampositiiviset kokkibakteerit ovat *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ja muut koagulaasinegatiiviset stafylokokit. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*-ryhmä sekä muut streptokokit lukeutuvat yleisimpiin löydöksiin, kuten myös *E. faecium* ja *E. faecalis*.

Stafylokokit voidaan erottaa muista grampositiivisistä bakteereista yksinkertaisilla testeillä kuten koagulaasi ja katalaasi. Koagulaasitestillä selvitetään bakteerin kyky hyydyt-

tää plasmaa eli kyky tuottaa koagulaasientsyymiä. Testissä tehdään bakteerisuspensio objektilasille lisäämällä esim. saliiniliuosta, jonka jälkeen suspensioon sekoitetaan plasma-reagenssia. Objektilasilla selkeä kokkaroituminen kertoo positiivisesta reaktiosta. *S. aureus* on koagulaasipositiivinen, joka voidaan testillä erottaa esimerkiksi koagulaasinegatiivisesta *S. epidermidiksestä*. *S. aureus* voidaan tunnistaa myös DNAasitestillä. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit ovat valtaosin DNAasinegatiivisia, joten DNAasitestin positiivinen tulos vahvistaa koagulaasitestin tulosta *S. aureusta* tunnistettaessa. (Struthers & Westran 2003, 38.)

Katalaasitestillä voidaan erottaa mm. katalaasinegatiiviset streptokokit katalaasipositiivisista stafylokokkeista (katalaasientsyymiä tuottavat). Katalaasientsyymi katalysoi vetyperoksidin hajoamista vedeksi ja hapeksi. Lisäämällä vetyperoksidia bakteerisuspensioon tuloksena muodostuu kuplintaa, mikä kertoo positiivisesta tuloksesta. (Leboffe & Pierce 1996, 40.)

Streptokokkeja voidaan alustavasti luokitella myös verimaljakasvun hemolyysin perusteella. Verimaljalla alfahemolyyttinen streptokokki muodostaa vihertävän värin pesäkkeen ympärille kun taas beetahemolyyttinen streptokokki muodostaa ns. kirkastuman. Maljaa on tärkeää katsoa valoa vasten, jotta hemolyysi tulkitaan oikein. Optokiinitestiä puolestaan käytetään, kun halutaan seuloa alfahemolyyttisten streptokokkien joukosta pneumokokkia. Verimaljalle asetetaan optokiinikiekko tiheään kasvukohtaan ja inkuboidaan yön yli. Alfahemolyyttinen *S. pneumoniae* on herkkä optokiinille, joten optokiinikiekko muodostaa estorenkään ympärilleen. (Struthers & Westran 2003, 39.)

Beetahemolyyttiset streptokokit voidaan ryhmittää tarkemmin kaupallisella latex-agglutinaatiotestillä, joka on suoritukseltaan yksinkertainen ja tulos nopeasti luettavissa. Solususpensiota sekoitetaan latex-reagenssiin. Reagenssi sisältää latex-helmiä, jotka on päällystetty spesifisillä vasta-aineilla. Reaktio perustuu siis mahdolliseen vasta-aine-antigeenisitoutumiseen. Beetahemolyyttisiä ryhmiä (Lancefieldin ryhmät) A, B, C, D, F ja G voidaan kaikkia tunnistaa kaupallisella latex-agglutinaatiotestillä. (Cappuccino & Sherman 1999, 381; Struthers & Westran 2003,40.) Esimerkiksi beetahemolyyttinen *S. pyogenes* (A-ryhmä) on nielun patogeeni, joka on tärkeä tunnistaa ajoissa potilaan hoidon kannalta (Hale 2013).

Sappieskuliiniimalja on selektiivinen kasvualusta enterokokeille ja *Streptococcus bovis*-ryhmän bakteereille. Esimerkiksi *E. faecium* ja *E. faecalis* ovat molemmat positiivisia sappieskuliinin suhteen ja kasvavat sappieskuliinimaljalla tumman ruskeana tai mustana. (Leboffe & Pierce 2011).

4.2.2 Gramnegatiiviset sauvabakteerit

Gramvärjäyksessä gramnegatiiviset bakteerit näkyvät mikroskoopissa punaisena kokkina tai sauvana. Myös gramnegatiivisille bakteereille on omat tunnistustestinsä, joiden avulla tutkittava bakteeri saadaan selville. Tässä tarkasteltavia bakteereita ovat *E. coli*, Klebsiella-lajit sekä enterobakteerit. Nämä ovat yleisimpiä veriviljelylöydöksiä gramnegatiivisten sauvojen osalta.

Gramnegatiivisille sauvoille tehdään antibiootteriherkkyyسمääritys ja tarkempi lajitunnistus esim. API-testillä. API20-testien inkubaatioaika on 24 tuntia, jonka jälkeen reaktiot ovat luettavissa ja bakteerit ovat tunnistettavissa. Gramnegatiivisten sauvojen tunnistukseen kuuluu siis vähintään kaksi vuorokautta biokemiallisia menetelmiä käyttäen, ennen kuin tunnistus saadaan (Hirvonen 2014.)

Enterobakteerit, ts. koliformit voidaan jakaa niiden laktoosin fermentaation perusteella. Laktoosia fermentoivat gramnegatiiviset bakteerit tuottavat happoa käyttäessään laktoosia. Tätä hapon tuottoa voidaan havaita esimerkiksi selektiivisellä MacConkey-maljalla, jossa *E. coli*, Klebsiella-lajit sekä muut laktoosia fermentoivat bakteerit aiheuttavat värinmuutoksen. MacConkey-maljalla *E. coli*-pesäkkeet ovat punertavia/pinkkejä ja Klebsiella-pesäkkeet yleensä kellan-vaaleanpunaisia. Klebsiella voi joskus myös kasvaa kuin *E. coli*, joten jatkotunnistustesteillä (API 20E) saadaan varma bakteeritunnistus. (Yleisimmät varmistustestaukset mastiittidiagnostiikassa. 2011.)

4.2.3 Kaupalliset biokemialliset tunnistuskitit

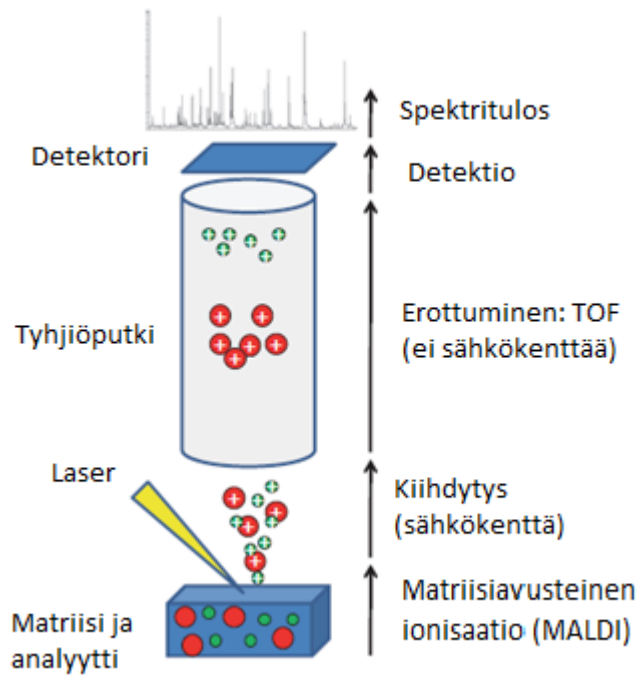
Lukuisille tunnetuille organismeille on käytössä myös biokemiallisiin testeihin perustuvia kaupallisia kittejä eli valmisreagenssipakkauksia. Esimerkiksi gramnegatiivisille bak-

teereille on laajassa käytössä BioMerieux:n valmistama API 20ETM ja Thermo Scientificin RapIDTM NH System. Bakterien ominaisuuksia testataan biokemiallisilla reaktioilla, jotka perustuvat esim. laktoosiaineenvaihduntaan, hiilihydraattien käyttöön, entsyymien ilmentämiseen ja värireaktioihin pH:n muutoksissa. Inkubaatioajan jälkeen tulokset on helposti luettavissa testikaivojen värinmuutosten perusteella. Tutkittava organismi voidaan tunnistaa näihin värireaktioihin perustuen. Inkubaatioaika API 20ETM-liuskoilla on 24 tuntia, jonka jälkeen värireaktiot ovat luettavissa. (Sturhers & Westran 2003, 42-43.) Inkubaatioaika RapIDTM-liuskoille on 4 tuntia. (RapIDTM System.)

5 MALDI-TOF- MENETELMÄ

MALDI-TOF-menetelmä on yksi massaspektrometrian sovellus, joka on kehitetty vuonna 1987 ja palkittu Nobel -palkinnolla vuonna 2002. Se on osoittautunut tehokkaaksi menetelmäksi mikrobien karakterisoinnissa ja tunnistamisessa. Mikrobien analytiikassa menetelmä perustuu proteiinien tunnistamiseen massaspektrometrian avulla. Tämän jälkeen MALDI-TOF-menetelmä on hiljattain yleistynyt mikrobiologian laboratorioissa ympäri maailman. Menetelmän etuja ovat sen nopeus ja tarkkuus. (Croxatto ym. 2011 380-382; Clark, Kaleta, Arora & Wolk ym. 2013 549-550) Menetelmää tutkittaessa on osoitettu, että rutiinikäytössä oikeita tunnistuksia saadaan lajitasolla arviolta 84-93.6 %. Lisäämällä näytteen esikäsittelyjä tunnistuksen oikeellisuudessa päästään entistä parempiin lukuihin. Sukutasolla tunnistuksen oikeellisuus lähentelee 100 %:a. Tutkimukset tunnistuksen osuvuudesta vaihtelee hieman laitteen valmistajan ja tutkimuksen mukaan. (Bizzini & Greub 2010, 1614.)

Massaspektrometri koostuu kolmesta perusosasta. Ensin tarvitaan lähde, joka ionisoi näytteen saaden sen kaasuuntumaan. Seuraava osa on tyhjiöputki tai muu vastaava, jossa partikkelit erottuvat massa-varaussuhteen mukaisesti. Lopuksi eronneet partikkelit osuvat detektorille, josta saadaan tietokoneavusteisesti vastaus näytteen molekyylikoostumuksesta. Kuvassa 4 on esitetty MALDI-TOF-menetelmän toimintaperiaate. (Croxatto ym. 2011, 381.)



