

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Kliininen mikrobiologia
2013

Katjuska Korhonen ja Henriikka Tursas

MALDI SEPSITYPER KITILLÄ SAATUJEN POSITIIVISTEN VE- RIVILJELYTULOSTEN LUO- TETTAVUUDEN ARVIOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Kliininen mikrobiologia

Syky 2013 | 53+2

Ohjaajat: Seija Kirkko-Jaakkola ja Inka Harju

Katjuska Korhonen ja Henriikka Tursas

MALDI SEPSITYPER KITILLÄ SAATUJEN POSITIIVISTEN VERIVILJELYTULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Veriviljely on yksi tärkeimmistä ja käytetyimmistä tutkimuksista kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Positiivisista veriviljelynäytteistä etsitään pääsääntöisesti sepsistä eli verenmyrkytystä aiheuttavia mikrobeja. Tällaisia patogeeneja voivat olla sekä aerobiset että anaerobiset bakteerit ja hiiva. Potilaan iästä riippuen tyypillisimpiä veriviljelynäytteissä esiintyviä mikrobeja ovat enterokokit, stafylokokit, streptokokit ja enterobakteerit.

Patogeenit voidaan löytää positiivisista veriviljelynäytteistä useilla erilaisilla rutiinitutkimuksilla. Laboratoriossa yleisimmin käytettyjä rutiinitutkimuksia ovat bakteeriviljely ja gramvärjäys. Positiivisten veriviljelynäytteiden mikrobit voidaan myös identifioida esikäsittelemällä ne MALDI Sepsityper Kitin avulla ja analysoimalla esikäsitellyt näytteet MALDI-TOF MS –laitteella.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata MALDI Sepsityper Kitin soveltuvuutta mikrobien nopeaan tunnistukseen positiivisista veriviljelypulloista. Tutkimuksen tavoitteena oli, että mikrobien nopea tunnistus positiivisista veriviljelynäytteistä mahdollistaa potilaalle annettavan antibiootihoidon tarkemman kohdentamisen tunnistettuun taudinaiheuttajaan.

Tutkimus tehtiin TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Tutkimusaineistona käytettiin 44 (=n) tuoretta positiivista veriviljelypulloa, jotka olivat peräisin Turun kaupunginsairaalan ja Tyksin kantasairaalan potilaista. Näytteet esikäsiteltiin MALDI Sepsityper Kitillä ja analysoitiin MALDI-TOF MS –analysointilaitteella. Tutkimuksessa saatuja bakteeritunnistustuloksia verrattiin rutiinitutkimuksilla saatuihin tuloksiin. Tutkimusaineistosta 62 % saatiin identifioitua MALDI:lla. Sitä vastoin rutiinitutkimuksilla kaikkien tutkittujen verinäytteiden bakteeri-identifikaatiot onnistuivat hyvin (100 %).

Tutkimuksessa tunnistettiin paremmin gramnegatiiviset sauvat kuin grampositiiviset kokit. Tutkimuksessa käytetty menetelmä oli kuitenkin melko epäherkkä, sillä suuri osa näytteistä jäi identifioimatta. Tutkimustulosten perusteella bakteeriviljely ja siitä tehtävät jatkotutkimukset ovat herkempi tutkimusmetodi kuin MALDI Sepsityper Kitin –esikäsitelymenetelmä infektioautien kliinisessä diagnostiikassa.

ASIASANAT:

Veriviljely, MALDI Sepsityper Kit, MALDI-TOF MS –menetelmä ja rutiinitutkimukset

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme of Biomedical Laboratory Science | Microbiology

Autumn 2013 | 53+2

Instructors: Seija Kirkko-Jaakkola & Inka Harju

Katjuska Korhonen ja Henriikka Tursas

EVALUATION OF THE RELIABILITY OF POSITIVE BLOOD CULTURE RESULTS BY MALDI SEPSITYPER KIT

Blood culture is one of the most important and used analysis in the clinical microbiology laboratory. Positive blood culture samples are usually examined for microbes that cause sepsis. These pathogens can be aerobic bacteria, anaerobic bacteria or yeast. Depending on patient's age the most common blood culture findings are enterococci, staphylococci, streptococci and enterobacteria.

Pathogens can be found from positive blood culture samples by using many different routine identification methods. In the laboratory the most commonly used routine identification methods are bacterial culture and Gram stain. Identification of microbes is also possible directly from the blood sample. The blood samples are preprocessed by The MALDI Sepsityper Kit and analyzed by MALDI-TOF MS analyzer.

The purpose of this study was to test the suitability of The MALDI Sepsityper Kit for rapid identification of microbes from positive blood culture bottles. The objective of this study was to make possible the precise targeting of the antibiotic treatment by rapid identification of microbes.

The study was performed at The Clinical Microbiology Laboratory of TYKSLAB. Altogether 44 (=n) fresh positive blood samples were analyzed. Blood culture samples were collected from the patients of Turku City Hospital and the patients of The Turku University Hospital. The blood samples were preprocessed by The MALDI Sepsityper Kit and analyzed by MALDI-TOF MS analyzer. The bacterial identification results were then compared with the results collected by routine identification methods. 62 percent of all blood culture samples were identified correctly by using The MALDI Sepsityper Kit and MALDI-TOF MS analyzer. Instead of all of examined blood culture samples (100 %) were identified by the routine identification method.

In the study Gramnegative rods were identified better than Grampositive cocci. However, the method used in the study was a rather insensitive because a large part of the samples were misidentified. According to the results of the study bacterial culture and other routine identification methods are a more sensitive reliable method of diagnosing infectious diseases in clinical work.

KEYWORDS:

Blood culture, MALDI Sepsityper Kit, MALDI-TOF MS –method, Routine identification methods

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 VERIVILJELYT	7
2.1 Yleistä veriviljelyistä	7
2.2 Veriviljelyjen näytteenotto	8
3 MALDI-TOF MS –MENETELMÄ	11
3.1 Yleistä MALDI-TOF MS –menetelmästä	11
3.2 MALDI-TOF MS –menetelmän periaate	12
3.3 MALDI-TOF MS –menetelmällä saatujen tulosten analysointi	13
4 MUUT IDENTIFIKAATIOMENETELMÄT	15
4.1 Bakteeriviljely	15
4.2 Gramvärjäys	16
4.3 Bakteerien tunnistustestit	18
4.4 Antibioottiherkkyysmääritykset	20
5 VERIVILJELYISTÄ TUNNISTETTAVAT PATOGEENIT	22
5.1 Yleistä veriviljelypatogeeneista	22
5.2 Streptokokit	22
5.3 Stafylokokit	24
5.4 Enterokokit	26
5.5 Enterobakteerit	27
6 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	29
7 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSONGELMAT	31
8 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖNTOTEUTUS	32
8.1 Tutkimuksen metodologiset lähtökohdat	32
8.2 Tutkimuksen käytännön toteutus	32
8.3 Tutkimuksen eettiset lähtökohdat	36
9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	38
10 POHDINTA	44

10.1 Johtopäätökset	44
10.2 Tutkimuksen luotettavuuden arviointi	45
10.3 Tutkimuksen eettisyyden arviointi	49
10.4 Opinnäytetyön rakenne	49
LÄHTEET	50

LIITTEET

Liite 1. Tutkimuslupahakemus

Liite 2. MALDI Sepsityper Kitillä esikäsitellyistä verinäytteistä saadut bakteerinimet ja vastaavuuspisteet MALDI-TOF MS –laitteella sekä muilla rutiinitutkimuksilla saadut tulokset

KUVAT

Kuva 1. Brukerin MALDI-TOF MS –analysaattori (Korhonen & Tursas 2013)	12
Kuva 2. MALDI Flex control –ohjelmassa näkyvä proteiinispektri ja vihreällä näkyvät analysoidut näyteympyrät (MALDI-TOF MS –analysaattorin Flex control –ohjelma 2013).	14
Kuva 3. Gramvärjäyksen työvaiheet (Solunetti 2006).	17
Kuva 4. MALDI-TOF MS –menetelmässä käytettävä näytelevy (Korhonen & Tursas 2013).	35
Kuva 5. Veriviljelynäytteiden esikäsitelyssä tarvittavat välineet, liuokset ja reagenssit (Korhonen & Tursas 2013).	36

KUVIOT

Kuvio 1. Esikäsitelyllä ja MALDI-TOF MS –menetelmällä saadut bakteeritunnistustulokset.	39
Kuvio 2. Esikäsitelyllä ja MALDI-TOF MS –menetelmällä saatujen tulosten luotettavuusjakauma.	40
Kuvio 3 25 %:sen muurahaishappokäsittelyn vaikutus veriviljelytuloksiin.	41
Kuvio 4 Tutkimuksessa käytettävillä menetelmillä ja rutiinitutkimuksilla saatujen tulosten vertailu.	42
Kuvio 5. Esikäsitellyistä veriviljelynäytteistä MALDI-TOF MS –laitteella epäonnistuneesti identifioidut bakteerilaji.	43

1 JOHDANTO

Sepsis eli verenmyrkytys on yleinen ongelma erikoissairaanhoidossa. Kyseiseen keskushermostoinfektiin liittyy suuri kuolleisuus ja resurssien tarve. Sepsiksen varhaisella toteamisella ja systemaattisen hoidon nopealla aloittamisella on merkittävä vaikutus potilaan ennusteeseen. (Käypähoito 2011.) Veriviljelyistä etsitään pääsääntöisesti mahdollisia sepsiksen aiheuttajia. Lisäksi veriviljelynäytteet otetaan tilanteissa, kun potilaan oireiden aiheuttajaksi epäillään muun muassa bakteremiaa, endokardiittia tai osteomyeliittiä (Levinson 1994).

Veriviljelynäytteet otetaan normaalisti aikuiselta kahteen eri veriviljelypulloon kahtena eri näytteenottokertana (Tykslab tutkimusohjekirja 2013). Verinäytettä tulee olla riittävästi, jotta suurin osa bakteremioista pystytään diagnosoimaan (Nissinen 2010). Positiivisista veriviljelynäytteistä tehdään bakteeriviljelyt kiinteää elatusainetta sisältäville viljelymaljoille, gramvärjäys sekä tarvittavat jatkotutkimukset. Positiivisten veriviljelynäytteiden sisältämät mikrobit voidaan myös identifioida suoraan veriviljelypullosta esikäsittelemällä näytteet ensin MALDI Sepsityper Kitillä. (Mikrobiologian harjoittelu 2013.) Tämän jälkeen esikäsitellyt näytteet analysoidaan MALDI-TOF MS -laitteella, jonka toiminta perustuu mikrobien proteiinien laskemiseen lentoaikaspektrometrisesti (Dare 2010).

Opinnäytetyön aiheena on MALDI Sepsityper Kitillä saatujen positiivisten veriviljelytulosten luotettavuuden arviointi. Tarkoituksena on testata MALDI Sepsityper Kitin soveltuvuutta mikrobien nopeaan tunnistukseen positiivisista veriviljelypulloista. Tutkimuksen tavoitteena on mikrobien nopea tunnistus positiivisista veriviljelynäytteistä, mikä mahdollistaa antibiootihoidon tarkemman kohdentamisen tunnistettuun taudinaiheuttajaan.

2 VERIVILJELYT

2.1 Yleistä veriviljelyistä

Veren bakteeriviljely eli veriviljely on yksi tärkeimmistä ja eniten käytetyimmistä tutkimuksista kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Veriviljely otetaan tilanteissa, kun potilaan oireiden aiheuttajaksi epäillään bakteremiaa, sepsistä, endokardiittia tai osteomyeliittiä. (Nissinen 2010, Levinson 1994.)

Bakteremia on tila, jossa potilaan verenkierrossa esiintyy normaalia enemmän bakteereita, joita ihmisen oma puolustusjärjestelmä ei pysty poistamaan. Ihmisen verenkiertoon pääsee normaalisti hieman bakteereita esimerkiksi limakalvojen kautta, mutta terve elimistö kykenee poistamaan bakteerit verestä ilman oireita. Bakteremia voi johtaa hengenvaaralliseen sepsikseen eli verenmyrkytykseen, joka on merkki bakteerien lisääntymisestä verenkierrossa. Sepsis voi johtua paikallisesta bakteeritulehduksesta, kuten virtsatietulehduksesta, haavainfektiosta tai keuhkokuumeesta. Infektiopuolustusta heikentävä perussairaus altistaa yleensä sepsiksen synnylle. (Nissinen 2010.) Sepsistä tulee epäillä, mikäli kyseessä on epätavallisen huonokuntoinen ja rajuoireinen potilas. Sepsiksen oireita ovat muun muassa yleinen kuumeilu, sairaudentunne, vilunväristykset, pahoinvointi ja oksentelu sekä tihentynyt hengitys ja sekavuus. Sepsikseen voi liittyä myös iho-oireita, jotka ilmenevät petekkioina eli pieninä verenpurkauksina iholla. Sepsistä epäiltäessä potilaalta otetaan verinäyte veriviljelypulloihin ennen antibioottilääkityksen aloittamista. Tämän jälkeen potilaalle aloitetaan sairaalassa antibioottilääkitys, huolehditaan nesteytyksestä sekä estetään verenpaineen lasku ja septisen sokin kehittyminen. (Lumio 2009, Anttila 2013.)

Sepsis voi johtaa taas endokardiittiin eli sydänläppien tulehdukseen tai osteomyeliittiin eli luutulehdukseen. Endokardiitissa bakteerit tarttuvat sydämen läppien sisäpinnoille aiheuttaen tulehduksen, kun taas osteomyeliitissä bakteerit kulkeutuvat luuhun verenkierron kautta aiheuttaen akuutin tai kroonisen luutulehduksen. (Mustajoki 2012, Lumio 2013.) Kyseiset infektiot eivät ole aina seurausta sepsiksestä. Osteomyeliitti ja endokardiitti voivat syntyä myös bakteremian

johdosta, jolloin bakteerit leviävät veren mukana sydämeen tai luuhun. (Harju 2013c.)

2.2 Veriviljelyjen näytteenotto

Veriviljelynäytteet otetaan aina ennen muita verikokeita siipineulalla tai 20 ml:n kertakäyttöruiskulla perifeerisestä laskimosta tai pyydettäessä suonensisäisestä katetrasta (Tuokko ym. 2008, Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b, Tykslab tutkimusohjekirja 2013). Veriviljelynäytteet otetaan suoraan elatusainetta sisältäviin veriviljelypulloihin, jolloin näytteiden mahdollinen bakteerikasvu alkaa heti näytteenoton jälkeen. Tämä on erityisen tärkeää niissä tilanteissa, joissa veren bakteeripitoisuus on hyvin matala. Tällöin veriviljelypulloissa oleva yksikin bakteeri saadaan rikastumaan jo muutamassa tunnissa runsaaksi kasvustoksi. (Nissinen 2010.)

Aikuisilta veriviljelynäytteet otetaan normaalisti kahteen eri veriviljelypulloon kahtena eri näytteenottokertana, sillä bakteerien esiintyminen verenkierrossa on useimmiten jaksottaista. Veriviljelynäytteet otetaan ensin aerobipulloon (BACTEC PLUS Aerobic/F) ja sitten anaerobipulloon (BACTEC PLUS Anaerobic/F). Näytettä otetaan aikuisilta 8-10 ml ja lapsilta painon mukaan 1-3 ml yhtä pulloa kohden. (Tykslab tutkimusohjekirja 2013.) Verimäärät arvioidaan pullon kyljessä olevan mitta-asteikon avulla. Endokardiittiepäilyssä näytteenottokertoja tarvitaan jopa kolme tai neljä, koska näissä tilanteissa mikrobeja on verenkierrossa yleensä vähän. Näytteet otetaan puolentunnin tai tunnin välein, jolloin tuloksesta saadaan mahdollisimman luotettava. (Tuokko ym. 2008, Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b.) Jos näytteenotto ei onnistu tavalliseen tapaan, näyte voidaan ottaa avomenetelmällä hepariinivakuumiputkeen tai heparinisoituun ruiskuun, jonka jälkeen se siirretään ruiskulla veriviljelypulloihin noudattaen hyvää aseptiikkaa (Tykslab tutkimusohjekirja 2013).

Noin 90 % bakteremialöydöksistä saadaan selville, jos veriviljelyjen näytemäärä on vähintään 40 ml (2x aerobipullo ja 2x anaerobipullo). Mikäli veriviljelynäytteitä otetaan saman päivän aikana enemmän kuin kaksi, prosenttiosuus nousee jo

yli 90 %. On kuitenkin todettu, että näytemäärän kasvattaminen yli 40 millilitraan ei vaikuta oleellisesti havaittujen bakteremioiden määrään, minkä vuoksi kaksi veriviljelynäytettä (2x 20 ml) on nykyinen käytäntö Suomessa. Tämä edellyttää kuitenkin, että jokaiseen veriviljelypulloon saadaan tarvittava määrä näytettä, jolloin suurin osa bakteremioista pystytään diagnosoimaan. Lasten kohdalla pienempikin verimäärä riittää, koska on todettu, että veren bakteeripitoisuus on kääntäen verrannollinen potilaan ikään. (Nissinen 2010.) Lee ym. (2007) tekemässä tutkimuksessa selvitettiin, kuinka monta veriviljelynäytettä pitää ottaa saman päivän aikana samasta potilaasta, jotta 100 % bakteremioista löydetään. He analysoivat yhteensä 181 positiivista veriviljelynäytettä, jotka kerättiin neljästä eri sairaalasta kahden vuoden aikana. He saivat tulokseksi, että 67,4 % bakteremioista löydettiin ensimmäisen veriviljelynäytteen pulloista ja 81,8 % kahden ensimmäisen veriviljelynäytteen pulloista. 95,6 % bakteremioista löydettiin, jos näytteenottokertoja oli kolme. Vastaavasti 100 % kyseisistä infektioista saatiin selville, kun näytteenottokertoja oli neljä.

Veriviljelynäytteet pyritään ottamaan aina ennen antibiootihoidon aloittamista. Mikäli näin ei voida toimia, näytteet voidaan ottaa myös antibiootihoidon aikana, koska veriviljelypullot sisältävät lääkkeitä inaktivoivia aineita. Antibiootit heikentävät kuitenkin tutkimustulosten luotettavuutta, mikä voi ilmetä mahdollisina väärinä negatiivisina veriviljelytuloksina. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b.) Veriviljelynäytteet pyritään ottamaan myös niissä tilanteissa, kun elimistön lämpötila on kohonnut, koska on tutkittu, että kuumeen aikana on paras aika ottaa veriviljelynäytteet (Han 2010).

Veriviljelynäytteenotossa ja veriviljelypullojen käsittelyssä tulee noudattaa erityisen hyvää aseptiikkaa, jotta välttyttäisiin vääriltä positiivisilta tuloksilta (Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b). Pienikin määrä iholta peräisin olevia kontaminanttibakteereita rikastuu veriviljelypullossa aiheuttaen väärän positiivisen tuloksen (Vuento & Lappalainen 2013). Väärät positiiviset tulokset heikentävät tulosten luotettavuutta ja häiritsevät näytteiden diagnosointia, jolloin oikeat mikrobikannat voivat jäädä kokonaan huomiotta (Hall & Lyman 2006). Näytteenotopaikkana toimivaa perifeeristä laskimoa pitää tunnustella ennen ihon desinfi-

ointia. Tämän jälkeen pistokohta puhdistetaan klooriheksidiinialkoholiin tai 70 % etanoliin kostutetulla steriilillä harsotaitoksella voimakkaasti pyyhkäisten. Puhdistuksen jälkeen ihoa ei saa kuivata, vaan desinfiointiaineen annetaan haihtua iholta itsekseen. Pistokohtaa ei saa myöskään koskea desinfiointin jälkeen. Vaikeissa näytteenottotilanteissa pistokohdan koskettaminen on välttämätöntä, jolloin näytteenottaja käyttää steriilejä hanskoja. Ennen näytteenottoa veriviljelypulloista poistetaan korkinsuojukset ja pullojen suut desinfioidaan huolellisesti kuten ihon pistokohta. Lopuksi näytteenottoneula yhdistetään puhtaaseen Vacutainer-ohjaimeen, jolloin vältetään mahdolliselta muista potilaista tulevista kontaminaatioista. Lisäksi näytteenoton yhteydessä pitää kiinnittää huomiota veriviljelypullojen pohjien puhtauteen, koska veriviljelyautomaatti tekee kaikki mittauksensa pullon pohjasta. (Heikkilä ym. 2005, Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b, Tykslab tutkimusohjekirja 2013.)

Näytteenoton jälkeen veriviljelypullojen kylkiin liimataan potilaan nimitarrat siten, etteivät ne peitä pullossa olevia viivakoodeja. Otetut näytteet toimitetaan mahdollisimman nopeasti huoneenlämpöisinä laboratorioon, jossa on veriviljelyautomaatti. Veriviljelypulloja inkuboidaan eli kasvatetaan automaatissa vähintään viiden vuorokauden ajan, jotta hitaastikin kasvavat mikrobikannat ehtisivät rikastua (Han 2010). Veriviljelyautomaatti mittaa bakteerikasvun aiheuttamaa hiilidioksidipitoisuuden nousua veriviljelypullossa kymmenen minuutin välein. Lisäksi automaatti hälyttää, jos näytteiden joukossa esiintyy positiivisia veriviljelypulloja. Positiivisista veriviljelypulloista tehdään tarvittavat jatkotutkimukset bakteerien identifioimiseksi sekä antibioottiherkkyyshmääritykset. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b.)

3 MALDI-TOF MS –MENETELMÄ

3.1 Yleistä MALDI-TOF MS –menetelmästä

MALDI-TOF MS –menetelmä on tärkeä osa mikrobiologian laboratoriota, kun halutaan mitata ja analysoida mikrobien proteiinien massaa lentoaikaspektrometrisesti. Kyseinen ionisointimenetelmä on kehitetty 1980-luvulla. MALDI-TOF MS on mahdollistanut mikrobien aiempaa nopeamman tunnistuksen. MALDI-TOF MS –menetelmällä voidaan tunnistaa mikrobeja myös muiden kuin proteiinien massan perusteella. Tällaisia ovat muun muassa mikro-organismien DNA, RNA, lipidit ja rasvahapot. Proteiinit soveltuvat kuitenkin parhaiten detektoitaviksi eli havainnoitaviksi MALDI-TOF MS –menetelmällä, koska niitä esiintyy solun kuivamassassa eniten, jopa noin 50 %. (Dare 2010, Welker & Moore 2010, Bruker Daltonik GmbH 2011.)

Brukerin MALDI-TOF MS –menetelmässä käytetään Microflex LT massaspektrometria, Flex control-, MALDI Biotyper RTC- ja MALDI Biotyper 3-ohjelmistoa. Flex control –ohjelmiston avulla säädetään massaspektrometrin asetuksia, tarkastellaan näytelevyn pisteitä ja seurataan analyysin kulkua ajon aikana. Maldi biotyper RTC –ohjelmistoa käytetään työlistojen laatimiseen, analyysin käynnistämiseen ja tulosten tarkasteluun. MALDI Biotyper 3 –ohjelmiston avulla voi tarkastella Brukerin tietokannan sisältöä ja tehdä hakuja tietokannasta sekä luoda omia spektrikirjastoja. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2013d.) Alla olevassa kuvassa (Kuva 1.) on Tykslabin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa käytössä oleva MALDI-TOF MS –analyysaattori.



Kuva 1. Brukerin MALDI-TOF MS –analysaattori (Korhonen & Tursas 2013)

3.2 MALDI-TOF MS –menetelmän periaate

Massaspektrometri kehitettiin alun perin tuomaan tietoa molekyylien rakenteista. Menetelmä perustuu molekyylien ionisoimiseen eli hajottamiseen, jossa näytelevyllä olevaa näytettä ”pommitetaan” pulssilaserilla syntyvän UV-valon tuottamilla fotoneilla. Ionisointiteknikoita on olemassa monia, mutta sähkösumutus eli ESI ja matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio eli MALDI ovat eniten käytettyjä menetelmiä. (Bruker Daltonik GmbH 2004, Dare 2010.)

MALDI-TOF MS –menetelmä sopii parhaiten kokonaisten bakteerisolujen analysointiin. Näytteenä käytetään agar-maljalla kasvavaa bakteeri- tai hiivapesäkettä. Testattava pesäke poimitaan viljelymaljalta puutikulla ja levitetään mahdollisimman ohuesti ja tasaisesti näytelevyllä olevaan näyteympyrään. Mikäli mikrobikanta kasvaa viljelymaljalla pienipesäkkeisenä, mikrobimassaa voi kerätä useammasta eri pesäkkeestä. Analysoitavan kannan tulisi kasvaa viljelymaljalla puhtaana ja agarin siirtymistä näyteympyrään mikrobimassan mukana pitää varoa. MALDI-TOF MS –menetelmässä analysoitava näyte lisätään useimmiten näytelevylle ilman erillisiä esikäsittelyjä. Jos suorasyötöllä ei saada

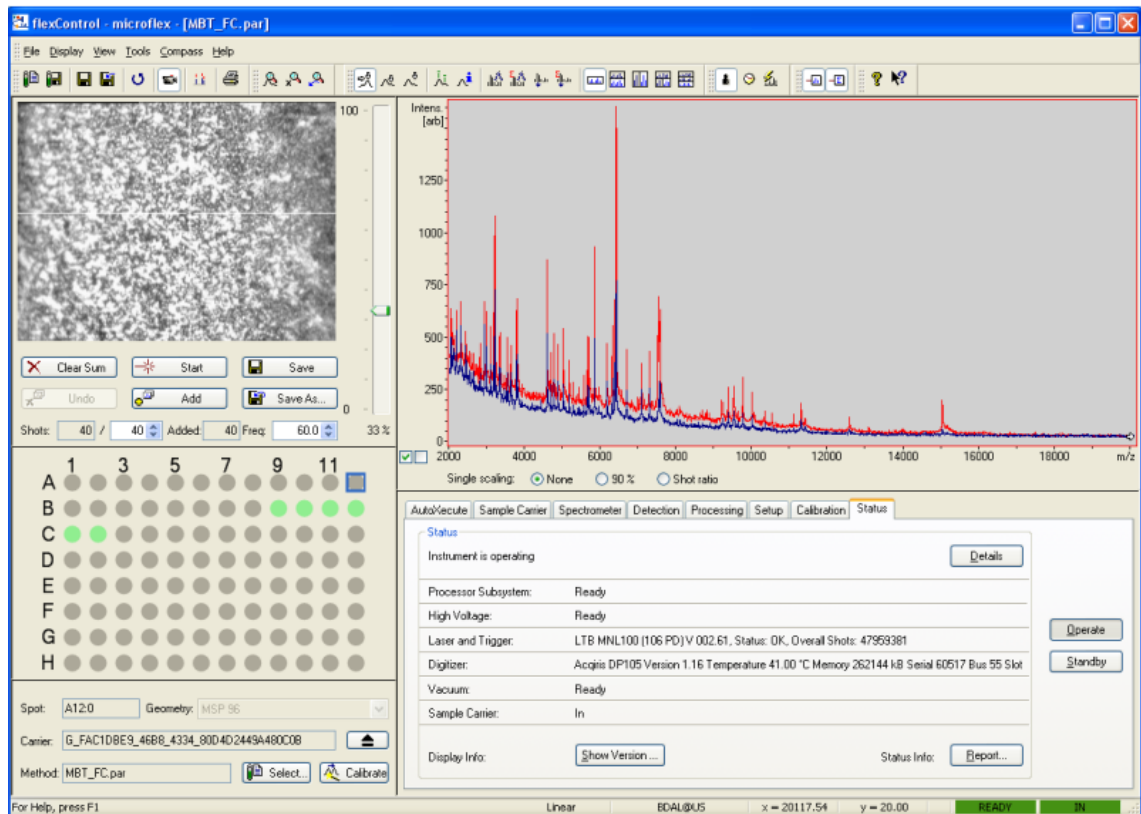
tuloksia, näyte esikäsitellään muurahaishappouuton tai trifluorietikkahappouuton avulla. (Bruker Daltonik GmbH 2011, Tykslab kliininen mikrobiologia 2013d.)

Näytteen ionisointi massaspektrometrillä on mahdollista, jos kuivuneen näytteen päälle lisätään orgaanista yhdistettä eli matriisia. Se on orgaanista liuotinta, joka sisältää muun muassa ultrapuhdasta vettä, asetonitriiliä ja trifluorietikkahappoa. Matriisiputkeen liuotetaan myös alfa-syano-4-hydroksikanelihappoa. Liuotettu matriisiputki sisältää näin ollen haihtuvia yhdisteitä, minkä vuoksi putken korkki on aina suljettava tiukasti käytön jälkeen. Liuotettua matriisia säilytetään huoneenlämmössä valolta suojattuna. Matriisin avulla solun seinämä hajoaa, jolloin solunsisäiset ribosomaaliset proteiinit vapautuvat analysoitavaksi. Ennen massaspektrometriin laittoa matriisin annetaan kuivua, jotta näyte kiteytyy näytealustalla. Kuivumisen jälkeen näytelevy syötetään koneeseen, jossa matriisi höyrystyy laserin vaikutuksen vuoksi vapauttaen mikrobin positiivisesti varautuneet proteiinit. Tämän jälkeen massaspektrometri kiihdyttää positiivisesti varautuneet proteiini-ionit elektrostaattisesti, jolloin ionit siirtyvät niin sanottuun lento-putkeen. Se, millä nopeudella proteiini-ionit siirtyvät, on verrannollinen proteiinin massaan. Ionien massa voidaan siis laskea mittaamalla aika kiihdytyksestä lentoalueelle saapumiseen. Mittauksen lopuksi massaspektrometri piirtää lentoajan avulla kyseiselle proteiinille massaspektrin. (Dare 2010, Welker & Morre 2010, Bruker Daltonik GmbH, 2011, Tykslab kliininen mikrobiologia 2013d.)