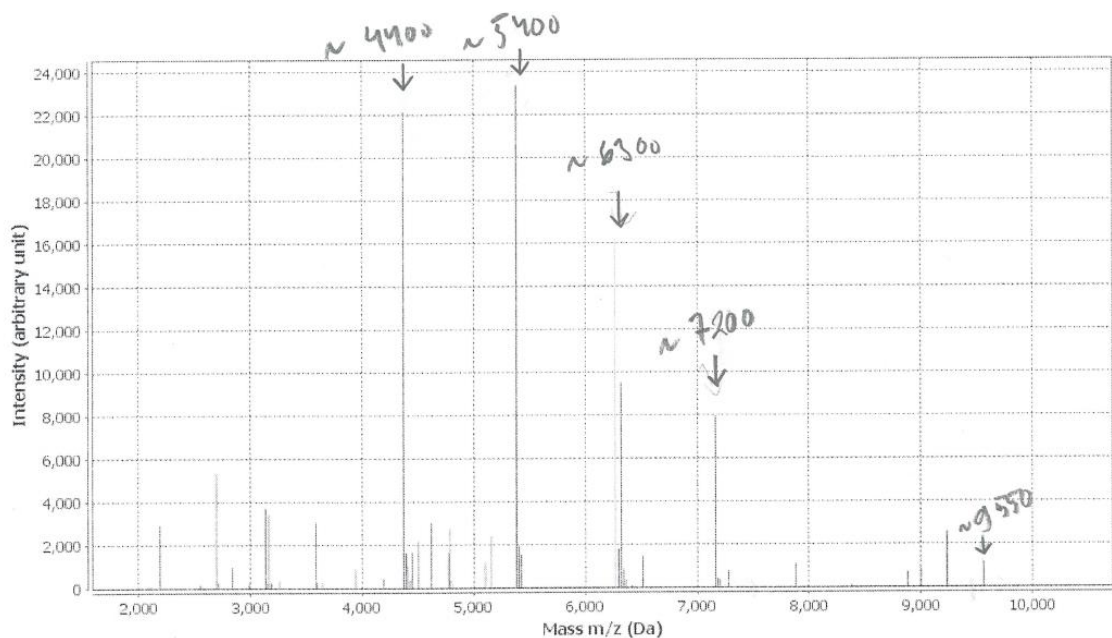
KUVA 4. MALDI-TOF -menetelmän toimintaperiaate (mukaillen Croxatto ym. 2011, 382).

Massaspektrometriassa ionisaatiolähteenä on käytetty monia eri menetelmiä kuten kemiallista ionisaatiota, lasereita tai sähkövirtaa (electrospray eli ESI). MALDI- menetelmässä ionisaatioon käytetään laseria, tavallisimmin tyypilaseria. MALDI-TOF kuuluu ns. pehmeisiin ionisaatiomenetelmiin. Menetelmän sallii suurienkin molekyylien, kuten herkästi hajoavien proteiinien kaasuuntumisen ehjänä. MALDI -menetelmässä proteiinit saavat kuitenkin tavallisesti vain yhden varauksen, kun taas esimerkiksi ESI- menetelmässä varauksia syntyy enemmän partikkelia kohden. MALDI-TOF-menetelmä ei myöskään ole yhtä altis kasvatusagarin lisäaineiden aiheuttamille häiriöille kuin ESI- menetelmä (Croxatto ym. 2011, 381). Usein rutiinisovelluksissa laserin aallonpituus on 337 nm. Kuitenkin myös muita UV- ja infrapuna- alueen aallonpituuksia voidaan käyttää kokeellisessa MALDI-TOF -analytiikassa. (Clark ym. 2013, 551)

MALDI-TOF-menetelmässä tutkittava analyytti sidotaan matriisiin, jossa kaasuuntuminen tapahtuu. Matriisi koostuu pienistä happamista molekyyleistä, jotka absorpoivat tehokkaasti valoa käytetyn laserin aallonpituudella. Käytettäviä matriiseja on useita erilaisia ja ne valitaan sekä analysoitavan biomolekyylin mukaan, että käytettävän lasertyypin mukaan. Yleisimmin käytettäviä matriiseja ovat 2,5 dihydroksibentsoehappo (DHB), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid (SA), ferulic acid (FA) sekä 2,4

hydroxy-phenyl benzoic acid. Näistä FA, SA ja CHCA ovat osoittautuneet parhaiksi proteiinien analytiikassa. DHB sopii puolestaan parhaiten glykoproteiinien ja glykopeptidien analytiikkaan. DHB- ja CHCA -matriisit ovat usein optimaalisia pienien alle 10 kDa proteiinien analytiikassa. SA- ja FA- matriisit puolestaan toimivat paremmin, kun kyseessä ovat 15 kDa tai suuremmat proteiinit. (Croxatto ym. 2011, 381.)

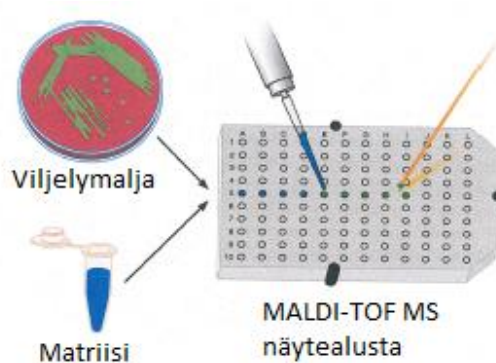
Matriisi absorpoi laserin energiaa laserin fotonien vaikutuksesta, jolloin näyte kaasuntuu ja ionisoituu. Kaasumaisia proteiineja kiihdytetään ensin sähkökentässä, jonka jälkeen ne päätyvät tyhjiöputkeen (ei sähkökenttää). Tyhjiöputkessa tapahtuu proteiinien erottuminen. Pienemmät molekyylit kulkeutuvat putken läpi nopeammin kuin suuret. Tätä aikaa kuvataan suurella lentoaika (TOF). Lentoaika riippuu proteiinin massa (m) ja varaus (z) suhteesta. MALDI-TOF-menetelmässä molekyylit saavat tavallisesti vain yhden positiivisen varauksen. Lopulta proteiinit osuvat detektorille lentoajan mukaisessa järjestyksessä, johon vaikuttaa proteiinin massa/varaussuhde m/z . Näistä fraktoista piiryy ominainen proteiinispektri, jonka piikkien intensiteetit vaihtelevat (kuva 5). Intensiteetin suuruuteen vaikuttaa detektorille osuneiden ionisoituneiden proteiinien lukumäärä. (Croxatto ym. 2011, 382.)



KUVA 5. Esimerkki bioMerieux'in VITEK® MS proteiinispektristä. Kuvattu bakteeri on *E.coli* ja spektriin on merkitty *E.colille* ominaiset spektriipiikit (Mikkonen & Raitio 2013)

5.1 Näytteenvalmistus

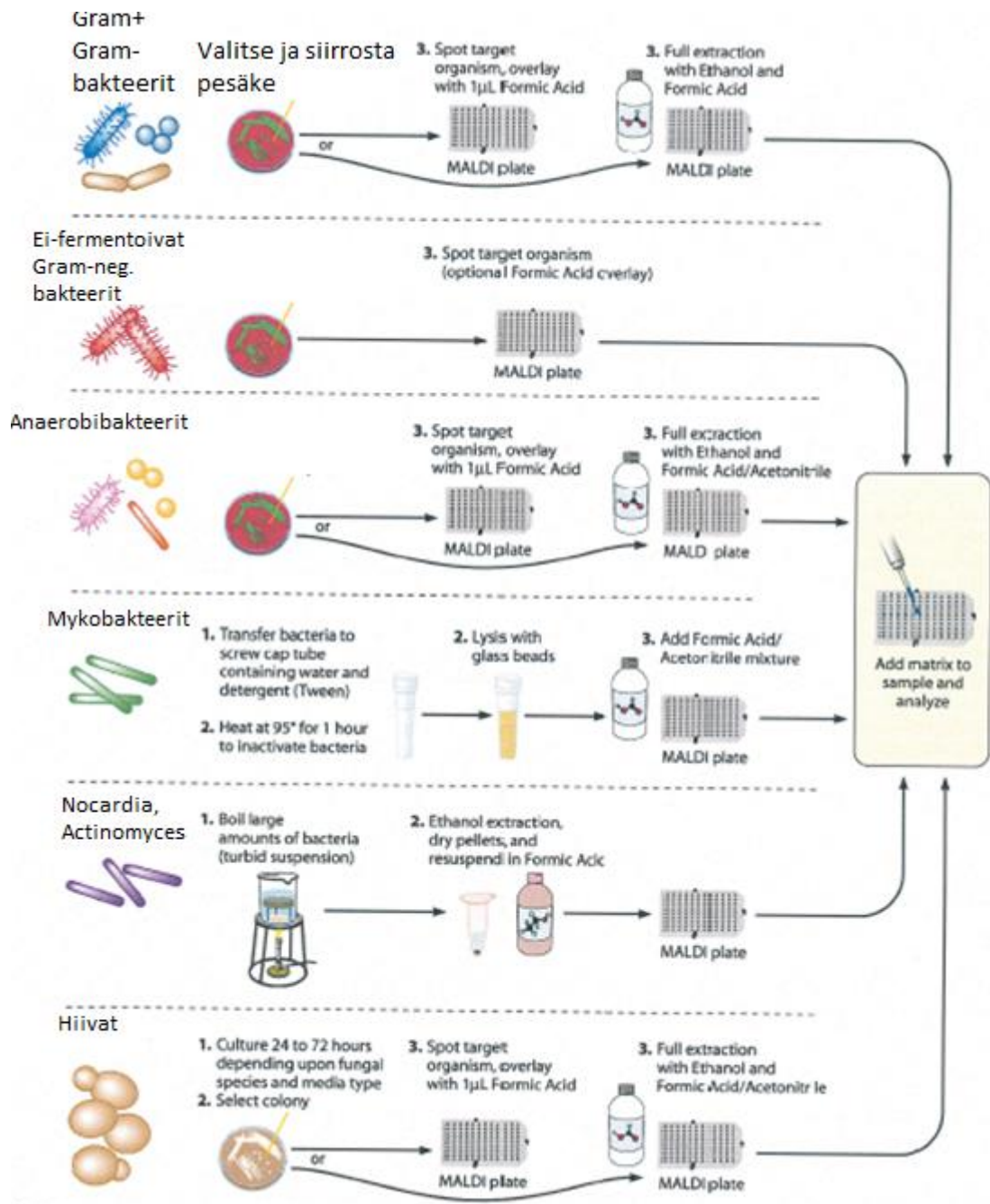
Kliinisessä rutiinidiagnostiikassa analysoidaan usein kokonaisia eläviä bakteerisoluja, jolloin ei ole käytetty mitään esikäsittelymenetelmää, kuten esimerkiksi näytteen keittämistä sen steriloimiseksi. Veriviljelyanalytiikassa positiivisesta veriviljelypullosta tehdään maljaviljely, jota viljellään protokollasta riippuen hiilidioksidikaapissa +35 °C 18-24 tuntia. (Clark ym. 2013, 551). Näytteen valmistus tapahtuu ottamalla bakteeripesäkkeestä pieni määrä bakteerimassaa viljelysilmukalla. Se levitetään ohueksi, tasaiseksi kerrokseksi näytealustalle. Näytealustassa on pieniä metallipäällysteisiä ympyröitä, joiden päälle näyte on tarkoitus levittää. Näyte ei saa kuivua tässä vaiheessa, joten matriisiaine pipetoidaan näytteen päälle mahdollisimman pian. Tämän jälkeen näytteen annetaan kuivua ennen analysointia. Kuvassa 6 esitetään näytteen valmistaminen näytealustalle.



KUVA 6. MALDI-TOF-laitteen näytealusta (mukaiillen Clark ym. 2013, 551).

Bakteerit eivät vaadi tavallisesti muuta esikäsittelyä, sillä pelkästään matriisiaine auttaa vapauttamaan riittävästi proteiineja analyysin aikana. Joidenkin mikrobien analytiikassa esikäsittelyjen esim. happojen (esim. muurahaishappo) lisääminen näytteeseen saattaa kuitenkin olla aiheellista tuloksen kannalta. (Croxatto ym. 2011, 381.) Happokäsittelyä ei kuitenkaan suositella rutiininomaisesti tehtäväksi kaikille näytteille. Happouuttoja suositellaan käytettäväksi silloin kun MALDI-TOF-menetelmä ei anna tulosta. Useimmiten tämä onkin riittävä toimenpide ongelman ratkaisemiseksi. (Croxatto ym. 2011. 390,393.) Yksinkertaisimmillaan happouutto voi tarkoittaa muurahaishapon pipetoimista matriisiaineen lisäksi näytelevylle. Myös rajumpia ja kokonaisvaltaisempia esikäsittelymenetelmiä, kuten näytteen etanolissa uuttaminen on kokeiltu. Erilaisia esikäsittelymenetelmiä

voidaan soveltaa riippuen mikrobista. Esimerkkejä erilaisten mikrobiryhmien näytteen valmistusmenetelmistä on esitetty kuvassa 7. (Clark ym. 2013. 551.)



KUVA 7. Erilaisia näytteen esikäsittelymenetelmiä erilaisille mikrobiryhmille, mitä voidaan tarvittaessa soveltaa MALDI-TOF-analytiikassa (Clark ym. 2013. 555).

Veriviljelyiden analytiikassa on kokeiltu myös menetelmää, jossa näyte otetaan analysoitavaksi suoraan veriviljelypullosta ilman viljelyä maljalla. Vaikka bakteerikonsentraatio

näytteessä on pieni, se voi kuitenkin periaatteessa riittää MALDI-TOF-analyysiin. Tutkimusten mukaan vain 5×10^3 bakteerisolua riittää MALDI-TOF-analyysiin (Hsieh, Tseng, Lee & Kuo 2008, 452). Ongelmaksi muodostuvat kuitenkin veriviljelypullon sisältämä ei -bakteeriperäinen proteiiniaine, kuten veri, joka häiritsee ja aiheuttaa taustaa MALDI-TOF-spektriin. Menetelmä on myös työläs ja aikaa vievä. Jotta näyte olisi analyysikelpoinen, sitä täytyy sentrifugoida ja puhdistaa, jotta ylimääräinen proteiiniaine saadaan mahdollisimman vähäiseksi (Croxatto ym. 2011, 390,393-394.)

5.2 Mikrobin tunnistus tietokantojen avulla

MALDI-TOF-menetelmässä eivät suinkaan analysoidu kaikki näytteen sisältämät proteiinit. Menetelmä suosii tiettytyyppisten proteiinien ionisoitumista analyysin aikana. Menetelmää ei myöskään ole tehty mittaamaan kaiken kokoisia proteiineja, vaan mittausalue on rajallinen ja valittu sen mukaan, mitkä proteiinifraktiot erottuvat mikrobin analyysissä parhaiten.

Mikrobin spektrejä tutkittaessa on osoitettu, että analysoitaessa kokonaisia eläviä mikrobisoluja MALDI-TOF-menetelmällä, valtaosa spektrin yli 4 kDa kokoisista proteiineista on ehjiä proteiineja. Lisäksi bakteerien analytiikassa valtaosa biomarkkereiksi kelpaavista proteiineista ovat kooltaan alle 15kDa. Näiden proteiinien on todettu vastaavan bakteerin solun sisäisiä proteiineja, pääasiassa ribosomaalisia proteiineja. Bakteerin tunnistus MALDI-TOF-menetelmällä perustuu siis näiden ribosomaalisten proteiinien analytiikkaan. Lisäksi tiedetään, että parhaiten prosessissa ionisoituvat proteiinit ovat luonteeltaan emäksisiä ja niitä on lukumääräisesti runsaasti solun sytoplasmassa. Ribosomaalisten proteiinien lisäksi myös muun tyyppisiä proteiineja ionisoituu herkästi analyysissä. Näistä proteiiniperheistä on tunnistettu ainakin erilaisia nukleiinihappoihin sitoutuvia proteiineja ja kylmähokkiproteiineja, jotka esiintyvät yleisesti useilla bakteerilajeilla. (Croxatto ym. 2011, 382)

Mikrobin tunnistus MALDI-TOF-spektrillä vaatii ensin spektrikirjaston perustamisen. Tähän kirjastoon on koottu useita spektrejä tunnetuista bakteerilajeista sekä saman lajin eri kantamuodoista. Tunnistuksen onnistumisen kannalta kirjaston on oltava kattava, sillä spektrit voivat olla erilaisia samankin bakteerilajin sisällä. Proteomin vaihtelu lajin sisällä on merkittävä MALDI-TOF-tuloksen vaihtelun lähde. (Hirvonen 2014.)

Tutkimuskäyttöön tarkoitetut tietokannat ovat usein luonteeltaan erilaisia kuin kliinisessä rutiinikäytössä olevat kirjastot. Kliinisessä rutiinitunnistuksessa bioMérieux käyttää suljettua IVD -tietokantaa. IVD -tietokanta on bioMérieux:n kehittämä tietokanta mikrobien tunnistamiseksi. Tietokannat ovat erilaisia riippuen laitteita valmistavasta yrityksestä. Tietokannan luomisessa on analysoitu erilaisia mikrobeja ulkopuolisista kantakokoelmista sekä kliinisistä isolaateista. IVD- tietokannassa samasta mikrobista on minimissään analysoitu kaksi eri isolaattia ja tietokanta sisältää minimissään kahdeksan eri spektriä lajia kohti. Vertailutulokset pohjautuvat kirjaston luontivaiheessa VITEK, API sekä nukleiinihappojen sekvensointimenetelmiin. VITEK MS® IVD -tietokanta sisältää yhteensä 29 873 spektriä. Spektrit koostuvat 646 eri bakteerista sekä 110 hiivasta ja homeesta. IVD-kanta on rakennettu ns. populaatiopohjaiseksi eli yhtä mikrobilajia kohden löytyy joukko sopivia referenssispektrejä eri isolaateista, joita yhdistää keskenään lajille tyypilliset ominaisuudet. Esimerkiksi tutkimuskäyttöön tarkoitettu bioMérieux:n SARA-MIS -tietokanta puolestaan on kantapohjainen, jolloin yhtä lajia edustaa vain yksi mikrobikanta. (Hirvonen 2014.)

MALDI-TOF-analyysin ensimmäisessä vaiheessa tuloksena saadaan ns. raakadata spektri. Tätä raakadataa prosessoidaan ennen vertaamista tietokantaan. Prosessointiin kuuluu mm. taustakohinan poisto, pohjaviivan korjaus sekä saatujen spektriapiikkien detektio. Tunnistus tietokannassa tapahtuu erilaisten tunnistusalgoritmien perusteella. IVD-tietokanta käyttää painotettua "bin" matriisia. Tässä matriisissa piikkilista jaetaan osiin bineiksi (1300 biniä) ja ohjelmisto detektoi piikit näistä bineistä. Piikkilistan bin-matriisia verrataan tietokannan bin-matriisiin. Laskentaohjelmisto arvioi tuleeko lajilla olla piikkejä tietyissä bineissä, tuleeko lajilta puuttua piikki tietyistä binistä, mikä on piikin intensiteetti vai onko piikin esiintymisellä merkitystä. Näiden mukaan laskentaohjelma painottaa eri binit sen mukaan, esiintyykö niissä piikki vai ei. Spektrin intensiteettiä myös normalisoidaan logaritmisilla arvoilla, jolloin suuret intensiteetit korostuvat ja pienet intensiteetit menettävät merkitystään. Lopulta lasketun score- arvon perusteella laitteisto etsii vastaavuuden spektrikirjastosta. (Hirvonen 2014.)

5.3 Vaikeasti tunnistettavat lajit

Veriviljelyiden osalta hankalampia tunnistettavia bakteereita ovat olleet yleisesti grampositiiviset bakteerit, etenkin streptokokkisukuiset bakteerit. Syitä tähän on arveltu olevan useita. Yksi syy voi olla streptokokkilajien (*S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. sanguinis* ja *S. oralis*) MALDI-TOF-spektrien keskinäinen samankaltaisuus. Grampositiivisten bakteerien soluseinä on myös rakenteeltaan kestävämpi verrattuna gramnegatiivisiin bakteereihin. Grampositiivisten bakteerien soluseinä siten vastustaa hajoamista enemmän, jolloin proteiineja ei vapaudu. Joillakin lajeilla myös solun ulkoinen kapseli voi häiritä merkittävästi MALDI-TOF-analyysiä. Tällaisia lajeja ovat mm. *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ja *K. pneumoniae* (Croxatto ym. 2011, 394.) Kapseli kostuu bakteerin erittämistä polysakkaridi- tai proteiinituotteista, joita bakteeri käyttää mm. kiinnittyessään pinnoille tai isäntäorganismiin (Madigan ym. 2003, 91.)

Spektrikirjasto ja sen kattavuus määrittelee kuinka hyvin analytiikassa päästään oikeaan tulokseen. Vaikka vaihtelevat ympäristötekijät vaikuttavat spektriin, tietyt spektrit ovat olosuhteista riippumatta niin konservoituneita, että niitä voidaan käyttää biomarkkeina. Käytetty spektrikirjasto on rakennettu näiden konservoituneiden spektrien pohjalta. (Croxatto ym. 2011, 383.)