3.3 MALDI-TOF MS –menetelmällä saatujen tulosten analysointi

MALDI-TOF MS –menetelmässä MALDI Biotyper –ohjelmisto analysoi ja vertaa syntyneitä spektrejä tietokannassa oleviin tunnettuihin mikrobikantojen spektreihin. Jokaisella mikrobilajilla on omanlaisensa massaspektri, jota voidaan verrata monien muiden analysoitavien mikrobikantojen spektreihin. Vertailun perusteella ohjelmisto antaa kyseiselle mikrobikannalle nimen ja vastaavuuspisteet (score value). Suurin mahdollinen vastaavuuspistearvo on 3, ja mitä lähemmäs sitä päästään, sen luotettavampi tulos on. (Bruker Daltonik GmbH, 2011.) Tulosta voidaan pitää kuitenkin luotettavana, jos sen vastaavuuspisteet

ovat ≥ 2.000 . Tällöin pitää myös varmistaa, että mikrobipesäke on kasvanut viljelymaljalla puhtaana, ja että pesäkemorfologia ja muut ominaisuudet tukevat tulosta. Mikäli vastaavuuspisteet ovat ≥ 2.000 , tulos näkyy tietokoneella MALDI Biotyper RTC –ohjelmassa vihreänä näyteympyränä (Kuva 2.). Epävarmemmin tunnistettujen näytteiden vastaavuuspisteet ovat 1.700–1.999 välissä, jolloin näytelevyllä oleva näyteympyrä näkyy tietokoneella keltaisena. Näissä tilanteissa tuloksen luotettavuudesta keskustellaan sairaalamikrobiologin tai osaston lääkärin kanssa. Jos vastaavuuspisteet ovat < 1.700 , näytteille ei ole saatu riittävän luotettavaa tulosta. Tällöin näytelevyllä oleva näyteympyrä näkyy tietokoneella punaisena. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2013d.)



Kuva 2. MALDI Flex control –ohjelmassa näkyvä proteiinispektri ja vihreällä näkyvät analysoidut näyteympyrät (MALDI-TOF MS –analysaattorin Flex control –ohjelma 2013).

4 MUUT IDENTIFIKAATIOMENETELMÄT

4.1 Bakteeriviljely

Bakteeriviljely on tärkeä bakteerien ja sienien osoitusmenetelmä, joka mahdollistaa monipuoliset jatkotutkimukset bakteriologisten tautien diagnostiikassa. Infektiokykyisten patogeenien viljelyn edellytyksiä ovat oikeaoppinen näytteenotto, näytteen säilytys ja kuljetus. (Heikkilä ym. 2002.) Veriviljelyautomaattissa kasvatetuista positiivisista veriviljelypulloista tehdään bakteeriviljely kiinteää agaria eli elatusainetta sisältäville viljelymaljoille. Veriviljelynäytteenoton tapaan bakteeriviljelyssä tulee noudattaa huolellista aseptiikkaa. Ensin veriviljelypullojen suut puhdistetaan huolellisesti alkoholiin kostutetuilla puhdistuslapuilla. Alkoholin haihduttua veriviljelypulloa sekoitetaan ja verinäyte otetaan pullon suun kautta steriilillä neulalla ruiskuun. Aerobisesta veriviljelypullosta tiputetaan yhdet tipat näytettä aerobisille veri-, suklaa-, ja Chromo- eli värimaljalle. Vastaavasti anaerobisesta veriviljelypullosta tiputetaan yhdet tipat näytettä aerobisille veri- ja suklaamaljoille sekä yksi tippa anaerobiselle FAA-maljalle. Kaikista veriviljelypulloista tiputetaan näytepisara myös objektilasille gramvärjäystä varten. Lopuksi veripisarot hajotetaan viljelysauvalla kaikille kolmelle viljelymaljalle ja näyte levitetään ohuelti objektilasille. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b, Mikrobiologian harjoittelu 2013.)

Aerobisia viljelymaljoja kasvatetaan kaksi vuorokautta hiilidioksidilla (CO₂) rikastetussa +35–37 C°:ssa lämpökaapissa. Sitä vastoin hitaasti kasvavat anaerobiset bakteerit vaativat pidemmän inkubointiajan ja hapettomat olosuhteet, joten FAA-maljoja kasvatetaan samassa lämpökaapissa anaerobisessa pussissa 2-4 vuorokautta. Anaerobiseen pussiin luodaan indikaattorin ja kaasuttimen avulla hapeton kaasutila. Inkuboinnin aikana eri bakteerilajit muodostavat viljelymaljoille erilaisia bakteeripesäkkeitä, joiden perusteella ne voidaan tunnistaa. Aerobiset viljelymaljat tarkastetaan seuraavana päivänä ja anaerobiset viljelymaljat toisena ja neljäntenä päivänä viljelystä. Bakteerilajin alustavassa tunnistuksessa otetaan huomioon bakteerikasvun määrä, pesäkkeiden koko, muoto, haju,

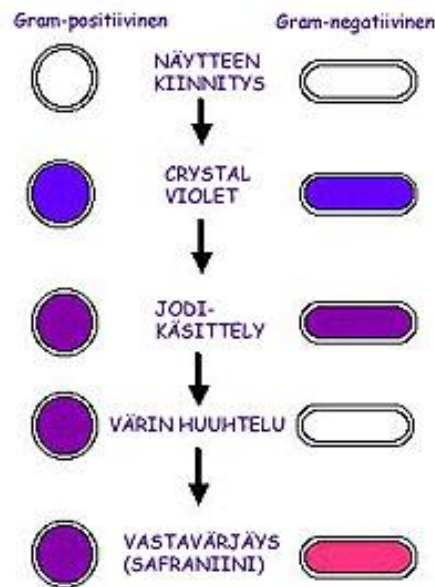
väri, ja hemolyysi eli punasolujen hajoaminen. Viljelymaljoilla kasvavia bakteeripesäkkeitä hyödynnetään monipuolisesti eri jatkotutkimuksissa, joita ovat gramvärjäys, bakteerien tunnistustestit ja antibioottiherkkyysmääritykset. (Katila 2004, Mikrobiologian harjoittelu 2013.)

Veriviljelynäytteiden bakteeriviljelystä tehtäviä jatkotutkimuksia on lukuisia, joten tässä työssä käsitellään ainoastaan opinnäytetyön kannalta olennaiset jatkotutkimukset. Muita veriviljelydiagnostiikassa käytettäviä jatkotutkimuksia ovat muun muassa katalaasi-, oksidaasi- ja E-testi. Katalaasitestin tarkoituksena on erottaa pääosin streptokokit ja enterokokit stafylokokkeista (Tykslab klininen mikrobiologia 2013a). Vastaavasti oksidaasitestillä erotetaan enterobakteerit (suolistobakteerit) muista gramnegatiivisista bakteereista, joihin luetaan *Pseudomonas*-, *Moraxella*-, *Hemofilus*- ja *Neisseria*-lajit. E-testillä eli MIC-määritysliuskalla voidaan määrittää pienin bakteerin kasvua estävä lääkepitoisuus (MIC-arvo, Minimum Inhibitory Concentration). Lääkeainetta nousevana pitoisuutena sisältävä E-testiliuska lisätään tutkittavaa bakteeria sisältävälle viljelymaljalle. Kyseisen liuskan ympärille muodostunut bakteeriestovyyhyke luetaan pienimmän bakteerinkasvua estävän lääkepitoisuuden kohdalta. (Katila 2004.)

4.2 Gramvärjäys

Gramvärjäys on yleisin ja tärkein bakteriologian pikadiagnostinen menetelmä, jolla voidaan jaotella bakteerit värjäytyvyytensä perusteella punaisiin gramnegatiivisiin ja sinisiin grampositiivisiin bakteereihin sekä morfologian perusteella sauvoihin ja kokkeihin. Bakteerien värjäytyvyyteen vaikuttavat grampositiivisten bakteerien paksu peptidoglykaanikerros ja gramnegatiivisten bakteerien rakenteeseen kuuluva ulkokalvo. Gramvärjäyksellä voidaan nähdä myös näytteessä olevien tulehdussolujen määrä, joka antaa viitteitä infektion luonteesta. Lisäksi kyseisellä värjäysmenetelmällä voidaan alustavasti päätellä infektion aiheuttaja ja valita potilaalle todennäköisesti sopivin mikrobilääkehoito. (Liimatainen 2000, Heikkilä ym. 2002.)

Gramvärjäyksessä näytelasia käsitellään ensin kristallivioletilla, jolloin kaikki näytteessä olevat bakteerit värjäytyvät sinivioleteiksi. Toisessa värjäysvaiheessa näyte käsitellään jodiliuoksella, joka sitoo kemiallisesti emäksisen värin bakteerin soluseinämään. (Katila 2004.) Väri huuhdellaan pois alkoholilla, jolloin kristallivioletti jää grampositiivisiin ja poistuu gramnegatiivisista bakteereista. Näyte käsitellään lopuksi kristallivioletin vastavärillä, safraniinilla, joka värjää gramnegatiiviset bakteerit punaiseksi. Loppuhuuhtelun ja kuivauksen jälkeen näytelasilla värjäytyneitä bakteereja tarkastellaan mikroskoopissa. Veriviljelynäytteiden yhden mikrobin löydökset ovat yleisiä, mutta veriviljelypulloissa voi kasvaa myös useampaa eri bakteerilajia. (Liimatainen 2000.) Alla olevassa kuvassa on esitetty gramvärjäyksen eri työvaiheet (Kuva 3.).



Kuva 3. Gramvärjäyksen työvaiheet (Solunetti 2006).

Negatiiviset gramvärjäystulokset tulee aina varmistaa akridiinivärjäyksellä mahdollisten väärien positiivisten verinäytteiden tarkistamiseksi. Esimerkiksi akuuttia leukemiaa sairastavan potilaan veren leukosyyttimäärä on hyvin suuri, mikä voi aiheuttaa veriviljelykaapissa virheellisen hälytyksen veren mahdollisesta bak-

teeriesiintymästä. Kyseisellä fluoresenssivärjäysmenetelmällä saadaan gramvärjäystä helpommin mikrobit näkymään näytteissä. Toisin sanoen gramvärjäyksessä heikosti värjäytyvät ja täysin värjäytymättömät bakteerit saadaan myös näkyville akridiinioranssivärillä, joka sitoutuu bakteerien nukleiinihappoihin. Tällöin värjäytyneet bakteerit voidaan havaita kirkkaan oransseina fluoresenssimikroskoopissa. Akridiinivärjäyksen ollessa myös negatiivinen veriviljelypullo laitetaan takaisin veriviljelykaappiin inkuboitumaan. Mikäli veriviljelynäytteessä ei todeta myöhemmin bakteerikasvua, näyte vastataan negatiiviseksi. (Heikkilä ym. 2002, Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b.)

4.3 Bakteerien tunnistustestit

Vitek-2 –analysaattori on mikrobiologinen tunnistusautomaatti, jolla saadaan suoraan bakteeritunnistus ja antibioottilherkkyydet tutkittavaa patogeenia sisältävältä bakteeriviljelymaljalta. Vitek-2 –analysaattorin bakteerien identifikaatio perustuu biokemiallisiin reaktioihin, jotka syntyvät tutkittavien bakteerien reagoitessa Vitek-2 –reagenssikorttien näytekolioissa olevien substraattien kanssa. Tutkittavaa bakteerisuspensiota lisätään kyseisiin testikorttipaikkoihin ja näytettä sisältäviä testikortteja inkuboidaan Vitek-2 –analysaattorissa. Inkuboinnin jälkeen reagenssikorteissa tapahtuu värimuutoksia, jotka voivat johtua muun muassa happamuuden muutoksista, entsyymien hydrolyysistä tai bakteerin kasvusta inhibiittorin läsnä ollessa. Analysaattori mittaa näytekammioiden tapahtuneet reaktiot, vertaa mittatuloksia valmistajan tietokantaan ja antaa todennäköisen nimen patogeenille. (Pincus 2007.)

Optokiinitestiä käytetään alfa-hemolyttisen *Streptococcus pneumoniae* eli pneumokokin alustavassa tunnistuksessa. Optokiinitestillä voidaan erottaa pneumokokki muista alfa-hemolyttisistä streptokokeista. Epäilystä pneumokokkipesäkkeestä tehdään verimaljalle tiheä ristihajotus, jonka päälle lisätään pneumokokin kasvua estävä optokiinikiekko. Inkuboinnin jälkeen kiekon ympärillä olevaa bakteerikasvua tarkastellaan silmämääräisesti. Iso estovyöhyke (≥ 18 mm) viittaa optokiiniherkkään pneumokokkiin, kun taas kiekkoon kiinni kas-

vaneet (< 16 mm) bakteeripesäkkeet ovat merkki optokiiniresistentistä bakteerista, kuten muista alfahemolyttisistä streptokokeista. Mikäli maljalla on pieni estovyöhyke (16 mm–18 mm), tulee mahdollinen pneumokokkilöydös varmistaa muilla testeillä. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2000, Peltoniemi & Lepistö 2010.)

Sappieskuliini- ja arabinoositestejä käytetään *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium* –enterokokkilajien tunnistuksessa. Sappieskuliinitesti kertoo enterokokille ominaisesta kyvystä sietää sappieskuliinimaljan (SA) korkeaa sappipitoisuutta ja eskuliinin pilkkomiskykyä. Arabinoosimaljan (ARA) värireaktiolla taas voidaan erottaa enterokokkilajit toisistaan. Muutamaa tutkittavaa bakteeripesäkettä viljellään viivaksi molemmille viljelymaljoille, joita kasvatetaan aerobisesti + 35–37 °C:ssa lämpökaapissa yön yli. Inkuboinnin jälkeen maljoja tarkastellaan silmämääräisesti. Sappieskuliiniposiitivinen (sappea sietävä/eskuliinia pilkkova, +/+) eli mustapigmenttinen värimuutos viittaa enterokokiin ja sappieskuliininegatiivinen (sappea sietävä/ eskuliiniin tehoton, +/-) eli väritön muutos johonkin D-ryhmään kuuluvaan Viridans-ryhmän streptokokiin, kuten *Streptococcus sanguinis*-lajiin. Lisäksi arabinoosimaljan positiivinen eli keltainen värimuutos viittaa suoraan *E. faecium*-lajiin ja negatiivinen eli väritön muutos *E. faecalis*-lajiin. (Kirkko- Jaakkola 2010, Peltoniemi & Lepistö 2010, Mikrobiologian syventävä harjoittelu 2013.)