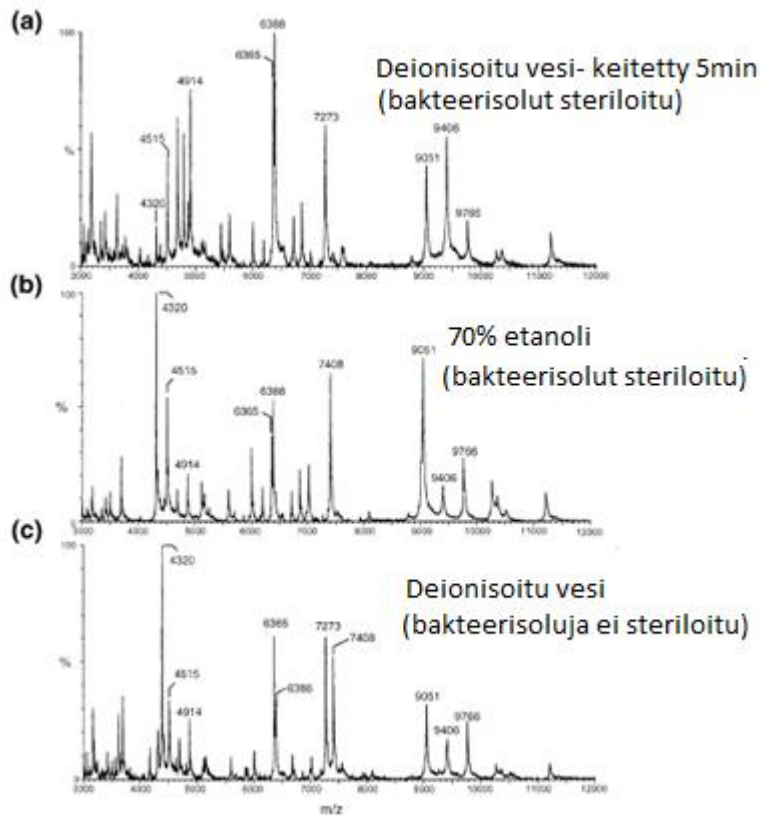
6 TULOKSEEN VAIKUTTAVIA SEIKKOJA

MALDI-TOF-menetelmällä saatuihin tuloksiin vaikuttavat mm. näytteen esivalmistelumenetelmät, käytetty matriisi, inkubaatioaika (mikrobin ikä) ja konsentraatio sekä käytetty laitteisto. Mikrobien kasvatusalusta ja kasvatusolosuhteet vaikuttavat mikrobin kasvunopeuteen, mikä puolestaan vaikuttaa laadullisesti tulokseen. (Williams, Andrzejewski, Lay & Musser 2003.) Joidenkin maljojen lisäaineet kuten esim. mahdollisesti MacConckey -maljan kristallivioletti voi myös häiritä analyysiä (Croxatto ym. 2011).

6.1 Näytteen esivalmistelu

Rutiinianalytiikassa tavallisesti analysoidaan kokonaisia mikrobisoluja ilman esikäsitteilyjä. MALDI-TOF-analytiikassa on kuitenkin mahdollista soveltaa erilaisia näytteen esikäsitteilymenetelmiä tuloksen parantamiseksi tai turvallisuussyistä. Näytteenvalmistustekniikoita tutkittaessa on havaittu, että osa mikrobeista tarvitsee happokäsittelyn esim. muurahaishapolla. Tämän arvellaan johtuvan siitä, että matriisiaineen lisäys ja laserpommitus ei aina riko bakteerien soluseinää riittävästi, jotta solunsisäisiä proteiineja voisi kaasuuntua analyysin aikana. Solun sisäisten proteiinien vapautumista voi estää myös esimerkiksi bakteerin runsas kapselin ulkoinen polysakkaridiaines. (Croxatto ym. 2011, 382.)

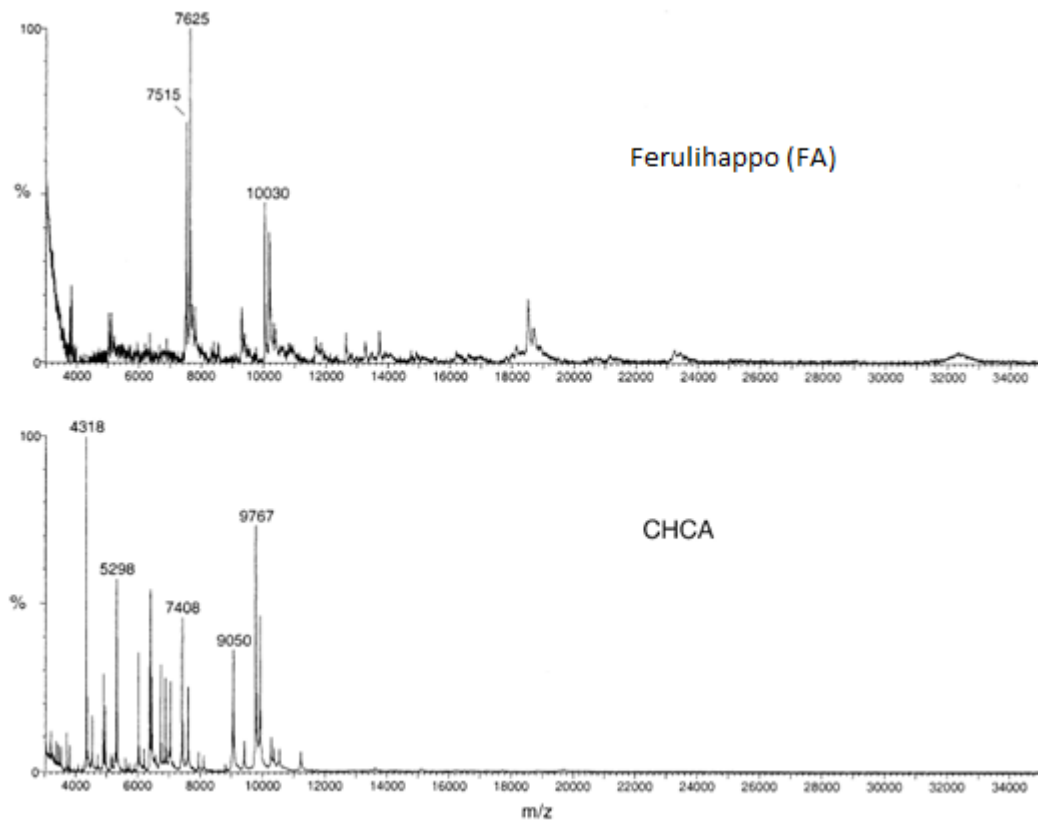
Mikäli analyysissä halutaan käyttää steriloituja näytteitä, joissa bakteerisolut ovat kuolleet, eri sterilisaatiomenetelmät vaikuttavat MALDI-TOF-spektriin. Kuvassa 8 on esitetty kuinka käsittely 70 % etanolissa sekä näytteen keittäminen kiehuvässä deionisoidussa vedessä vaikuttavat näytteen proteiinispektriin verrattuna käsittelemättömään näytteeseen. Steriloiduissa näytteissä nähdään piikkejä eri intensiteeteillä, mutta analysoituneet piikit ovat lähes samat verrattuna steriloiduttomaan näytteeseen. On huomattava, että MALDI-TOF-menetelmää käytettäessä ei voida käyttää sterilointimenetelmiä, joissa proteiinit muodostavat kovalenttisia sidoksia liuotimen kanssa (esim. formaldehydi). (Williams ym. 2003, 344-345.)



KUVA 8. Sterilointimenetelmän vaikutus proteiinispektriin. *Listeria innocua* bakteerin MALDI-TOF-spektrit a) steriloitu keittämällä 5min b) steriloitu 70 % etanolissa ja c) vertailu; näytettä ei ole steriloitu (mukaillen Williams ym. 2003, 345).

6.2 Matriisi

Käytetty matriisi vaikuttaa oleellisesti MALDI-TOF-spektrin laatuun. Matriiseja vertaillevassa tutkimuksessa kuvassa 9 on esitetty etanolisteriloidun listeria-bakteerin spektri FA- (ferulic acid) ja CHCA- matriiseja käyttäen. CHCA- matriisissa nähdään huomattavasti paljon enemmän piikkejä kuin FA- matriisissa. Matriisia valittaessa pyritään saamaan mahdollisimman paljon erottuvia piikkisignaaleja. Kuvan 9 esimerkissä CHCA-matriisi antaa paremman tuloksen kuin FA. (Williams ym. 2003, 345-348.)

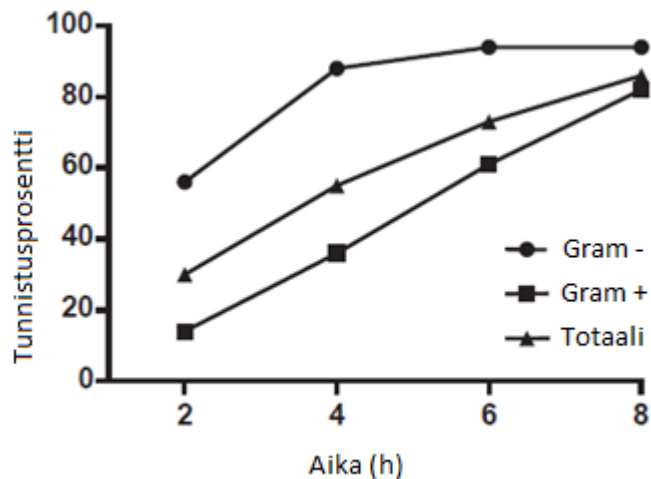


KUVA 9. Ylhäällä FA- ja alhaalla CHCA- matriisilla analysoitu listeria-bakteeri (Williams ym. 2003, 347). CHCA antaa tässä tapauksessa enemmän piikkejä ja on siten parempi matriisi.

Matriisien vaikutusta tulokseen voidaan myös optimoida lisäämällä matriisiaineeseen muita kemikaaleja. CHCA- ja FA- matriisien pH:ta voidaan säätää esim. lisäämällä muurahaishappoa tai TFA:ta (trifluoroacetic acid). Vertailevassa tutkimuksessa pH:n säätäminen näillä kemikaaleilla usein paransi tulosta. Hapon pitoisuus matriisissa on optimoitava, sillä liian korkeilla pitoisuuksilla spektrien laatu alkaa jälleen heiketä. Muurahaishapon optimipitoisuus CHCA- matriisissa on 5-10 % välillä. TFA:n pitoisuus CHCA -matriisissa tulisi olla korkeintaan 3 % optimaalisen tuloksen saamiseksi. (Williams ym. 2003, 347-348.) Laittevalmistajat, kuten bioMérieux, myyvät laitteiden ohessa valmiita kaupallisia matriisireagensseja. Valmiiden matriisireagenssien tarkkaa sisältöä ei kuitenkaan aina ilmoiteta tuotepakkauksessa. Eri valmistajien samannimiset valmiit reagenssit voivat siten olla kemialliselta koostumukseltaan poikkeavia keskenään.