Streptokokkiagglutinaatiolla saadaan alustava tunnistus grampositiivisille A-, B-, C-, F-, ja G –streptokokkiryhmillä sekä D-ryhmälle, johon kuuluvat enterokokit ja Viridans-ryhmän streptokokit. Kyseisessä agglutinaatiotestissä käytetään kaupalliseen kittiin kuuluvia latex-reagensseja, jotka irrottavat bakteerien pinta-antigeeneja (A-, B-, C-, D-, F-, ja G –antigeeneja) happo- tai entsyymikäsittelyllä. Samalla reagenssiliuosten sisältävät spesifiset vasta-aineet reagoivat bakteerista vapautuvien pinta-antigeenien kanssa. Ensin 0,4 millilitraa huoneenlämpöistä Streptococcal-Extraction –entsyymiä sisältävään koeputkeen lisätään silmukalla muutama pesäke tutkittavaa bakteeria ja inkuboidaan liuosta vähintään kymmenen minuuttia + 35 °C:ssa lämpökaapissa. Testikortin näyteympyrään tiputetaan ryhmäkohtaista latex-reagenssia, lisätään pasteur-pipetillä jouk-

koon tippa inkuboitua näyte-ekstraktia ja sekoitetaan liuos puutikulla noin 30 sekunnin ajan. Testitulos on positiivinen, kun testikortille syntyy selvä, taustaltaan kirkas agglutinaatio eli sakka. Tällöin kyseisen näytteen sisältämä bakteerikanta kuuluu agglutinaatiotestissä testattuun bakteeriryhmään. Mikäli agglutinaatiota ei tapahdu, kyseessä on jokin muu bakteeri kuin streptokokki tai enterokokki. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2009b.)

Koagulaasipikatestin eli stafylokokkiagglutinaation (Pastorex Staph-Plus) tarkoituksena on erottaa *Staphylococcus aureus* muista stafylokokkeista tunnistamalla sen pintarakenteet testilatin avulla. Kyseinen testilatin-reagenssi sisältää *Staphylococcus aureukselle* spesifisiä latexpartikkeleita, jotka on päällystetty fibrinogeenilla, immunoglobuliini G:llä (IgG) ja monoklonaalisilla vasta-aineilla. Reagenssiksi sisältää myös kontrollireagenssin, jolla tarkistetaan agglutinaatiotestin toimivuus testin suorituksen yhteydessä. Ensin huoneenlämpöisistä reagenssipulloista tiputetaan yhden tipat testilatinia ja kontrollilatinia testikortin näyteympyröihin, näihin lisätään silmukalla viljelymaljalta muutama tutkittava bakteeripesäke ja sekoitetaan huolellisesti noin 30 sekunnin ajan. Mikäli testilatinissa tapahtuu agglutinaatio ja kontrollilatinissa ei mitään, testitulos on positiivinen *Staphylococcus aureuksen* suhteen. Negatiivisessa tuloksessa ei synny ollenkaan agglutinaatiota, jolloin liuksen tausta jää sameaksi. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2009a.)

4.4 Antibioottiherkkyysmääritykset

Antibioottien tarkoituksena on tappaa patogeeni tai estää sen kasvua. Antibioottiherkkyys eli antibioottien teho eri mikrobeihin voi kuitenkin vaihdella. Esimerkiksi luontaisen resistenssin omaavat mikrobilajit ovat vastustuskykyisiä tietyille antibiooteille. Hankitun resistenssin omaavat mikrobilajit ovat taas muuten herkkiä tietyille antibiooteille, mutta niillä on myös kyseisiä lääkkeitä vastaan vastustuskykyä kehittäviä mikrobikantoja. Mikrobien antibioottiherkkyksiä tutkitaan laboratorioissa rutiinikäytössä olevalla antibioottikiikkomenetelmällä. Kyseisellä menetelmällä määritetään lääkeaineen tietyn pitoisuuden estovaikutus tutkitta-

vaan patogeeniin (Katila 2004). Herkkyysmaljat ja antibioottikiekot valitaan gramvärjäys- ja bakteeriviljelytulosten perusteella. (Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b, Terveyden ja hyvinvoinninlaitos 2013.)

Viljelymaljojen kasvatuksen jälkeen antibioottikiekkojen ympärille muodostuneet estorengaat mitataan, jotta saadaan selville tutkittavan bakteerin lääkeherkkyys. Tutkittava bakteerikanta on sitä herkempi lääkeaineelle mitä suurempi maljan estorengas on. Kyseiset bakteeriherkkyysluokat ovat S (susceptible) eli herkkä, I (intermediate) eli epävarma herkkyys ja R (resistant) eli lääkeaineelle resistentti. (Katila 2004, Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b.)

5 VERIVILJELYISTÄ TUNNISTETTAVAT PATOGEENIT

5.1 Yleistä veriviljelypatogeeneista

Positiivisista veriviljelynäytteistä voi löytyä sekä aerobi- että joitakin anaerobi-bakteereja ja hiivaa. Veriviljelynäytteestä löytyviä aerobisia bakteereja ovat enterokokit, beeta- tai alfahemolyttiset streptokokit, stafylokokit, enterobakteerit ja muut gramnegatiiviset sauvat. Esimerkiksi enterobakteereihin kuuluva *E. coli* on yleinen veriviljelylöydös keski-ikäisillä ja vanhuksilla. *E. coli* lisäksi nuorilla ja aikuisilla tyypillisiin veriviljelylöydöksiin kuuluvat myös stafylokokkilajit *Staphylococcus epidermidis* ja *Staphylococcus aureus*. Sitä vastoin pienillä lapsilla ja teini-ikäisillä ei yleensä löydy veriviljelyistä selkeästi mitään tiettyä bakteerilajia, mutta tällaisia voivat olla muun muassa *Staphylococcus aureus* ja alfahemolyttisiin streptokokkeihin kuuluva *Streptococcus pneumoniae* eli pneumokokki. Vastasyntyneiden veriviljelylöydöksistä kuitenkin tyypillisimpiä ovat esimerkiksi *Staphylococcus epidermidis* ja *Streptococcus agalactiae*. Veriviljelypulloissa voi esiintyä myös vääriä positiivisia löydöksiä, mikä johtuu näytteenottolanteessa syntyvästä kontaminaatiosta. (Tykslab 2011, 2012.) Ihmisen iholla elävät mikrobilajit, kuten jotkut alfahemolyttiset streptokokit ja koagulaasinegatiiviset stafylokokit ovat yleisimpiä kontaminanttibakteereja (Han 2010). Veriviljelynäytteiden laajasta bakteerikirjosta huolimatta tässä työssä on käsitelty ainoastaan opinnäytetyön kannalta olennaiset patogeeniset bakteerit.

5.2 Streptokokit

Streptococcus agalactiae on grampositiivinen ketjukokki, joka kuuluu emättimen ja alemman suoliston normaaliflooraan. Tämä B-ryhmään kuuluva beetahemolyttinen streptokokki on merkittävä vastasyntyneiden infektioiden aiheuttaja. Bakteerin tärkeänä virulenssitekijänä toimii ryhmäspesifinen polysakkaridikapseli. *Streptococcus agalactiae* tarttuu synnytyksen yhteydessä äidin synnytyskanavasta vastasyntyneeseen ja voi näin ollen aiheuttaa vakavan yleisinfektion.

Tällaisia streptokokin aiheuttamia yleisinfektioita voivat olla myös muun muassa meningiitti, sepsis ja keuhkokuume. *Streptococcus agalactiae*n aiheuttamalle infektiolla altistavia tekijöitä ovat ennenaikainen lapsivedenvuoto, keskosuus ja äidin runsas B-streptokokkikanta emättimessä. Edellä mainittujen lisäksi kyseinen bakteeri voi aiheuttaa aikuisilla muitakin infektioita, kuten virtsatieinfektioita, niveltulehduksia sekä iho- ja pehmytkudoksen infektioita. Aikuisilla riskitekijöitä ovat erilaiset perussairaudet, kuten diabetes, syöpä, maksasairaudet ja HIV-infektio. Bakteerin oireeton kantajuus on myös yleistä. Värimaljalla (Chromo) bakteeri kasvaa pieninä vaaleansinisinä pesäkkeinä. *Streptococcus agalactiae*n infektioiden hoidossa käytetään penisilliinejä ja kefalosporiineita. (Heikkilä ym. 2002, Saxen & Vuopio-Varkila 2010.) Lisäksi vastasyntyneiden infektoitumista voidaan ehkäistä antamalla riskisynnyttäjiille penisilliiniprofylaksi eli ennaltaehkäisevä penisilliinihoito (Terveyskirjasto 2013).

Streptococcus pyogenes on grampositiivinen ketjukokki, joka on yleinen lasten ja aikuisten tonsilliitin eli nielurisatulehduksen aiheuttaja. Kyseinen bakteeri voi aiheuttaa myös iho- ja pehmytkudoksen infektioita, kuten selluliittia, märkärupsea ja ruusua sekä harvemmin vakavia yleisinfektioita, kuten sepsistä ja pneumoni-aa eli keuhkokuumetta. Kyseinen streptokokki tarttuu tyypillisesti kosketus- ja pisaratartuntana ja sen tärkeimpiä virulenssitekijöitä ovat kapselinalaiset M-proteiinit sekä eksoentsyymien ja -toksiinien tuotanto. Suomessa *Streptococcus pyogenes*-lajin osuus veriviljelylöydöksistä on kuitenkin vain 1–2 %. A-ryhmään kuuluva *Streptococcus pyogenes* muodostaa bakteeriviljelyssä verimaljalle beetahemolyyttisiä eli kirkkaita, punasoluja hajottavia bakteeripesäke-alueita. Kyseisen streptokokin aiheuttamia infektioita hoidetaan pääsääntöisesti penisilliinillä. Penisilliinille allergisille vaihtoehtoisena antibioottina käytetään erytromysiiniä. Lisäksi streptokokkiepidemioiden leviämisen tärkeimpiä ehkäisykeinoja ovat taudin aikainen toteaminen ja varhainen antibioottihoidon aloitus. (Vuopio-Varkila, Syrjänen & Kotilainen 2010, Peltoniemi & Lepistö 2010.)

Grampositiivinen diplokokki tai lyhyenä kokkiketjuna esiintyvä *Streptococcus pneumoniae* eli pneumokokki on tyypillinen hengitystieinfektioiden, kuten keuhkokuumeen ja poskiontelotulehduksen sekä lasten äkillisen välikorvatulehduk-

sen aiheuttaja. Solun ulkoisena patogeenina toimiva pneumokokki tarttuu pisaratartuntana yleensä hengitysteiden normaalifloorasta. Pneumokokin virulenssitekijöitä ovat fagosytoosilta suojaava polysakkaridikapseli ja toksiinin erityys. Kyseinen bakteeri on aikuisilla neljänneksi ja lapsilla kolmanneksi yleisin veriviljelyistä löytyvä patogeeni. Pneumokokin ilmaantuvuus on suurin pienillä, epäkypsän immuunijärjestelmän omaavilla lapsilla ja perussairauksia sairastavilla vanhuksilla. Immuunipuutteiset ja HIV-potilaat kuuluvat myös riskiryhmään, joille voi kehittyä pneumokokin aiheuttama bakteremia. Pneumokokki onkin toiseksi yleisin sairaalan ulkopuolisten bakteremioiden aiheuttaja. Lisäksi se voi myös aiheuttaa vakavia invasiivisia infektioita, kuten sepsistä ja meningiittiä. (Heikkilä ym. 2002, Kauma & Virolainen-Julkunen 2010.)

Bakteeriviljelyssä kasvuolosuhteiltaan vaativa pneumokokki kasvaa viljelymaljalla säännöllisen pyöreinä alfahemolyyttisinä eli vihertävinä bakteeripesäkkeinä, joiden keskellä on laakea syvennys ja reunoilla matalat vallit. Pneumokokki-infektioiden hoidossa käytetään ensisijaisesti beetalaktaamiantibiootteihin kuuluvaa penisilliiniä. Hoitovasteen ollessa huono pneumokokki-infektioihin tehoaa myös muutamaa muu antibiootti, kuten keftriaksoni, vankomysiini tai fluorkinoloni. Ehkäisyvaihtoehtona voidaan käyttää pneumokokkrokotetta. (Heikkilä ym. 2002, Kauma & Virolainen-Julkunen 2010.)

5.3 Stafylokokit

Staphylococcus aureus on pareina tai pieninä rykelminä esiintyvä grampositiivinen kokki (Vuopila-Varkila 2010). Se aiheuttaa useimmiten iho- ja pehmytkudosinfektioita tuottamalla ja levittämällä erilaisia toksisia aineita elimistössä, esimerkiksi enterotoksiinia. *Staphylococcus aureus* voi aiheuttaa myös muun muassa märkärüpeä, ruusua, paisetautia eli furunkoloosia ja haavainfektioita. (Levinson 1994.) Kyseinen bakteeri tarttuu kosketus- tai aerosolitartuntana ihmisestä toiseen tai potilaan oman flooran kautta muualle ihoon tai limakalvoille. *Stafylococcus aureusta* esiintyy ajoittain noin 80 % ihmisten nenässä tai nenänielussa, joskus myös iholla. 20–40 % ihmisistä on kyseisen bakteerin oireet-

tomia kantajia. Heikentynyt vastustuskyky, esimerkiksi diabeteksen, munuaisten vajaatoiminnan tai sidekudossairauksien yhteydessä altistaa infektion synnylle. Infektiot voivat olla paikallisia tai ne voivat levitä muualle elimistöön vakaviksi yleisinfektioiksi. *Staphylococcus aureus* kasvaa hyvin tavallisilla elatusainemaljoilla. Kyseinen koagulaasipositiivinen stafylokokki kasvaa värimaljalla (Chromo) keltaisina pesäkkeinä. *Staphylococcus aureuksen* resistenttisuuden vuoksi infektioiden hoidossa käytetään tavallisten penisilliinien sijasta stafylokokkipenisilliinejä, joihin kuuluu muun muassa kloksasilliini, erytromysiini ja klindamysiini. (Heikkilä ym. 2005, Vuopi-Varkila 2010.)

Koagulaasinegatiiviset stafylokokit ovat grampositiivisia kokkeja, joista suurin osa on opportunistibakteereita. Kyseisten bakteerien taudinaiheuttamiskyky on vähäinen ja ne tarvitsevat lähes aina jonkin altistavan tekijän kliinisen infektion syntyyn. Tällaisia ovat esimerkiksi ihon tai limakalvon vaurio tai vastustuskyvyn heikkeneminen. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit aiheuttavat useimmiten vierasesineinfektioita. Kyseiset stafylokokit kiinnittyvät vierasesineen pintaan suojatakseen itseään antibiootin ja elimistön puolustusmekanismin vaikutukselta, jolloin infektio on vaikea hoitaa elimistöstä. (Heikkilä 2005, Lyytikäinen ym. 2010.)

Koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja tunnetaan ihmisen normaalifloorassa noin 15 lajia, mutta tärkein niistä on *Staphylococcus epidermidis*. Kyseistä stafylokokkilajia esiintyy erityisesti nenän limakalvoilla, kainalon seuduilla, nivustaipeissa, perianaaliseudussa ja varpaiden välissä. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit kasvavat verimaljalla pieninä valkoisina pesäkkeinä. Ne ovat myös katalaasipositiivisia mikrobilajeja. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit ovat tavallisimpia veriviljelykontaminantteja, koska niitä esiintyy erityisen paljon ihmisen iholla. Lisäksi ne ovat erittäin resistenttejä stafylokokkipenisilliineille ja useille muille lääkkeille. Tämän vuoksi vankomysiini on ainut tehokas lääke, jota voidaan käyttää vakavien infektioiden hoidossa. (Heikkilä 2005, Lyytikäinen ym. 2010.)

5.4 Enterokokit

Enterokokit ovat ketjumaisia grampositiivisia kokkeja. Kyseiset bakteerit tyypillisiä aerobisia suolistobakteereja, joita esiintyy monien kliinisten infektioiden yhteydessä. Enterokokeista tunnetuimpia ovat *Enterococcus faecalis*- ja *Enterococcus faecium* -lajit, jotka kattavat yli 95 % kliinisten laboratoriotutkimusten enterokokkilöydöksistä. Suoliston lisäksi enterokokkeja tavataan ympäristössä, kuten vedessä, maaperässä ja elintarvikkeissa. Enterokokkien rakenteessa toimii pinta-antigeenina D-antigeeni, joka määrittää kyseiset bakteerit streptokokkiryhmistä erottuvaan D-ryhmään. Opportunistiset taudinaiheuttamiskyvyltään heikot enterokokit voivat aiheuttaa infektion vain vastustuskyvyltään heikentyneillä henkilöillä. Tartunta saadaan joko potilaan omasta mikrobifloorasta tai muualta sairaalasta. Enterokokit aiheuttavat tavallisimmin virtsatieinfektioita, mutta ne voivat myös olla osana selluliitista sekä lantion tai vatsan alueen syvistä infektiosta löytyvää sekaflooraa. Kyseisillä bakteereilla ei ole varsinaisia vakaviin infektioiden johtavia virulenssitekijöitä, mutta enterokokit voivat joskus aiheuttaa esimerkiksi sepsistä tai endokardiittia eli sydänlihastulehdusta. Heikosta taudinaiheuttamiskyvyltään huolimatta enterokokeilla on myös vankomysiinille resistenttejä enterokokkikantoja (VRE), jotka aiheuttavat sairaalainfektioita. (Heikkilä ym. 2002, Rantakokko-Jalava & Anttila 2010.)

Enterokokki-infektioille altistavia tekijöitä ovat vakavat perustaudit, kuten munuaisen vajaatoiminta ja syöpä, antibioottihoito, virtsakatetrin käyttö ja kirurgiset toimenpiteet. Enterokokit näkyvät värimaljalla (Chromo) pyöreinä sinivihreinä pesäkkeinä (Peltoniemi & Lepistö 2010). Enterokokki-infektioiden hoidossa käytetään esimerkiksi ampisilliinia ja karbabeemeja sekä toissijaisesti vankomysiiniä. Lääkehoidon mahdollisuudet ovat kuitenkin VRE-kantoihin erittäin rajalliset, joten infektion ehkäisyyn tulee kiinnittää erityistä huomiota. VRE-kantojen leviämisen ehkäisykeinoja ovat VRE-positiivisten henkilöiden eristys, huolellinen käsihygienia ja kantajuuden seulonnat. (Heikkilä ym. 2002, Rantakokko-Jalava & Anttila 2010.)

5.5 Enterobakteerit

Klebsiella-lajit ovat liikkumattomia gramnegatiivisia sauvoja. Ne pystyvät muodostamaan erittäin hyvin bakteerin suojausmekanismina toimivia polysakkaridikapseleita. *Klebsiella*-lajeja tunnetaan nykyisin jo yli 70. Tunnetuimmat *Klebsiella*-lajit ovat *Klebsiella pneumoniae* ja *Klebsiella oxytoca*. Kyseiset bakteerilajit aiheuttavat yleensä virtsatieinfektioita erityisesti huonokuntoisilla vanhuksilla ja katetripotilailla. Lisäksi ne voivat aiheuttaa haavainfektioita ja vatsan alueen infektioita. *Klebsiella pneumoniae* voi aiheuttaa vielä edellä mainittujen lisäksi lohkokeuhkokuumetta, jolle altistavia tekijöitä ovat muun muassa diabetes ja alkoholismi. (Tissari & Anttila 2010.) *Klebsiella*-lajit kasvavat värimaljalla (Chromo) isoina tummansinivihreinä limaisina pesäkkeinä. (Meurman 2011). *Klebsiella*-lajien hoidossa käytetään amoksisilliiniä ja klavulaanihapon yhdistelmää sekä toisen ja kolmannen polven kefalosporiineita ja aminoglykosideja. (Tissari & Anttila 2010.)

Escherichia coli on gramnegatiivinen sauva, joka on yleisin aikuisen ihmisen suolistossa esiintyvä bakteerilaji (Heikkilä 2006). Se aiheuttaa noin 90 % kaikista virtsatieinfektioista, jotka ovat useimmiten peräisin ihmisen omasta suoliston ja väliliha-alueen floorasta (Siitonen & Vaara 2010). *E. coli*lla on monia erilaisia virulenssitekijöitä, mutta tunnetuimpia näistä ovat kuitenkin P-fimbriat, joiden avulla ne tarttuvat virtsateiden epiteelisoluihin aiheuttaen virtsatieinfektion (Heikkilä ym. 2005). Virtsatieinfektioiden lisäksi *E. coli* pystyy aiheuttamaan muita infektioita kuten erilaisia sekainfektioita, kirurgisia infektioita ja sepsistä. Infektio syntyy, jos kyseinen bakteeri pääsee limakalvojen vastustuskyvyn heikennettyä tai vamman kautta parenteraalitalaan. Bakteeriviljelyssä *E. coli* viljely on useimmiten helppoa, koska esimerkiksi sepsiksen ja virtsatieinfektion diagnostiikassa viljelytulos on yleensä yksiselitteinen. Joidenkin tapausten, kuten vastasyntyneiden kohdalla *E. coli* –sepsiksessä tarkempi serotyypitys on tarpeen. (Siitonen & Vaara 2010.) Värimaljalla (Chromo) *E. coli* kasvaa vaaleanpunaisina isoina tai keskikokoisina pesäkkeinä (Meurman 2011). Infektioiden hoidossa käytetään gramnegatiivisiin bakteereihin tehoavia lääkkeitä (Heikkilä ym. 2005).

Serratia-lajit ovat gramnegatiivisia sauvoja (Kirkko-Jaakkola 2010). Tunnetuin *Serratia*-laji on *Serratia marcescens*, joka kolonisoi sairaalapotilaiden hengitys- ja virtsateitä. Tämän vuoksi se kykenee aiheuttamaan jopa sairaalaepidemioita. (Tissari & Anttila 2010.) *Serratia*-lajit kasvavat värimaljalla (Chromo) keskikokoisina tummansinivihreinä pesäkkeinä (Tykslab kliininen mikrobiologia 2012c). *Serratia*-lajit ovat useimmiten resistenttejä ampisilliinille, kefalosporiinille ja ampisilliinin ja klavulaanihapon yhdistelmälle. (Tissari & Anttila 2010.)

Citrobacter-lajit ovat gramnegatiivisia sauvoja joita esiintyy opportunisteina sairaala- ja immuunipuutteisten potilaiden virtsatie- ja hengitystieinfektioissa. Yhden *Citrobacter*-lajin, *Citrobacter diversus* on todettu aiheuttavan myös vastasyntyneiden meningiittiä. (Kirkko-Jaakkola 2010, Tissari & Anttila 2010.) *Citrobacter*-lajit kasvavat värimaljalla (Chromo) pääosin sinivihreinä pesäkkeinä, mutta joidenkin bakteerilajien kohdalla sinivihreän pesäkkeen ympärille voi kehittyä vielä vaaleanpunainen kehä (Meurman 2011). *Citrobacter*-lajit ovat hyvin resistenttejä bakteerikantoja, minkä vuoksi hoitojen tulisi perustua herkkyysmäärityksiin (Tissari & Anttila 2010).

6 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Lagae-Wiens ym. (2012) tekemän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, helppottaako veriviljelynäytteiden esikäsittely kaupallisella kitillä (MALDI Sepsityper Kit) MALDI-TOF MS –laitteella analysoitujen veriviljelynäytteiden bakteeritunnistusta. Tutkimustuloksia verrattiin rutiinitutkimuksilla saatuihin identifikaatiotuloksiin. Tutkimuksessa analysoitiin 63 (=n) veriviljelypulloa, joista 61 sisälsi yhtä bakteerilajia ja kaksi useampaa bakteerilajia. 42 (68,8 %) bakteeri-isolaatista saatiin erittäin luotettava proteiinispektri (score value >2.0), 10 (16,4 %) hyvä proteiinispektri (score value > 1,7) ja 9 (14,8 %) epävarma bakteeritunnistus tai ei lainkaan identifikaatiotulosta. Esimerkiksi kahta bakteerilajia sisältävästä veriviljelypullosta saatiin vain toiselle patogeenille nimi, kun taas rutiinitutkimuksilla saatiin tunnistettua molemmat bakteerilajit. Lisäksi kaikista positiivisista veriviljelypulloista saatiin analysoidua gramnegatiiviset bakteerit luotettavammin kuin grampositiiviset bakteerit. Tutkijat totesivat, että Sepsityper Kitin ja MALDI-TOF MS –identifikaatiomenetelmällä saatiin tarpeeksi luotettavia tuloksia, vaikka kaikkia bakteerilajeja ei saatu tunnistettua. Lisäksi kyseisellä menetelmällä saatiin huomattavasti nopeammin veriviljelytulokset (6,6 h) kuin rutiinitutkimuksilla (40,9 h). Sepsityper Kitin ja MALDI-TOF MS –menetelmän käyttö mahdollistaisi potilaan antibioottihoidon aloittamisen varhain. MALDI Sepsityper Kitin rutiinikäyttöön ottaminen kuitenkin nostaisi kliinisiä laboratoriokustannuksia.

Prod`hom ym. (2010) tekemän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka hyvin MALDI-TOF –massaspektrometri tunnistaa positiivisissa veriviljelypulloissa olevat mikrobilajit esikäsiteltyjen pellettien avulla. Tutkimustuloksia verrattiin rutiinitutkimuksilla saatuihin identifikaatiotuloksiin. Tutkimuksessa analysointiin 126 (=n) positiivista veriviljelypulloa, jotka oli kerätty 78 potilaasta. Näistä positiivisista veriviljelypulloista neljä sisälsi useampaa kuin yhtä mikrobilajia, jonka vuoksi niitä ei otettu tutkimukseen mukaan. Jäljelle jääneistä 122 positiivisesta veriviljelypullosta MALDI-TOF –massaspektrometri tunnistoi 96 (78,7 %) bakteeri-isolaattia. Näistä 69 (56,6 %) piirtyi erittäin luotettavana spektrinä ja 27 (22,1 %) hyvänä spektrinä. Tunnistetuista 96:sta bakteeri-isolaatista 95 (98,95 %) oli

tunnistettu oikein lajitasolla ja yksi geenitasolla. 26 (21,3 %) tunnistamatonta bakteeri-isolaattia sai epävarman bakteeritunnistuksen tai ei lainkaan identifikaatiotulosta. Ne olivat suurimmaksi osaksi grampositiivisia bakteerikantoja, kuten streptokokkeja tai koagulaasinegatiivisia stafylokokkeja. Tutkijat totesivat, että MALDI-TOF MS –identifikaatiomenetelmä on tarkka ja nopea, vaikka kaikkia bakteerilajeja ei saatu tunnistettua. Tulokset olivat suurimmaksi osaksi yhteneviä, kun verrattiin MALDI-TOF MS –menetelmää muihin bakteeridentifikaatioissa käytettäviin rutiinitutkimuksiin.

Buchan ym. (2011) tekemässä tutkimuksessa vertailtiin MALDI-TOF MS–menetelmää ja muita tutkimuksia positiivisten veriviljelyjen bakteerin tunnistuksessa. MALDI-TOF:lla analysoitiin 164 (=n) positiivista veriviljelynäytettä, joista 14 (9 %) näytettä sisälsi enemmän kuin yhtä mikrobilajia. 150:stä (85,5 %) yhtä mikrobilajia sisältävistä positiivisista veriviljelypulloista 100 (67 %) sisälsi grampositiivisia bakteereja, 45 (30 %) gramnegatiivisia bakteereja ja 5 (3 %) hii-vaa. 124 (85,5 %) bakteeri-isolaattia tunnistettiin suoraan yhtä bakteerilajia sisältävistä veriviljelynäytteistä, joista 94 (64,8 %) sai erittäin luotettavan tuloksen (score value ≥ 2.000). MALDI-TOF:lla saatiin tunnistettua paremmin gramnegatiiviset sauvat (97,6 %) kuin grampositiiviset kokit (80,0 %). Rutiinitutkimuksilla tulokset olivat samankaltaiset. Lisäksi todettiin, että MALDI-TOF:lla saatiin suoritettua grampositiivisten isolaattien tunnistus 23–83 tuntia ja gramnegatiivisten isolaattien tunnistus 34–51 tuntia nopeammin kuin rutiinitutkimuksilla.

7 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSONGELMAT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on testata MALDI Sepsityper Kitin soveltuvuutta mikrobien nopeaan tunnistukseen positiivisista veriviljelypulloista. Toisin sanoen, kuinka suurelle osalle positiivisista veriviljelynäytteistä saadaan luotettava mikrobilajin tunnistustulos käyttämällä MALDI-TOF MS –analysointorin mikrobien identifikaatiossa MALDI Sepsityper Kittä.

Tavoitteena on, että mikrobien nopea tunnistus positiivisista veriviljelynäytteistä mahdollistaa potilaalle annettavan antibiootihoidon tarkemman kohdentamisen tunnistettuun taudinaiheuttajaan. Joissain tapauksissa taudinaiheuttajan nopea tunnistus voi auttaa myös infektiokokon paikallistamisessa.

Opinnäytetyön pääongelma on

- Kuinka luotettavasti positiivisesta veriviljelypullosta saadaan uutettua Sepsityper Kitin avulla mikrobien proteiineja niin, että siitä saataisiin tunnistukseen riittävä proteiinispektri?

Alaongelma on

- Kuinka paljon Sepsityper Kitillä saadut bakteeritunnistustulokset eroavat viljelymaljoilta kasvatetuista bakteeripesäkkeistä saatujen tulosten kanssa?