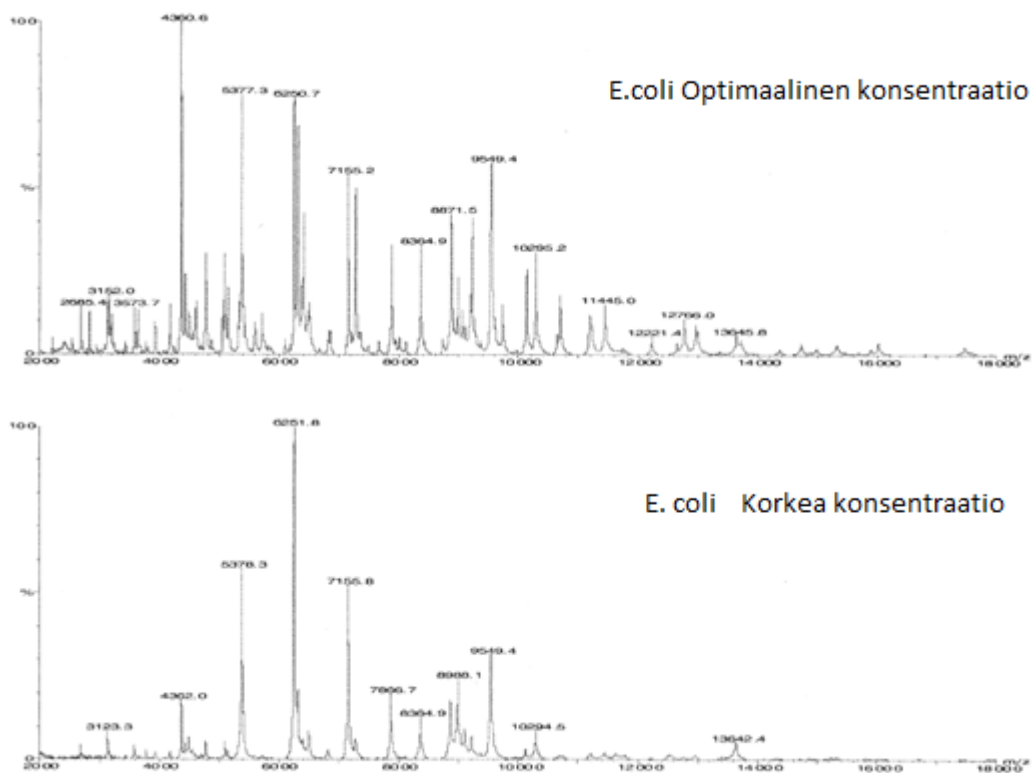
6.3 Inkubaatioaika

Laadukkaan spektrin saamiseksi on myös tärkeää, että näyttemateriaalia on riittävästi saatavilla. Tämän vuoksi bakteerien inkubaatio- eli kasvatusaika maljaviljelyssä on oltava riittävän pitkä. Tämä on ongelma erityisesti hitaasti kasvavilla bakteereilla. Maljalla kasvavien bakteerien inkubaatioaika onkin suoraan verrattavissa MALDI-TOF-analyysin onnistumiseen. bioMérieux suosittelee näytteille vähintään 18-24 tunnin inkubaatioaikaa. Tutkittaessa positiivisia veriviljelyitä havaittiin eräässä tutkimuksessa, että vain 30 % bakteereista oli tunnistettavissa kahden tunnin inkuboinnin jälkeen. Tunnistettavuus oli kokonaisuudessaan heikkoa alle neljä tuntia kasvaneilla näytteillä. Erityisen huono tunnistettavuus oli grampositiivisilla kokeilla, joiden tunnistettavuus jäi tutkimuksessa alle 60 % kuuden tunnin inkuboinnin jälkeen (kuva 10). Analysoidut gramnegatiiviset bakteerit tutkimuksessa olivat *E. coli*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Enterobacter cloacae*. Analysoidut grampositiiviset bakteerit olivat *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Staphylococcus hominis*. (Croxatto ym. 2011, 391.)



KUVA 10. Kuvaajassa MALDI-TOF-tunnistuksen kumulatiivinen onnistuminen (%) suhteessa inkubaatioaikaan (mukaillen Croxatto ym. 2011, 391).

Inkubaatioaika vaikuttaa saatavilla olevaan mikrobikonsentraation määrään. Myös mikrobikonsentraation vaikutusta itsessään MALDI-TOF-spektrin laatuun on tutkittu tekemällä mikrobista erilaisia laimennoksia matriisiliuoksen kanssa. Kuvassa 11 on esitetty *E. coli* proteiinispektrit eri bakteerikonsentraatioina. Kuvasta nähdään, että optimi sekoitus mikrobia ja matriisia antaa parempilaatuisen spektrin, kuin hyvin suuri mikrobimäärä matriisiin nähden. Käytännössä optimaalista konsentraatiota on vaikea vakioda, sillä näyte levitetään MALDI-TOF-näytealustalle silmämääräisesti. (Williams ym. 2003, 349.)



KUVA 11. Bakteerisolukonsentraation vaikutus spektriin (mukaillen Williams ym. 2003, 349). Optimikonsentraatiossa nähdään enemmän piikkejä kuin korkeassa konsentraatiossa.

6.4 Laitteisto

Myös MALDI-TOF-laitteistossa käytetty jännite partikkelien kiihdyttämiseksi vaikuttaa proteiinispektrin laatuun. Testattaessa erilaisia jännitteitä, parhaan tuloksen antoivat 25 kV ja 30 kV:n jännitteet. Matalimmilla jännitteillä spektrin piikit leviävät ja kokonaissignaalin laatu alkaa heiketä. Ionisoimiseen käytetyillä lasertyypeillä voi myös olla eroja. Tutkimuksissa on vertailtu mm. tyypilaserin ja Nd:Yag laserin eroja. Molemmat lasertyytit antoivat yhtä hyvän lopputuloksen, mutta tyypilaser joutuu etsimään näytteestä ns. ”hot spot” alueita, joissa ionisaatiota tapahtuu. Tässä tutkimuksessa Nd:Yag laser ionisoi näytteen paremmin ilman tarvetta etsiä näytteen hyviä kohtia. (Williams ym. 2003, 349-350.)

Ennen varsinaista MALDI-TOF-analyysiä tapahtuvat vaiheet voivat myös vaikuttaa tuloksen onnistumiseen silloin, jos näytettä lähdetään puhdistamaan suoraan veriviljelypullosta ilman maljaviljelyä. MALDI-TOF-menetelmän toimivuutta on vertailtu käytettäessä erityyppisiä veriviljelypulloja. Joissakin veriviljelypulloissa käytetään lisäaineena hiiltä, jonka on tarkoitus estää potilaan omien antimikrobiaalisten aineiden toimiminen veriviljelypullossa. Veriviljelypullojen vertailussa parhaiten MALDI-TOF-menetelmällä tunnistettiin näytteet, jotka olivat hiilettömistä pulloista. (Szabados, Michels, Kaase & Gatermann 2011.) Myös eri veriviljelyautomaatteja on vertailtu suhteessa MALDI-TOF-menetelmän toimivuuteen. Tutkimuksessa vertailtiin BACTEC-, VERSATEK- ja BacT/ALERT -veriviljelyautomaatteja, joista näytteitä MALDI-TOF-menetelmällä tunnistettiin eniten BACTEC:llä 76 %. VERSATEKIN ja BacT/ALERTin tunnistuslukemat olivat 69 % ja 62 % analysoiduista näytteistä. Näytteet olivat näissä tutkimuksissa esivalmisteltu sentrifugoimalla ja puhdistamalla proteiinimateriaalia suoraan veriviljelypulloista. (Romero-Gomez & Mingorance 2011, 251-252.)

7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyön tavoite on tuottaa tietoa Fimlab Laboratoriot Oy:lle MALDI-TOF-menetelmän sopivuudesta positiivisten veriviljelylöydösten tunnistamisessa nopeammin. Opinnäytetyö antaa myös hyödyllistä tietoa MALDI-TOF-menetelmästä ja siitä, kuinka menetelmää hyödynnetään veriviljelytutkimuksissa. Opinnäytetyöstä on hyötyä Fimlabin Laboratoriot Oy:n veriviljelytyöpisteelle mahdollisesti nopeuttaen analytiikkaa. Tästä on lopulta myös suurta hyötyä potilaalle sekä hoitavalle lääkärille nopeamman vastauksen saamisessa ja hoidon suuntaamisessa.

Opinnäytetyön tarkoituksena on testata MALDI-TOF-menetelmällä tehtävää bakteerin tunnistusta veriviljelynäytteistä entistä lyhyemmillä kasvatusajoilla. Kun veriviljelypullo tulee positiiviseksi veriviljelyautomaatissa, se viljellään maljalle ja kasvatetaan hiilidioksidikaapissa 18-24 tuntia. Tarkoitus on kokeilla voidaanko veriviljelynäytteiden mikrobeja tunnistaa tätä suositusaikaa lyhyemmillä ajoilla. Menetelmää testataan kahden, neljän ja kuuden tunnin kasvatuksen jälkeen. Saatuja tuloksia verrataan samalla menetelmällä analysoituihin näytteisiin, jotka ovat kasvaneet laitevalmistajan suositusajan mukaisesti 18-24 tuntia.

Tehtävänä on selvittää kasvatusajan lyhentämisen vaikutusta MALDI-TOF-menetelmän toimivuuteen, kuinka hyvin Vitek® MS-laite soveltuu positiivisten veriviljelyssä kasvien bakteerien tunnistukseen tiettyjen, ennalta mietittyjen aikapisteiden kohdalla. Tutkimuskysymyksenä pyritään selvittämään: voidaanko positiivisten veriviljelynäytteiden mikrobit tunnistaa suositusaikaa lyhyemmillä kasvatusajoilla?

8 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyö on laadultaan kvantitatiivinen tutkimus. Kvantitatiiviselle tutkimukselle ominaista on todellisuus, joka rakentuu objektiivisesti todettavista asioista. Keskeisiä asioita ovat mm. johtopäätökset aiemmista tutkimuksista, aiemmat teoriat, hypoteesien esittäminen ja käsitteiden määrittely. Muita huomioitavia asioita ovat koejärjestelyjen tai aineiston keruun suunnittelu ja aineiston saattaminen tilastollisesti käsiteltävään muotoon sekä päätelmien teko havaintoaineiston perusteella. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 139-141.) Tämän tyyppinen tutkimus selittää, mistä tekijöistä ilmiö koostuu ja mitkä tekijät vaikuttavat ilmiöön. Kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus on hyvin pitkälle muuttujien mittaamista sekä muuttujien suhteiden välisten vuorovaikutusten laskemista. (Kananen 2011, 12.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tutkittava ilmiö on sijoitettava johonkin teoriasuuntaukseen ja keskeiset käsitteet on määriteltävä. (Hirsjärvi ym. 2009, 142-145.) Opinnäytetyön teoriaosuudessa perehdytään menetelmän periaatteeseen ja siihen pohjautuvaan teoreettiseen tietoon. Kvantitatiiviseen tutkimusotteeseen lukeutuu yleistäminen, syy-seuraussuhteet sekä ennustaminen (Kananen 2011, 15.) Lähtökohtana tässä testauksessa voidaan olettaa, että tulokset huononevat jossain määrin kun kasvatusaikaa lyhennetään. Tutkijan rooli tällaisessa tutkimuksessa on ulkopuolinen/tarkkailija. Käsitys tiedosta on teknistä ja objektiivista ja aineistona saadaan useimmiten numeerisia arvoja (Kananen 2011, 15.) Aineistona tässä testauksessa saadaan bakteerien nimiä. Näitä tuloksia käsitellään numeerisesti taulukoiden ja kaavioiden muodossa.