8 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖNTOTEUTUS

8.1 Tutkimuksen metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus, joka perustuu numeerisen tiedon keräämiseen, tutkimuksen objektiivisuuteen, tietojen strukturoimiseen ja kerätyn aineiston tilastomatemattiseen analysointiin (Vilka 2007, Viestintätieteellinen tutkimus 2013). Kyseisessä tutkimustyyppissä tutkittava asia tulee olla tieteellisesti mielekäs ja perusteltu sekä tutkimusongelmat määritetty (Leino-Kilpi 2009). Kvantitatiiviselle tutkimukselle esitetään hypoteesit eli perustellut väitteet, jotka ovat ennakoituja ratkaisuja tai selityksiä tutkimuksessa mahdollisesti esiintyviin ongelmiin. Hypoteesien tulee perustua teoreettiseen viitekehykseen eli aikaisempiin tutkimuksiin ja olemassa olevaan teoreettiseen tietoon. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa kerätään tietyistä perusjoukosta tutkimusaineistoksi edustava otos, analysoidaan kerätty aineisto tarkkojen mittausmenetelmien avulla ja raportoidaan saadut tutkimustulokset määrällisesti ja numeerisesti tilastollisia menetelmiä hyödyntäen. (Hirsijärvi ym. 2007.) Lopuksi lasketaan aineiston tutkittavien muuttujien väliset tilastolliset riippuvuudet, verrataan saatuja tutkimustuloksia teoreettiseen viitekehykseen ja tehdään lopulliset johtopäätökset (Kemi 2013).

Tässä opinnäytetyössä on hyödynnetty teoreettista tietoa ja aiemmissa tutkimuksissa esiintyviä johtopäätöksiä. Tutkimustulokset ovat määrällisiä ja ne on esitetty tilastollisia menetelmiä hyödyntäen. Tässä opinnäytetyössä on määritetty tutkimusongelmat, joihin on saatu vastaukset tutkimustulosten avulla.

8.2 Tutkimuksen käytännön toteutus

Opinnäytetyön empiirinen osuus suoritettiin toukokuussa 2013 Tykslabin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa osastolla 938. Ennen käytännöntöiden aloittamista tutkimukseen haettiin ja saatiin tutkimuslupa (LIITE 1) Turun kliiniseltä

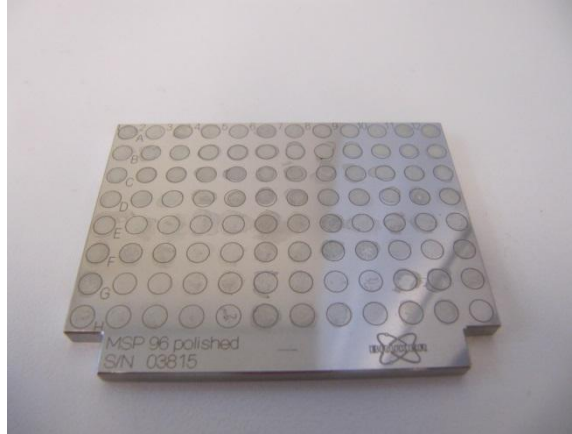
tutkimuskeskukselta (Turku CRC) ja Tykslabin ylihoitajalta. Opinnäytetyön teoriaosuus, tulosten analysointi ja lopullinen raportti kirjoitettiin syyslukukauden 2013 alussa.

Tutkimuksen aineistona käytettiin 44 (=n) tuoretta positiivista veriviljelypulloa, jotka olivat peräisin Turun kaupunginsairaalaista ja Tyksin kantasairaalaista. Potilaita oli yhteensä 34 ja jokaisesta heistä oli otettu 2–4 veriviljelypulloa. Osa veriviljelypulloista oli kuitenkin negatiivisia, joten kyseisiä pulloja ei otettu huomioon tässä tutkimuksessa. Tutkijoiden tuli analysoida mahdollisimman tuoreita veriviljelynäytteitä tutkimuksen luotettavuuden takaamiseksi, joten käytännön työt suoritettiin aamuisin Turun kaupunginsairaalan mikrobiologian laboratoriossa kahdeksana eri työpäivänä. Sairaalamikrobiologi perehdytti tutkijat veriviljelynäytteiden esikäsittelyyn, veriviljelynäytteiden analysoinnissa tarvittaviin väliaineisiin ja MALDI-TOF MS –analysointilaitteiden käyttöön ennen varsinaisten käytännön töiden aloittamista. Perehdytyksen jälkeen positiiviset veriviljelynäytteet esikäsiteltiin MALDI Sepsityper Kitillä työohjeita apuna käyttäen. Esikäsitellyt tiettyä patogeenia sisältävät verinäytteet analysoitiin MALDI-TOF MS –laitteella työohjeiden mukaisesti. Lopuksi MALDI:lla saatuja bakteeritunnistustuloksia verrattiin laboratoriohoitajien tekemien bakteeriviljelyistä tehtävillä rutiinitutkimuksilla saatuihin tuloksiin. Kyseiset rutiinitutkimukset suoritettiin laboratorion henkilökunnan toimesta ja lopulliset tutkimustulokset saatiin sairaalamikrobiologilta. Tulokset verrattiin Sepsityper Kitin luotettavuutta MALDI-TOF MS –bakteeritunnistuksessa.

Tutkimuksen alussa veriviljelynäytteet esikäsiteltiin vetokaapissa. Jokaisesta tutkittavasta positiivisesta aerobisesta ja anaerobisesta veriviljelypullosta lisättiin tunnistenumeroilla identifioituihin Eppendorf-putkiin 1 ml verinäytettä ja 200 µl lysis-puskuriliuosta (Lysis Buffer, Sepsityper Kit). Tämän jälkeen putkia vortexoitettiin sekoittajalla kymmenen sekuntia ja sentrifugoitiin sentrifugilla minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen putkien näytesakkojen päälle syntyneet liuokset eli supernatantit pipetoitiin pois ilmamäntäpipetillä. Pipetoinnin jälkeen näytepellettien päälle lisättiin 1 ml pesupuskuria (Washing Buffer, Sepsityper Kit), joka sekoitettiin hyvin pelletin sekaan pipetin avulla. Tämän jälkeen näyteputkille tois-

tettiin sentrifuugaus ja supernatanttien poisto. Seuraavaksi näyteputkiin lisättiin ilmamäntäpipetillä sekoittaen 300 µl deionionisoitua vettä ja 900 µl etanolia, jonka jälkeen suoritettiin kahden minuutin sentrifuugaus ja supernatanttien poisto. Tämän jälkeen pellettiä sisältävät Eppendorf-putket sentrifugoitiin uudelleen, jotta ylimääräinen etanoli saataisiin erotettua ja pipetoitua pois pelleteistä. Kyseisen käsittelyn jälkeen putkiin jääneiden bakteerimassojen (pellettien) annettiin kuivua huoneenlämmössä muutaman minuutin ajan. Pellettien kuivuttua putkiin lisättiin pelletin koon mukaisesti joko 10 µl (pieni pelletti) tai 30 µl (iso pelletti) 70 % muurahaishappoa ja sekoitettiin jälleen pipetoimalla. Muurahaishappo edesauttaa solujen hajoamista, jolloin solunsisäiset proteiinit vapautuvat analysoitaviksi (Harju 2013a). Tämän jälkeen putkia sekoitettiin pipetoimalla ja niihin lisättiin vielä varovasti sekoittaen yhtä suuri määrä 100 % asetonitriliä. Lopuksi putkia sentrifugoitiin kahden minuutin ajan. (Tykslab 2013b.)

Ennen kuin näytteet analysointiin MALDI-TOF MS –analyssaattorilla, niiden tiedot kirjattiin ylös paperiseen taulukkoon ja MALDI Biotyper RTC –ohjelmistoon. Näytteet nimettiin taulukoihin tunnistenumeroiden mukaisesti. Seuraavaksi esikäsiteltyihin näyteputkiin muodostuneet supernatantit pipetoitiin ilmamäntäpipetillä 1 µl kokoisina pisaroina taulukon mukaisille näytelevyn näytespoteille eli näytepaikoille (Kuva 4.). Supernatanttien kuivuttua kaikkien jälkimmäisissä spotteissa olevien näytteiden päälle lisättiin 0,5 µl 25 % muurahaishappoliuosta. Liuoksen kuivuttua kaikkiin näytespoteihin lisättiin vielä 1 µl HCCA-matriisiliuosta, joka mahdollistaa näytteen ionisoinnin massaspektrometrillä. Kun HCCA-matriisi kuivui, näytteet analysoitiin MALDI-TOF MS –analyssaattorilla. (Tykslab 2013d, Bruker Daltonik GmbH 2011.)



Kuva 4. MALDI-TOF MS –menetelmässä käytettävä näytelevy (Korhonen & Tursas 2013).

Esikäsittely suoritettiin pääsääntöisesti annettujen työohjeiden mukaisesti. Joidenkin näytteiden kohdalla sentrifugointiaikoihin jouduttiin kuitenkin tekemään muutoksia, sillä osa potilasnäytteistä oli ominaisuuksiltaan hyvin vaikeasti käsiteltäviä. Erityisesti ensimmäisiä supernatanteja pipetoitaessa näytteiden pelletit irtosivat helposti putkien pohjista. Tällöin putkien sentrifugointi toistettiin, jotta pelletit saataisiin uudestaan muodostettua putkien pohjille. Lisäksi muutamat verinäytteet paakkuuntuivat helposti sentrifugoinnin jälkeen, jolloin pellettejä ei saatu sekoitettua hyvin tutkimuksessa käytettyihin reagensseihin. Alla olevassa kuvassa on esitetty positiivisten veriviljelynäytteiden esikäsittelyssä tarvittavat välineet, liuokset ja reagenssit (Kuva 5.).



Kuva 5. Veriviljelynäytteiden esikäsittelyssä tarvittavat välineet, liuokset ja reagenssit (Korhonen & Tursas 2013).

8.3 Tutkimuksen eettiset lähtökohdat

Tutkimusetiikalla tarkoitetaan tapaa, jota tutkijoiden tulee noudattaa tutkimusta toteuttaessaan. Sen avulla määritetään tutkimustyötä koskevat pelisäännöt, joihin kuuluvat erilaiset eettiset periaatteet, kuten normit, arvot ja hyveet. (Vilkkä 2007.) Kliinisen laboratoriotyön eettisiin periaatteisiin kuuluu erittäin keskeisenä osana yksityisyyden suoja. Bioanalyytikon tulee noudattaa salassapitovelvollisuutta hankkimalla laboratoriotutkimuksia varten vain tarvittavat tiedot ja estämällä näiden tietojen vuotaminen laboratorion ulkopuolelle. (Tuokko ym. 2009.) Tässä opinnäytetyössä tehtävä tutkimus ei kohdistu suoraan ihmisiin vaan tarkoitus on testata laboratoriossa jo valmiiksi käytössä olevien potilasnäytteiden avulla MALDI Sepsityper Kitin toimivuutta bakteerien identifikaatiossa MALDI-TOF MS –laitteella. Tutkimuksessa taataan potilaille anonymiteetti eli henkilötietosuoja käyttämällä aineistona vain numerokoodeilla merkittyjä potilasnäytteitä (Leino–Kilpi 2009). Aineiston hankintaan, koehenkilöiden suostumukseen ja tiedonantoon tai salassapitoon ja tietosuojaan liittyviä eettisiä ongelmia ei siis ole kyseisessä tutkimuksessa.

Tutkimusprosessissa tulee aina noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä. Hyvällä tieteellisellä käytännöllä tarkoitetaan sitä, että tutkimuksen tavoitteet, kysymyksenasettelut, aineiston kerääminen ja käsittely eivät loukkaa tutkimuksen kohderyhmää tai hyvää tieteellistä tapaa. Lisäksi tutkijat ovat vastuussa tutkimuksessa tehtävistä valinnoista ja niihin liittyvistä perusteluista. Tutkijoiden tulee myös välttää muun muassa vilppiä ja piittaamattomuutta. Piittaamattomuutta voi olla muun muassa tutkimustulosten puutteellisuus tai huolimaton kirjaaminen. Vastaavasti vilpillä tarkoitetaan luvaton lainaamista, havaintojen vääristelyä ja sepittämistä. (Vilkkä 2007, Leino–Kilpi 2009.) Opinnäytetyössä tulee noudattaa rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta sekä avoimuutta kaikkien tutkimustulosten julkaisussa. Tutkijat ovat raportoineet ja julkaisseet tutkimustulokset vääristelemättä, jolloin työtä ei ole myöskään plagioitu eli kopioitu suoraan toisen tutkijan työstä. (Hirsijärvi ym. 2007.)

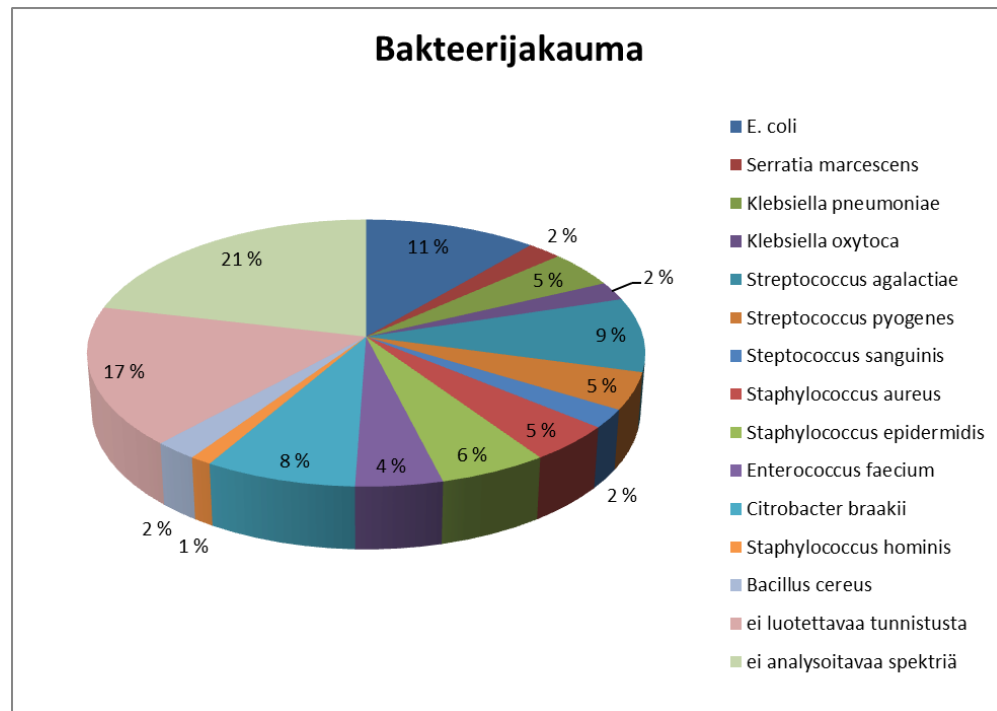
9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 44 (=n) tuoretta positiivista veriviljelypulloa, jotka olivat peräisin 34 eri potilaasta. Jokaisesta tutkitusta veriviljelypullosta esikäsiteltiin MALDI Sepsityper Kitillä pieni määrä verinäytettä, josta myöhemmin tehtiin bakteeri-identifikaatio MALDI-TOF MS –laitteella. Ennen MALDI:lla ajoa samaa veriviljelynäytettä samasta veriviljelypullosta lisättiin näytelevyn kahteen eri näytespottiin, joten analysoitujen näytteiden määrä kaksinkertaistui. Yhtä verinäytettä (3-13927) jouduttiin poikkeuksellisesti pipetoimaan kolmeen eri näytespottiin epäonnistuneen pipetoinnin vuoksi, joten MALDI:lla analysoitiin kokonaisuudessaan yhteensä 89 näytettä (LIITE 2). Liitteessä näkyy MALDI-TOF MS –menetelmällä saadut Sepsityper Kitillä esikäsiteltyjen näytteiden bakteeritunnistustulokset ja niiden vastaavuuspisteet (score value). Lisäksi taulukoon on lisätty muilla rutiinitutkimuksilla saadut tulokset. Esikäsitellyllä ja MALDI-TOF MS –analysointilaajalla saatuja tuloksia verrattiin bakteeriviljelystä tehtävillä rutiinitutkimuksilla saatuihin bakteeritunnistustuloksiin. Lisäksi tuloksissa on raportoitu, kuinka suurelta osalta potilaista saatiin edes yhdestä veriviljelypullosta bakteeritunnistustulos. Jo yksi tunnistettu veriviljelynäyte samasta potilaasta riittää taudin diagnosointiin (Harju 2013c).