Reliabiliteetti tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta. Reliabiliteetti voidaan todeta esim. jos kaksi arvioijaa päätyy samaan tulokseen (Hirsjärvi ym. 2009, 231.) Mittauksen reliabiliteetti on korkea, kun eri mittaajien toimesta ja eri mittauskerroilla saadaan samat tulokset (Kananen 2011, 118). Tämän opinnäytetyön testausosuuden reliabelius pätee vain Fimlab Laboratoriot Oy:lle toteutetussa testauksessa, sillä aineistoa ei testattu muissa laboratorioissa. MALDI-TOF-menetelmän mittaustuloksiin vaikuttavat oleellisesti mm. käytetty laitteisto ja spektritietokanta, näytteen esikäsittely ja käytetty matriisireagenssi.

Validius tarkoittaa mittarin kykyä mitata sitä, mitä on tarkoitus mitata. Validius varmistetaan käyttämällä tutkimuksessa oikeita menetelmiä, oikeita mittareita ja oikeiden asioiden mittaamista. (Kananen 2011, 121.) MALDI-TOF-menetelmän validius on varmistettu aikaisemmissa tutkimuksissa käyttäen mm. nukleiinihapposekvensointia ja biokeemiallisia menetelmiä MALDI-TOF-menetelmän vertailuun. Siten tiedetään varmuudella, että MALDI-TOF-menetelmä mittaa oikeita asioita. Sisältövaliditeetti tarkoittaa, että saadut tutkimustulokset ovat seurausta tutkimuksessa käytetyistä muuttujista (Kananen 2011, 122). Tämä testaus tutkii, miten aika vaikuttaa MALDI-TOF-menetelmällä saatuun tulokseen, joten muuttujana testauksessa on aika.

Opinnäytetyössä tulokset koskevat bakteerien tunnistusta veriviljelypulloista tiettyjen aikapisteen kohdalla. Otokoko oli 100 näytettä, jotka analysoitiin viikon aikana. Tähän näytemäärään päädyttiin, koska se oli mahdollista toteuttaa aikataulun puitteissa. Arvioimme myös tämän otokseen sisältävän riittävän määrän eri bakteerilajeja. Testauksesta rajattiin pois anaerobibakteerit ja muut mikrobit kuten hiivat.

Tulokset voidaan esittää taulukkomuodossa suhteellisina osuuksina eli prosentteina. Tärkeää on myös taulukon sanallisen tulkinnan kirjoittaminen. Taulukon auki kirjoittamisessa voidaan tulkita koko tutkimusjoukkoa kokonaisuutena sekä verrata ryhmien välisiä eroja. Analyysissä tuodaan esille, jos ryhmien välillä näyttää olevan eroja tai jos havaitaan jonkin muuttujan riippuvan toisesta. (Kananen 2011, 85-88.)

9 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyötä varten haimme luvan käytännön toteutusta varten Fimlab Laboratoriot Oy:ltä. Lupa myönnettiin MALDI-TOF-testaukseen opinnäytetyötä varten sekä työn julkaisemiseen tuloksineen Theseus-julkaisuarkistossa työn valmistuttua. Sovimme työelämäohjaajan kanssa käytännön toteutuksen joulukuulle 2013.

Käytännön osuutta varten Fimlab Laboratorioiden henkilökunnan toimesta oli kerätty valmiiksi lämpöhuoneeseen positiivisia aerobiveriviljelynäytteitä joulukuun ajalta. Näytteitä säilytettiin lämpökaapissa. Käytetyt veriviljelypullot olivat sekä hiilellisiä että hiilettömiä Bact/ALERT- aerobiviljelypulloja. Näytteitä tuli analysoitavaksi yhteensä 89 kappaletta. Lisäksi analysoimme 11 positiivista näytettä tuoreeltaan. Nämä näytteet tulivat siis analyysiin mukaan suoraan veriviljelyautomaatista. Yhteensä näytteitä analysoitiin siis 100 kpl. Testaus aloitettiin numeroimalla kaikki veriviljelypullot juoksevilla numerolla. Viljelymaljoina käytimme suklaamaljoja, myös nämä numeroitiin samalla tavalla. Ensin oli suunniteltava, millaisissa sarjoissa veriviljelypulloja ja maljoja oli kannattavaa käsitellä. Yhdellä VITEK® MS-massaspektrometrin näytealustalla on tilaa 48 näytteelle. Näytteistä tehtiin tavallisen näytteen lisäksi muurahaishappouuttokäsitelty näyte sekä molemmille rinnakkaisnäyte. Yksi näyte vie siis neljä analyysipaikkaa, joten näytealustalle mahtuu yhteensä 12 näytettä. Näytealustalla on myös lisäksi 3 kontrollinäytepaikkaa, joihin käytettiin *E. coli* ATCC 8739-kontrollikantaa. Testauksessa päätettiin työstää veriviljelypulloja sekä suklaamaljoja 12 näytteen sarjoissa.

Viljelyt suoritettiin laminaarivetokaapissa. Positiivisen veriviljelypullon suu pyyhittiin denaturoidulla etanoliliuksella, jotta pullon suulta ei tulisi kontaminaatiota kasvatusmaljoille. Veriviljelypulloja oli tärkeä sekoittaa muutaman kerran, jonka jälkeen näytettä vedettiin kertakäyttöruiskuun. Suklaamaljalle tiputettiin yksi tippa näytettä, josta tehtiin hajuusviljely viljelysauvalla. Jokaisesta näytteestä tehtiin vain yksi viljely suklaamaljalle. Näytteet vietiin 5 % hiilidioksidikaappiin +35 °C kasvamaan ja inkubaation aloituskelonaika merkittiin ylös. Näytteet analysoitiin kahden, neljän sekä kuuden tunnin inkuboinnin jälkeen ottamalla viljelysilmukalla näytettä maljalta huolimatta siitä, oliko maljalla pesäkekasvua vai ei. Maljat palautettiin takaisin hiilidioksidikaappiin mahdollisimman pian. Näytettä levitettiin MALDI-TOF-näytealustalle viljelysilmukalla ja päälle pipetoitiin 1 µl bioMérieux:n CHCA- matriisiliuosta. Toisiin näytteisiin pipetoitiin ennen

matriisiliuoksen lisäämistä 0,5µl bioMérieux:n 28,9 % muurahaishappoa, odotettiin minuutti ja pipetoitiin 1µl CHCA-matriisiliuosta. Näytteiden annettiin kuivua ennen analysointia. Näytteet analysoitiin bioMérieux:n VITEK® MS –massaspektrometrillä IVD -spektritietokantaa käyttäen. Samalla tavalla käsiteltiin kaikki 100 näytettä tarkkaa kirjanpitoa noudattaen.

Kahden sekä neljän tunnin ajan kasvaneelta maljalta otettiin kasvua primääri- ja sekundaariviljelyalueelta, koska pesäkekasvua ei ollut havaittavissa kovinkaan paljon. Kuusi tuntia kasvaneilta maljoilta näytettä otettiin toiselta/kolmannelta hajotusviljelyalueelta, jos siellä oli nähtävissä kasvua. Koko testauksen ajan kontrollina käytettiin samaa *E. coli* kontrollikantaa.

MALDI-TOF-menetelmällä saadut bakteerien identifikaatiotulokset taulukoitiin. Referenssituloksena käytettiin saman näytteen tulosta 18-24 tunnin kasvatuksen jälkeen. Käytännössä nämä referenssitulokset olivat Fimlabin aikaisemmin vastaanotetut tulokset. Referenssitulokset saimme mikrobiologian laboratorion kasvavien positiivisten veriviljelynäytteiden ”tulokset” kansioista. Kasvatimme kuitenkin kaikkia omia näytemaljojamme vielä vuorokauden yli. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen tarkastimme mikrobiologin kanssa vastasiko kasvanut pesäke morfologialtaan Fimlabin vastaanottamaa referenssitulosta. Osa näytteistä analysoitiin vielä uudestaan MALDI-TOF-menetelmällä, mikäli pesäkemorfologia meidän näytteissämme oli ristiriidassa vastatun referenssituloksen kanssa.

10 TULOKSET

10.1 Aineiston analyysi

Tutkimustulokset kerättiin Excel-taulukoon käytännön toteutuksen aikana. Aineiston analyysiä varten laskettiin ensin tunnistetut mikrobit aikapistettä kohden. Näin saatiin kappalemäärän mikrobeja mittauspistettä kohden. Tämä laskutapa ei ota huomioon, että kaikki 4 tunnin kohdalla tunnistetut bakteerit eivät saaneet tunnistustulosta enää kuuden tunnin aikapisteen kohdalla. Teimme tunnistuksen onnistumista kuvaavan taulukon, johon laskettiin kappalemääräisesti sekä prosentteina tunnistetut bakteerit. Tuorenäytteitä ja säilytettyjä näytteitä käsiteltiin tässä erillään, sillä näiden kahden ryhmän välillä oli selkeä ero. Taulukon pohjalta tehtiin myös kuvaaja, jossa näkyy ero tuorenäytteiden ja säilytettyjen näytteiden välillä.

Tunnistetut bakteerit aikapistettä kohden koottiin taulukkoon. Taulukosta arvioitiin mitkä bakteerit tunnistettiin hyvin ja mitkä huonosti. Myös bakteereista, jotka eivät saaneet tunnistustulosta minkään aikapisteen kohdalla, tehtiin oma taulukko.

10.2 Tulokset ja johtopäätökset

Kaikista sadasta näytteestä 4 hylättiin, sillä maljoilla ei kasvanut mitään 24 tunnin inkubaation jälkeen. Näissä näytteissä bakteerit olivat siis kuolleet. Näin hyväksyttävien näytteiden kokonaismääräksi jää 96 kpl. Kaikista 96 näytteestä lämpökaapissa säilytettyjä vanhoja näytteitä oli kaikkiaan 85 kpl ja tuoreita veriviljelyautomaatista saatuja näytteitä oli 11 kpl.

Laite antoi usein vastaukseksi *Haemophilus haemolyticus* tai *Haemophilus parahaemolyticus*. Näitä vastauksia käsiteltiin nollatuloksena, eli laite ei tunnistanut bakteeria. Veriviljepullosta tuleva veri aiheuttaa spektrin, jonka kone tulkitsee virheellisesti hemofilukseksi silloin kun näytteessä ei ole riittävästi mikrobia.

Kun 24 tuntia kasvaneiden näytteiden pesäkemorfologia tarkastettiin, kaksi näytettä oli ristiriidassa aikaisemmin vastattujen tulosten kanssa. Nämä näytteet tehtiin uudestaan

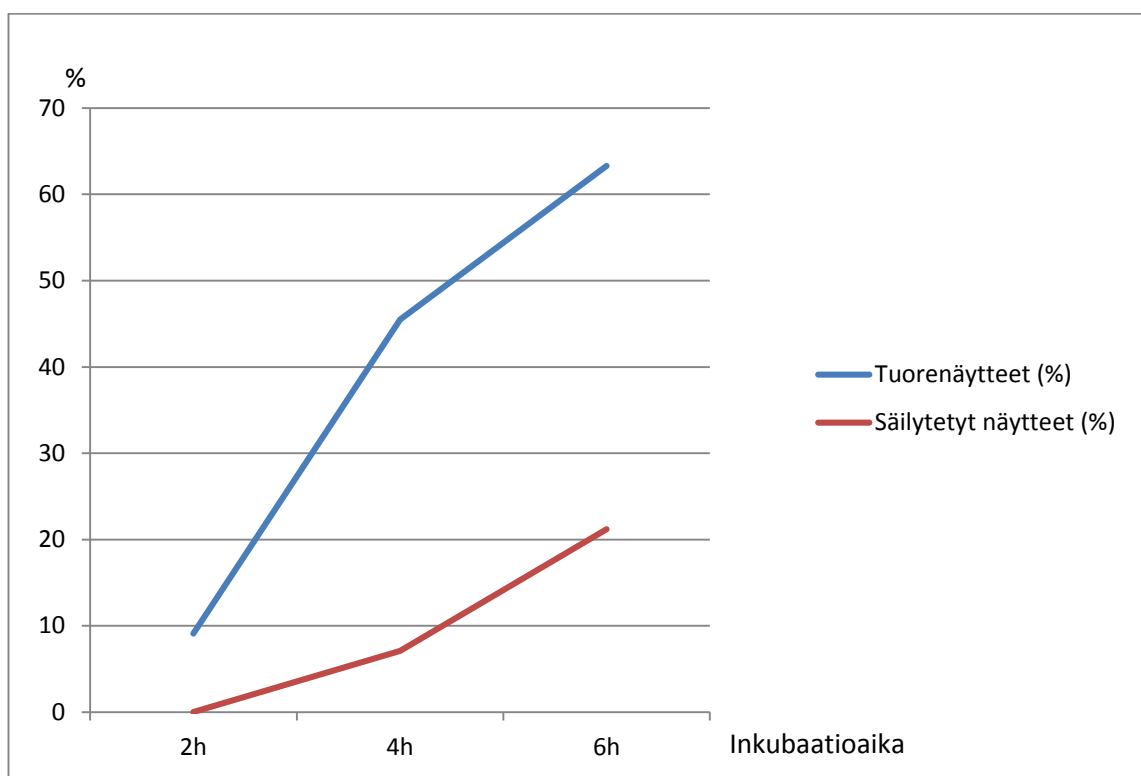
MALDI-TOF-menetelmällä. Näistä näytteistä toinen tunnistettiin kuuden tunnin inkuboinnin jälkeen *Klebsiella oxytoca*. Vastattu referenssitulos oli kuitenkin *E. faecium*. Bakteripesäke näytti Klebsiellalta ja uusinta-analyysi antoi vastaukseksi *K. oxytoca*. Tämä näyte hyväksyttiin siis oikein tunnistetuksi, vaikka referenssitulos oli ristiriitainen. Toinen ristiriitainen näyte tunnistettiin *Leuconostoc citreumiksi* kuuden tunnin inkuboinnin jälkeen. Vastattu referenssitulos oli *Micrococcus luteus*, mutta pesäkemorfologia ei näyttänyt mikrokokilta. Näyte tehtiin uusintana MALDI-TOF-menetelmällä, jolloin tulokseksi saatiin *S. epidermidis*. Tämä näyte siis tulkittiin väärin tunnistetuksi. Ristiriitaiset tulokset voivat johtua siitä, että näytteessä on ollut alun perin useaa mikrobia, joista toinen on kuollut näytteen säilytyksen aikana. Näytteeseen on voinut tulla myös kontaminaationa toinen mikrobi, joka on kasvanut hyvin.

Parhaiten tunnistettiin yleisesti *E. coli* sekä neljän ja kuuden tunnin aikapisteissä. Myös Klebsiellat tunnistettiin hyvin. Neljän tunnin aikapisteessä muita tunnistettuja lajeja olivat mm. *Citrobacter*- suku sekä tuoreista näytteistä seuraavat: *K. oxytoca*, *Streptococcus mitis*, *S. aureus* ja *Listeria monocytogenes*. Kuuden tunnin aikapisteessä tunnistettavia lajeja edellisten lisäksi olivat klebsiellat sekä tuorenäytteistä *M.luteus/lylae* ja *S. pyogenes*. Ainoa kahden tunnin pisteessä saatu vastaus oli *K. oxytoca* (tuore näyte). Taulukossa 2 on esitetty lukumääräisesti tunnistetut bakteerit suhteessa aikapisteisiin. Kuvassa 12 on esitetty myös tuorenäytteiden ja säilytettyjen näytteiden tunnistusprosentit eri aikapisteissä.

Tapauksia, joissa tunnistus saatiin muurahaishappokäsittelyllä, mutta ei ilman (missään aikapisteessä) oli 6 kpl. Näissä tapauksissa kyseessä olivat lajit: *E.coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter-suku*, *S. pyogenes* ja *L. monocytogenes*. Eli siis nämä 6 tunnistusta olisivat jääneet nollatuloksiksi ilman muurahaishappokäsittelyä. Yleisesti ottaen enemmän oikeita tunnistuksia kuitenkin tuli ilman muurahaishappokäsittelyä. Tuoreista näytteistä oikea tunnistus saatiin 6 tunnin sisällä kaikki aikapisteet huomioiden 82% näytteistä. Säilytetyistä vanhoista näytteistä oikea tunnistus saatiin 6 tunnin sisällä vain 22% näytteistä.

TAULUKKO 2. Tunnistetut bakteerit suhteessa aikaan

Säilytetyt näytteet (n=85)			
AIKA	2h	4h	6h
Tunnistuneet bakteerit (%)	0	7,1	21,2
Tunnistuneet bakteerit (kpl)	0	6	18
Tuoreet näytteet (n=11)			
AIKA	2h	4h	6h
Tunnistuneet bakteerit (%)	9,1	45,5	63,6
Tunnistuneet bakteerit (kpl)	1	5	7



KUVA 12. Tuoreenäytteiden ja säilytettyjen näytteiden vertailu eri aikapisteissä.

Testaukseen tuli 21 erilaista bakteeria. Kaikista tutkimukseen tulleista bakteerilajeista 10 erilaista lajia tunnistettiin MALDI-TOF-menetelmällä kuuden tunnin sisällä. Testauksessa 11 bakteerilajia ei tunnistettu ollenkaan. Tunnistetut bakteerit on esitetty taulukossa 3 kappalemääräisesti kahden, neljän ja kuuden tunnin aikapisteiden kohdalla.

TAULUKKO 3. Tunnistetut bakteerit MALDI-TOF-menetelmällä

Referenssitulos	kpl	2h	4h	6h
<i>E. coli</i>	31		6	14
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	1	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6			1
<i>Staphylococcus aureus</i>	14		1	2
<i>Citrobacter youngae</i>	1			1
<i>Citrobacter species</i>	2		1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1		1	1
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	2		1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1			1
<i>Micrococcus luteus</i>	2			1

Bakteerit, joita VITEK® MS ei tunnistanut testauksessa ollenkaan ovat esitetty taulukossa 4. Taulukko havainnollistaa, että *E.faecium* ja *S.epidermidis* olivat huonosti tunnistettavissa lyhyen inkubaatioajan jälkeen.

TAULUKKO 4. Bakteerit, joille ei saatu tunnistustulosta

Ei tunnistusta	Kpl
<i>Enterococcus faecium</i>	11
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
<i>Staphylococcus capitis</i>	3
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2
<i>Streptococcus viridans</i>	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>Serratia liquefaciens</i>	1
<i>Citrobacter koseri</i>	1

Testauksessa ongelmana oli, että käytetyt näytteet olivat 1-3 viikkoa vanhoja veriviljelynäytteitä, joita oli säilytetty lämpökaapissa. Tämä vaikutti oleellisesti tunnistustuloksiin. Tuoreiden näytteiden ja vanhojen näytteiden välillä oli selkeä ero kasvunopeudessa.

Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että tuorenäytteet olivat eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa. Kun eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa oleva bakteeri viljellään uudelle alustalle, lag- vaihetta ei ole tai se on hyvin lyhyt. Vanhoissa säilytetyissä näytteissä bakteerit olivat todennäköisimmin jo kuolemis- tai stationäärikasvun vaiheessa. Tällöin lag- vaihe on pitkä, mikä vaikutti testauksen tuloksiin, sillä tutkimme ajan vaikutusta bakteerin tunnistettavuuteen MALDI-TOF-menetelmällä. Tähän testaukseen vaikutti siis oleellisesti bakteerin kasvunopeus maljalla ja lag-vaiheen pituus siirrostaamisen jälkeen. Tuorenäytteitä tuli testattavaksi hyvin vähän. Jotta johtopäätöksiä voidaan tehdä, tuorenäytteitä olisi pitänyt olla määrällisesti enemmän, jotta useampi bakteerilaji olisi tullut testatuksi.

Johtopäätöksenä todetaan, ettei inkubaatioajan lyhentämistä MALDI-TOF-menetelmällä voi tutkia vanhoista veriviljelynäytteistä. Näytteiden tulee olla mahdollisimman tuoreita ja ne pitää viljellä maljoille heti, kun veriviljelyautomaatti ilmoittaa näytteen positiiviseksi.