Viiden potilaan kohdalla saatiin vähintään yhdestä näytespotista bakteeritunnistus MALDI-TOF MS –laitteella, mikä riittää taudin diagnosointiin. Sitä vastoin 11 potilaan kohdalla yhdestäkään näytespotista ei saatu bakteeritunnistusta. Kaiken kaikkiaan 18 potilaan kaikista näytespoteista saatiin onnistunut bakteeritunnistus.

Kaikista esikäsitellyistä ja MALDI-TOF MS –laitteella analysoiduista positiivisista veriviljelynäytteistä 55 näytteelle (62 %) saatiin onnistunut bakteerilajitunnistus. Lisäksi jokaisesta samaa verinäytettä sisältävästä näytespotista saatiin tunnistettua sama aerobinen bakteerilaji, joten kaikki tutkimuksen aineistona käytetyt veriviljelypullot sisälsivät vain yhtä bakteerilajia. Tunnistetuista bakteerilajeista yleisimpiä olivat *E. coli* (11 %), *Streptococcus agalactiae* (9 %) ja *Citrobacter braakii* (8 %). Sitä vastoin 34 (38 %) näytteelle ei saatu onnistuneesti tunnistus-

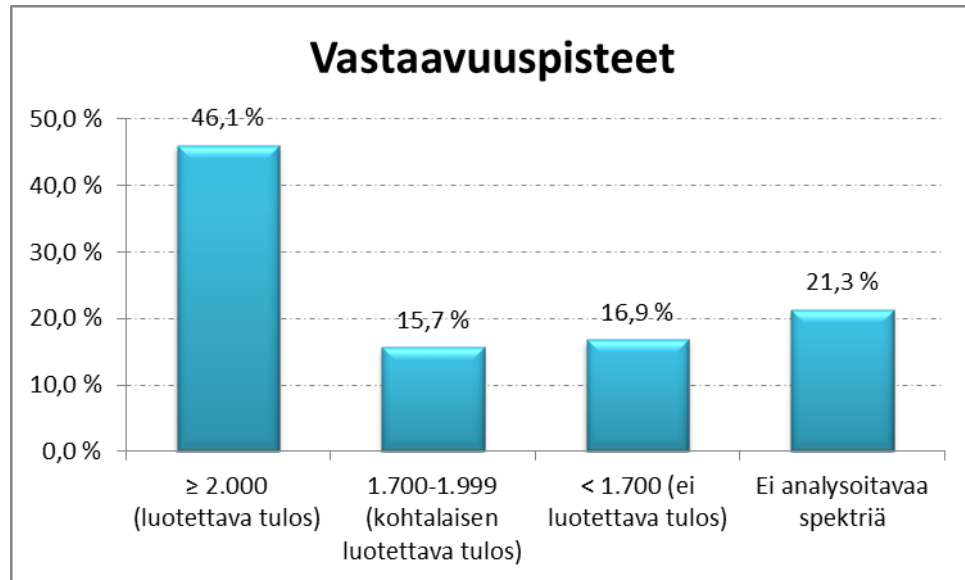
ta MALDI-TOF MS –laitteella. Näistä epäonnistuneista bakteeritunnistuksista 15 (17 %) näytteelle ei saatu luotettavaa bakteeritunnistusta ja 19 (21 %) näytteelle ei saatu analysoitavaa mikrobin proteiinispektriä. Kuviossa 1 on esitetty tutkimuksessa käytetyillä menetelmillä saadut bakteeritunnistustulokset prosentiosuuksina.



Kuvio 1. Esikäsitellyllä ja MALDI-TOF MS –menetelmällä saadut bakteeritunnistustulokset.

Kaikista esikäsitellyistä näytteistä 41 näytettä (46,1 %) saatiin analysoitua luotettavasti MALDI-TOF MS –laitteella. MALDI antoi kyseisten näytteiden sisältämien bakteerilajien proteiinispektreille luotettavat vastaavuuspisteet (score value ≥ 2.000). Lopuille MALDI:lla identifioituille 14 näytteelle (15,7 %) saatiin kohtalaisen hyvä bakteeritunnistustulos, jolloin kyseinen laite antoi tunnistetusta proteiinispektreistä kohtalaisen luotettavat vastaavuuspisteet (score value 1.700–1.999). Sitä vastoin 15 näytettä (16,9 %) ei saatu analysoitua luotettavasti (score value ≤ 1.700) MALDI:lla. Lisäksi 19 näytteelle (21,3 %) MALDI ei saanut analysoitua proteiinispektriä lainkaan (score value < 0). Mikäli esikäsiteltyjen näytteiden vastaavuuspisteet olivat ≤ 1.700 tai < 0 , MALDI-TOF MS –

analysaattori ei saanut tunnistettua ja nimettyä positiivisessa veriviljelynäytteessä kasvavaa bakteerilajia. Kuviossa 2 on esitetty MALDI:lla identifioitujen näytteiden vastaavuuspisteet prosentteina.

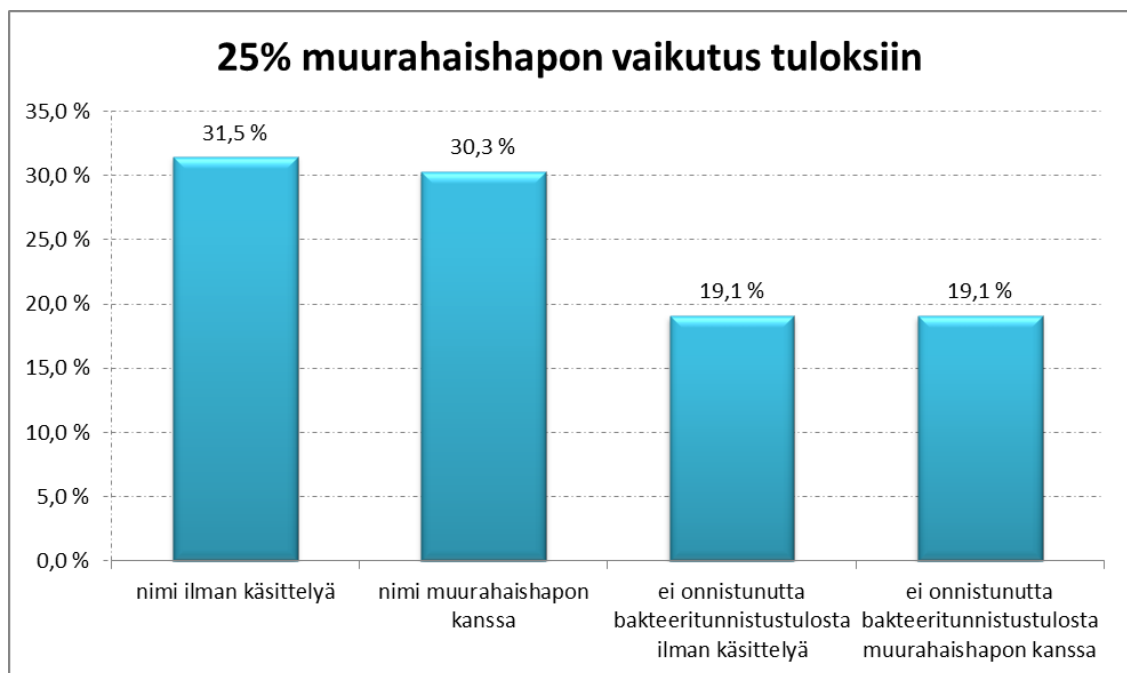


Kuvio 2. Esikäsitellyllä ja MALDI-TOF MS –menetelmällä saatujen tulosten luotettavuusjakauma.

Ennen MALDI-TOF MS –analysaattorilla ajoa jokaisen näytteen toiseen näytespottiin lisättiin 25 % muurahaishappoliuosta. Kyseinen liuos pipetoitiin lisävarmistuksen vuoksi, jolloin saatiin varmistettua mikrobien proteiinien täydellinen hajoaminen näytteessä. Tämän seurauksena kaikki solunsisäiset proteiinit vapautuivat analysoitaviksi. (Harju 2013b.) Näin ollen noin puolet 89 esikäsitellystä näytteestä ajettiin MALDI-TOF MS –analysaattorilla ilman 25 % muurahaishappokäsittelyä ja loput näytteistä vastaavasti 25 % muurahaishappoliuoksen kanssa. 31,5 %:lle näytteistä, joihin ei lisätty 25 % muurahaishappoa, saatiin bakteeritunnistustulos. Vastaavasti kyseisellä liuksella käsitellyistä näytteistä 30,3 %:lle saatiin bakteeritunnistustulos. Yhden näytteen kohdalla tulos saatiin vain ilman 25 % muurahaishappokäsittelyä (näyte Fx1366.2) ja toisen näytteen (näyte Fx1533) kohdalla pelkän 25 % muurahaishappokäsittelyn avulla. Kaikista esikäsitellyistä veriviljelynäytteistä 34 näytteelle (38 %) ei saatu onnistunutta

bakteeritunnistustulosta riippumatta siitä, oliko näyte käsitelty 25 % muurahaishappoliuoksella vai ei.

MALDI Sepsityper Kittiä ja 25 % muurahaishappoa on käytetty mikrobien tunnistuksessa Päijät-Hämeen keskussairaalan klinisen mikrobiologian laboratoriossa. Tämän vuoksi tässä opinnäytetyössä tutkittiin MALDI Sepsityper Kitin luotettavuutta myös 25 % muurahaishapon kanssa. (Harju 2013b.) Kuviossa 3 on esitetty 25 % muurahaishapon vaikutus tuloksiin.



Kuvio 3. 25 %:sen muurahaishappokäsittelyn vaikutus veriviljelytuloksiin.

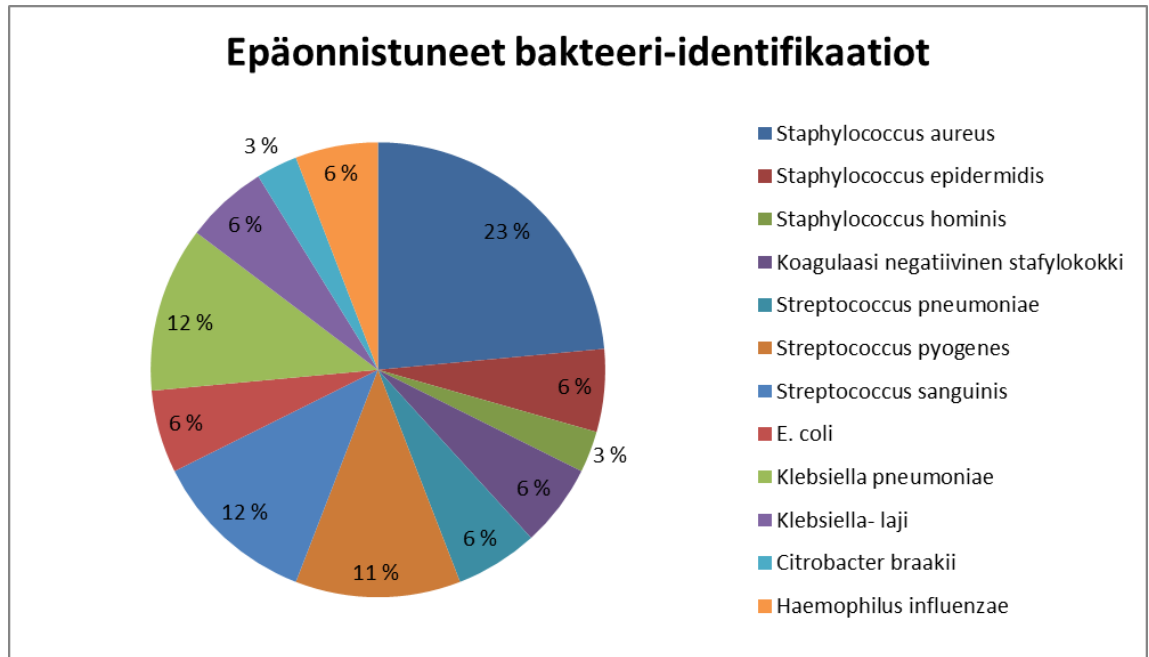
MALDI Sepsityper Kitillä esikäsitellyille 55 näytteelle (62 %) saatiin sama bakteeritunnistustulos kuin muilla rutiinitutkimuksilla. Lopuille 34 näytteelle (38 %) ei saatu riittävän luotettavaa tulosta (score value <1.700) tai MALDI-TOF MS – analysaattori ei antanut kyseisille näytteille lainkaan proteiinispektriä. Jokaiselle analysoidulle positiiviselle veriviljelypullolle tehtiin bakteeriviljelyn lisäksi myös muita tarvittavia rutiinitutkimuksia. Tässä työssä käytettyjä muita rutiinitutkimuksia olivat optokiin testi, streptokokkiagglutinaatio, stafylokokkiagglutinaatio, Vitek 2 –laitteella analysointi, sappieskuliini- ja arabinoositestit sekä erilaiset antibi-

oottiherkkyysmääritykset. Viljelymaljalla kasvava mikrobipesäke analysoitiin suoraan MALDI-TOF MS –analysaattorilla ilman erillistä esikäsitelyä. Kahden näytteen (2-1435 ja 2-1436) kohdalla tulos varmistettiin vielä Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksesta (THL). Kuviossa 4 on esitetty rutiinitutkimusten ja Sepsityper Kitillä esikäsiteltyjen näytteiden vastaavuus prosentteina.