Koska eräät bakteerilajit tunnistettiin paremmin kuin muut, voidaan kuitenkin arvella, että lyhyempää inkubaatioaikaa voidaan käyttää nopeasti kasvaville bakteerilajeille. Testauksessa esim. *E.coli* (gramneg.), Klebsiella-sukuiset bakteerit (gramneg.), Citrobacter-sukuiset bakteerit (gramneg.) ja *S. aureus* (grampos.) tunnistettiin hieman paremmin kuin muut. Näistä *E. coli*, Klebsiella- suku ja *S. aureus* kuuluvat yleisimpiin veriviljelylöydöksiin, jotka on esitetty taulukossa 1 (s.14). Enterokokit tunnistettiin huonosti. *E. faecium* (grampos.) bakteereja oli mukana testauksessa 11 kpl, joista yhdellekään ei saatu tunnistustulosta. Myös muut stafylokokit, *S.aureusta* lukuun ottamatta, tunnistettiin huonosti. Näitä stafylokokkeja oli testauksessa kaikkiaan 14 kpl, joista yhdellekään ei saatu tunnistustulosta.

Aikaisempien tutkimusten perusteella osasimme odottaa, että gramnegatiiviset sauvat ovat paremmin tunnistettavissa lyhyellä inkubaatioajalla verrattuna grampositiivisiin kokkeihin. Parhaiten tunnistustuloksia saaneet mikrobit olivat *E.coli* ja Klebsiella- sukuiset bakteerit. Huonoiten puolestaan tunnistettiin *E. faecium* ja *E. faecalis*. Tämä havainto tukee aiemmin havaittuja tutkimustuloksia gram-ryhmittelyn mukaan.

Saatuja proteiinispektrejä tarkasteltiin myös silmämääräisesti. Tarkasteltavaksi otettiin pieni joukko spektrejä, joista tulosta ei saatu VITEK® MS menetelmällä. Vertaamalla

näitä spektriipukkeja hyväksytyjen näytteiden spektreihin, osan näytteistä olisi voinut hyväksyä tunnistetuksi pelkästään spektrin silmämääräisellä tarkastelulla, vaikka laite ei tunnistanut bakteeria. Esimerkkinä liitteessä 1 on esitetty *E.colin* spektrejä, joita VITEK® MS ei tunnistanut, mutta jotka olisi voinut tunnistaa *E.coliksi* silmämääräisellä tarkastelulla. Näitä spektrejä vertaamalla kuvassa 5 (s.24) esitettyyn *E.colin* esimerkkispektriin voidaan todeta, että tietyt yhtäläisyydet proteiinispektreissä ovat nähtävissä. Tämä osoittaa osaltaan laitteen rajoitukset tunnistaa bakteeri, silloin kun spektrin laatu on tavallista heikompi tai kun näytteeseen tulee verta, joka aiheuttaa taustahäiriötä.

Jatkotutkimuksena ehdotetaan, että Fimlab Laboratoriot Oy tekee testauksen uudestaan käyttäen tuoreita näytteitä. Testauksessa tuli esille selvästi kaksi erilaista ryhmää tuoreiden näytteiden ja säilöttyjen näytteiden välille. Näytteiden säilyttäminen vaikutti siten oleellisesti tuloksia huonontavasti.

11 POHDINTA

Opinnäytetyössä testasimme positiivisten veriviljelynäytteiden aerobisten bakteerien tunnistusta MALDI-TOF-menetelmällä lyhennetyillä kasvatusajoilla. Tavoitteena oli tuottaa tietoa Fimlab Laboratoriot Oy:lle MALDI-TOF-menetelmän soveltuvuudesta tunnistaa nopeammin veriviljelynäytteissä kasvavia bakteereja. Tarkoitus oli testata MALDI-TOF-menetelmää veriviljelyssä kasvavien bakteereiden tunnistamiseen kahden, neljän ja kuuden tunnin aikapisteen kohdalla. Tämän tavoite oli nopeuttaa veriviljely diagnostiikkaa.

Testaus onnistui suunnitellusti, mutta tunnistustuloksia saatiin oletettua vähemmän. Tämä johtui siitä, että käytetyt näytteet olivat vanhoja. Tämän vuoksi saadut tulokset ovat suuntaa antavia ja testaus pitäisi uusia käyttäen tuoreita näytteitä. Voidaan kuitenkin arvela, että inkubaatioaikaa voidaan lyhentää suositellusta 18-24 tunnin inkubaatioajasta. Ajan lyhentämisen vaikutusta on tutkittu aikaisemminkin ja se näyttäisi soveltuvan ainakin tietyille bakteerilajeille. Myös tässä testauksessa tietyt bakteerilajit tunnistettiin paremmin kuin toiset.

Tässä opinnäytetyössä perehdyttiin bakteerien ominaisuuksiin, veriviljelytutkimukseen, perinteisiin tunnistusmenetelmiin, MALDI-TOF-menetelmään perustuvaan VITEK® MS- laitteistoon sekä menetelmään vaikuttaviin tekijöihin. Nämä ovat antaneet hyödyllistä tietoa MALDI-TOF-menetelmään liittyvässä testauksessa.

Haluamme kiittää Fimlab laboratoriot Oy:n henkilökuntaa saamastamme avusta ja opastuksesta käytännön toteutuksen aikana. Kiitämme myös mikrobiologi Jari Hirvosta, joka ohjasi työtämme ja antoi arvokasta tietoa opinnäytetyön sisältöön.

LÄHTEET

Bakteeri, viljely (verestä). 2012. Fimlab Laboratoriot Oy. Tulostettu 20.12.2013.

Bakteeriviljely 1. 1/2009. Ulkoinen laadunarviointikierrös. Labquality. Luettu 27.4.2014. www.labquality.org/LQ/pdf

Biochemical Identification. 2012. RapID Brochure. Thermo Fisher Scientific. Luettu 27.4.2014. www.remel.com/PDF/RapIDBrochure.pdf

Bizzini A. & Greub G. 2010. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, a Revolution in Clinical Microbial Identification. *Clinical Microbiology Infection*.

Cappuccino, J. & Sherman, N. 1999. *Microbiology : A Laboratory Manual*. 5. uusittu painos. California: Benjamin/Cummings Science Publishing.

CHROMagar. 2013. Tuoteluettelo. Labema Oy. Luettu 6.5.2014. www.chromagar.com/images_spaw/

Clark, A., Kaleta, E., Arora, A. & Wolk, D. 2013 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 547.

Crocker, J. & Burrett, D. 2005. *The Science of Laboratory Diagnosis*. 2. uusittu painos. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd.

Croxatto, A. Prod'hom, G. & Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *Microbiology Reviews* 36, 380-407.

Forbes, B., Sahm, D. & Weissfeld, A. 2007. *Diagnostic Microbiology*. 12. uusittu painos. Missouri: Mosby Elsevier.

Hale C. 2013. Grampositive Streptococcus species. *Microbiology. PathologyOutlines.com*. Luettu 27.4.2014. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/microbiologystreptococci.html>

Hartgrove, K., Intrevado, P. & Abel, S. R. 2008. Validation Study: Clarity Multistrip Urocheck. *Journal of the American Society for Clinical Laboratory Science. Clinical Laboratory Science* 21 (3), 158–161.

Hautala T. 2007. Veriviljely vakavavien yleisinfektioiden diagnostiikassa: klinikon näkökulma. Luentomateriaali. Labqualitypäivät.

Hellsten, S. Toim. 2005. *Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Hirsjärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2009. *Tutki ja Kirjoita*. 15. uusittu painos. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy.

Hirvonen J. Mikrobiologi. 2014. Asiantuntijalausunto. Joulukuu 2013. Tampere. Fimlab laboratoriot Oy.

Hsieh, S., Tseng, C., Lee, Y., Kuo, A., Sun, C., Lin, Y. & Chen J. 2008. Highly Efficient Classification and Identification of Human Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics* 7, 448-465.

Kananen J. 2011. Kvantti- kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän Ammattikorkeakoulu.

Kauranen J. & Malila T. 2013. Automaation vaikutus bakteriologian rutiiniin, VITEK MS. Kiertokouluesitys. Oulu: Nordlab.

Leboffe, M. & Pierce, B. 1996. A Photographig Atlas for the Microbiology Laboratory. Colorado, USA: Morton Publishing Company.

Leibovici L., Shraga I., Drucker M., Konigsberger H., Samra Z. & Pitlik S.D. 1998. The Benefit of Appropriate Empirical Antibiotic Treatment in Patients with Bloodstream Infection. *Journal of Internal Medicine*. 244 (5), 379-386.

Madigan M., Martinko J. & Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. 10 painos. Pearson Education Inc. (23, 74-81;142-145; 223, 207; 341-346)

Moini, J. 2012. Phlebotomy Principles and Practice. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning.

Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Pfaller, M. & Tenover, R. 2003. Manual of Clinical Microbiology. 8. uusittu painos. Washington, D.C.: ASM Press.

NCBI Taksonomy-Encyclopedia of Life, hakusana E.Coli. Luettu 5.4.2014. <http://eol.org/>

Prescott L., Harley J. & Klein D. 2002. Microbiology. 5. painos. McGraw-Hill Higher Education. 113-116

RapID™ System. 2014. Thermo Scientific. Luettu 26.3.14. <http://www.remel.com/Clinical/DiagnosticTests/RapIDSystem.aspx>

Romero-Gomez M. & Mingorance J. 2011. The Effect of the Blood Culture Bottle Type in the Rate of Direct Identification from Positive Cultures by Matrix-assisted Laser Desorption/ionisation Time-of-flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *Journal of Infection* 62, 251-253.

Selective and Differential Media for Identifying Micro-organisms. Virtual Amrita Laboratories Universalizing Education. Amrita University. Luettu 25.4.2014. <http://amrita.vlab.co.in/>

Struthers, J. & Westran, R. 2003. Clinical Bacteriology. London, UK: Manson Publishing Ltd.

Szabados F, Michels M, Kaase M & Gatermann S. 2011. The Sensitivity of Direct Identification from Positive BacT/ALERT (bioMerieux) Blood Culture Bottles by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry is Low. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 192–195.

Weinstein M. 1996. *Current Blood Culture Methods and Systems: Clinical Concepts, Technology and Interpretation of Results*. University of Medicine and Dentistry of New Jersey.

Williams T., Andrzejewski D., Lay J. & Musser S. 2003. Experimental Factors Affecting the Quality and Reproducibility of MALDI TOF Mass Spectra Obtained from Whole Bacteria Cells. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14, 342-351.

VITEK® 2 Compact. 2014. BioMerieux-Diagnostics. Luettu 24.3.2014
<http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-2-compact>

VITEK® MS. 2014. BioMerieux-Diagnostics. Luettu 24.3.2014
<http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-ms>

Yleisimmät varmistustestaukset mastiittidiagnostiikassa. 2011. Työohje. Evira. Luettu 27.4.2014. <http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/>

LIITTEET**Liite 1 *E.colin* spektrejä**