Kuvio 4 Tutkimuksessa käytettävillä menetelmillä ja rutiinitutkimuksilla saatujen tulosten vertailu.

Kaikista MALDI Sepsityper Kitillä esikäsitellyistä positiivisista veriviljelynäytteistä ei saatu tunnistettua bakteerilajia MALDI-TOF MS –laitteella. Sitä vastoin näiden 34 näytteen (38 %) sisältämät bakteerilajit saatiin onnistuneesti tunnistettua mikrobiologian laboratoriossa jo käytössä olevilla rutiinitutkimuksilla. Kyseisten näytteiden bakteerilöydökset koostuivat kaiken kaikkiaan 12 aerobisesta bakteerilajista. 11 näytteestä tunnistettiin gramnegatiivinen sauva ja lopuista 23 näytteestä grampositiivinen kokki. Rutiinitutkimuksilla saatujen tulosten mukaan suurin osa esikäsitellyistä ja MALDI:lla epäonnistuneesti identifioiduista bakteereista oli grampositiivisia kokkeja, joista yleisimmät olivat *Staphylococcus aureus* (23 %), *Streptococcus sanguinis* (12 %) ja *Streptococcus pyogenes* (11 %). Kuviossa 5 on esitetty tutkimuksessa epäonnistuneesti identifioidut bakteerilajit prosenttiosuuksina.



Kuvio 5. Esikäsitellyistä veriviljelynäytteistä MALDI-TOF MS –laitteella epäonnistuneesti identifioidut bakterilaji.

10 POHDINTA

10.1 Johtopäätökset

Opinnäytetyön pääongelmana oli selvittää, parantaako MALDI Sepsityper Kitin käyttö MALDI-TOF MS –laitteella analysoitavien positiivisten veriviljelynäytteiden bakteeritunnistustulosten luotettavuutta. Tutkimuksen alaongelmana oli arvioida, eroavatko MALDI Sepsityper Kitillä saadut bakteeritunnistustulokset viljelymaljoilla kasvatetuista bakteeripesäkkeistä saatujen tulosten kanssa. Esikäsitellyistä veriviljelynäytteistä saatuja tuloksia verrattiin rutiinitutkimuksilla saatuihin tuloksiin. Tulosvertailusta selvisi, että bakteeriviljelyistä tehdyt bakteeridentifikaatiot onnistuivat MALDI:lla selvästi paremmin kuin suoraan verestä tehdyt bakteeridentifikaatiot. Kaikista Sepsityper Kitillä esikäsitellyistä näytteistä 62 % identifioitiin luotettavasti tai kohtalaisen luotettavasti kyseisellä analysaattorilla. Tutkimuksessa onnistuneet bakteeritunnistustulokset vastasivat rutiinitutkimuksilla saatuja tuloksia. Tarkastellessa bakteeritunnistustuloksia MALDI Sepsityper Kitti osoittautui melko epäherkäksi esikäsitelymenetelmäksi, sillä suuri osa näytteistä jäi ilman luotettavaa bakteeritunnistustulosta tai proteiinispektriä. Sitä vastoin jokaisesta tutkimuksessa epäonnistuneesti identifioidusta positiivisesta verinäytteestä saatiin tunnistettua bakteerilaji rutiinitutkimuksen avulla. Kyseisillä eri menetelmillä saatujen bakteeritunnistustulosten perusteella voidaan päätellä, että bakteeriviljelyistä tehdyt rutiinitutkimukset ovat herkempi ja luotettavampi tunnistuskeino bakteerien osoituksessa veriviljelyistä kuin MALDI Sepsityper Kitti –esikäsitelymenetelmä. Lisäksi tutkimuksessa tehtyjen havaintojen ja eri menetelmien tulosvertailun perusteella voidaan todeta, että MALDI Sepsityper Kitti esikäsitelyä ei ole kannattavaa ottaa rutiinikäyttöön mikrobiologian laboratoriossa.

Opinnäytetyön tutkimuksessa saatuja tuloksia tarkasteltiin kriittisesti vertaamalla niitä aikaisemmissa tutkimuksissa saatuihin tuloksiin ja havaintoihin. Buchan ym. (2011) tekemän tutkimuksen tapaan tässä tutkimuksessa saatiin pääosin tunnistettua epävarmemmin grampositiiviset kokit kuin gramnegatiiviset sauvat.

Esimerkiksi yhdestäkään grampositiivista ja koagulaasinegatiivista stafylokokki-lajia sisältävästä veriviljelynäytteestä ei saatu luotettavaa bakteeritunnistustulosta. Sitä vastoin kaikille gramnegatiivista *Serratia marcescens*-bakteeria sisältäville näytteille saatiin vähintään kohtalaisen luotettava bakteeritunnistustulos. Poikkeustapauksia olivat kuitenkin näytteet, jotka sisälsivät grampositiivista *Staphylococcus epidermidis*-lajia. Näistä jopa 71 %:lle saatiin luotettava bakteeritunnistustulos. Myös Prod'hom ym. (2010) ja Lagae-Wiens ym. (2012) tekemissä tutkimuksissa on tieteellisesti todettu, että esikäsitellyistä positiivisista veriviljelynäytteistä saadaan kokonaisuudessaan tunnistettua luotettavammin gramnegatiiviset bakteerit kuin grampositiiviset bakteerit MALDI-TOF MS –laitteella. Samankaltaisten tutkimustulosten perusteella voidaan siis todeta bakteerilajin värjäytyvyydellä ja morfologisilla ominaisuuksilla olevan vaikutusta bakteeritunnistuksen onnistumiseen. Tämä pätee sekä suoraan veriviljelypullosta että bakteerimaljalta MALDI:lla analysoituihin positiivisiin veriviljelynäytteisiin.

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa kerätään tietystä perusjoukosta tutkimusaineistoksi edustava otos (Hirsijärvi ym. 2007). Tämän opinnäytetyön tutkimusaineisto koostui 44 (=n) tuoreesta positiivisesta veriviljelypullosta. Tutkimuksen edustavuuden kannalta otoksen koko oli melko pieni, joten esikäsiteltyjen veriviljelynäytteiden bakteeritunnistustulokset eivät anna kokonaiskuvaa kaikista positiivisista veriviljelyistä löytyvistä patogeeneista. Tutkimuksessa ei ollut mahdollisuutta tutkia anaerobisten bakteerien ja hiivojen tunnistettavuutta, sillä tutkimusaineistona käytetyt veriviljelynäytteet eivät sisältäneet ollenkaan kyseisiä mikrobeja. Näin ollen tulosten prosentuaaliset bakteerijakaumat tarjoavat vain suuntaa antavaa tietoa patogeenien tunnistettavuudesta ja esiintyvyydestä veriviljelynäytteissä. Laajempi tutkimus toisi enemmän tietoa MALDI Sepsityper Kitin luotettavuudesta.

10.2 Tutkimuksen luotettavuuden arviointi

Kvantitatiivisen tutkimuksen luotettavuutta arvioidaan reliabiliteetin ja validiteetin avulla. Reliabiliteetin eli toistettavuuden avulla arvioidaan tulosten samankaltai-

suutta eri mittauskertojen välillä. Luotettavassa ja tarkassa tutkimuksessa toistettavat mittaustulokset eivät eroa toisistaan, vaikka tutkijoina olisivat eri henkilöt. Validiteetin eli pätevyyden avulla arvioidaan, onko tutkija onnistunut mittaamaan sitä, mitä tutkimuksessa oli tarkoituskin mitata. Tutkimuksen validiteetti on hyvä, jos siinä ei esiinny systemaattisia virheitä. (Vilkkä 2007.)

Tutkijat noudattivat pääsääntöisesti tutkimuksessa käytettävää työohjetta ja tutkimustulosten avulla saatiin vastaukset tutkimusongelmiin. Tutkimuksessa ei myöskään esiintynyt systemaattisia virheitä. Tutkimustulokset voidaan todeta myös toistettaviksi, sillä jokaista esikäsiteltyä veriviljelynäytettä lisättiin näytelevyn kahteen peräkkäiseen näytespottiin. Näin ollen jokainen näyte analysoitiin vähintään kahteen kertaan MALDI-TOF MS –laitteella. Luotettavuutta pyrittiin parantamaan lisäämällä jokaisen näytteen toiseen näytespottiin 25 % muurahaishappoa. Tutkimuksessa käytetyn 25 % muurahaishappoliuoksen lisäämisellä ei näyttänyt kuitenkaan olevan juuri merkitystä luotettavien tulosten parantamiseksi MALDI-TOF MS –analysointorilla. Suurin osa onnistuneen bakteeritunnistuksen saaneista näytteistä analysoitui riippumatta siitä, lisättiinkö näytespottiin 25 % muurahaishappoa vai ei. Bakteeritunnistustulokset voidaan todeta myös toistettaviksi, sillä lähes jokaisen näytteen kohdalla saatiin sama tulos molemmista näytespoteista.

MALDI-TOF MS –menetelmä on tärkeä osa mikrobiologian laboratoriota, sillä sen avulla mahdollistetaan nopea, helppo ja toistettava bakteeri-identifikaatio (Dare 2010). Täten kyseinen analysointorilla on päivittäisessä rutiinikäytössä Tykslab:n kliinisen mikrobiologian laboratoriossa, jossa MALDI:a hyödynnetään veriviljelytutkimusten lisäksi myös muissa mikrobiologisissa tutkimuksissa. Näin ollen voidaan todeta, että MALDI-TOF MS –laitteen käytöllä ei ollut merkittävää vaikutusta tutkimuksen luotettavuuteen. Sitä vastoin tutkimuksessa käytetty esikäsitelymenetelmä ja muut tekijät ovat voineet vaikuttaa tutkimustulosten luotettavuuteen. Opinnäytetyössä epäonnistuneiden bakteeritunnistusten mahdollisia syitä voi olla useita. Tällaisia epäluotettaviin ja tuloksettomiin bakteeritunnistuksiin vaikuttavia tekijöitä saattoivat olla muun muassa tutkittavan veriviljely-

näytteen ominaisuudet, veren sisältämän bakteerilajin esikäsittelyssä muodostunut niukka pelletti tai tutkijoiden esikäsittelytekniikka.

Joidenkin veriviljelynäytteiden ominaisuudet vaikeuttivat esikäsittelyä yllättävän paljon. Erityisesti limaiset ja hyytyneen näköiset verinäytteet eivät sekoittuneet hyvin reagenssiliuosten kanssa, joten kyseisten näytteiden pellettejä ei onnistuttu esikäsittelemään tarpeeksi hyvin ennen MALDI:lla analysointia. Vaikean esikäsittelyn seurauksena suurimmalle osalle kyseisistä verinäytteistä ei saatu luotettavaa bakteeritunnistustulosta MALDI:lla. Voidaan siis olettaa, että kaikki hyytyneiden verinäytteiden sisältämät bakteerit eivät reagoineet esikäsittelyssä käytettyjen reagenssiliuosten kanssa. Tästä johtuen verinäytteen bakteerisoluja erottui hyvin vähän MALDI:lla analysoitavaan supernatanttiin, joten solunsisäisiä proteiineja ei saatu vapautettua riittävästi tutkittavaan näytteeseen matriisiliuoksen avulla. Tämän seurauksena MALDI-TOF MS –laite ei voinut muodostaa näytteestä analysoitavaa proteiinispektriä.

Potilaan veren koostumuksen lisäksi tutkimuksen luotettavuuteen on mahdollisesti vaikuttanut veriviljelynäytteenotto, sillä epäonnistuneita bakteeridentifikaatioita saatiin myös laimeista verinäytteistä. Jokaiseen veriviljelypulloon tulisi saada oikea määrä verinäytettä, jotta suurin osa bakteremioista pysyttäisiin diagnosoimaan (Nissinen 2010). Tästä voidaan todeta, että potilaan veren ja veriviljelypullon sisältämän nestemäisen elatusaineen määrien suhde on tärkeä. Tutkimuksessa esikäsitellyissä laimeissa veriviljelynäytteissä oli siis valtaosa veriviljelypullon sisältämää lisäainetta ja vähäinen määrä tutkittavaa verta. Bakteerien esiintyvyys veressä on suoraan verrannollinen verinäytteen määrään, joten kyseisissä näytteissä ei todennäköisesti ollut tarpeeksi tutkittavaa materiaalia MALDI:lla analysointia varten. Veriviljelynäytteenoton huolellisuuteen ja oikeaoppisuuteen tulee siis kiinnittää erityistä huomiota.

Epäonnistuneisiin bakteeritunnistuksiin on voinut vaikuttaa myös esikäsittelyn eri vaiheissa tapahtuneet muutokset ja tutkijoiden kokemattomuus. Kyseisen tutkimuksen suorittaneilla henkilöillä ei ollut aikaisempaa kokemusta veriviljelynäytteiden esikäsittelystä, joten tutkimustuloksiin on voinut vaikuttaa esimerkiksi vääränlainen pipetointitekniikka. Tutkijat kuitenkin työskentelivät huolellisesti ja

käsittelivät tarkkaan työhjeiden mukaisilla reagenssiliuosmäärillä tutkittavat verinäytteet. Muutaman vaikeasti käsiteltävän verinäytteen kohdalla jouduttiin kuitenkin poikkeamaan työhjeen sentrifugointiajoista. Kyseisiä näytteitä jouduttiin sentrifugoimaan useampaan kertaan, jotta kunnollinen pelletti saatiin muodostumaan putken pohjalle ja esikäsiteltyä hyvin MALDI:lla analysointia varten. Ohjaajan mukaan sentrifugointiaikojen muutoksilla ei pitäisi olla suurta vaikutusta tutkimustuloksiin. Tätä ei ole kuitenkaan tieteellisesti todistettu oikeaksi.

Opinnäytetyön tutkimuksen tavoitteena oli tunnistaa positiivisten veriviljelynäytteiden sisältämät mikrobit nopeasti. Aikaisempien tutkimusten mukaan MALDI Sepsityper Kitti –esikäsitely nopeuttaa veriviljelytulosten saantia huomattavasti, sillä bakteeritunnistustulokset saadaan MALDI-TOF MS –laitteella valmiiksi jo saman päivän aikana. Tämä kävi ilmi myös opinnäytetyön empiirisessä vaiheessa. Nopeudestaan huolimatta veriviljelynäytteiden esikäsitely osoittautui hyvin työlääksi, monivaiheiseksi menetelmäksi. Monien eri työvaiheiden vuoksi tulosten luotettavuuteen vaikuttavan virheen mahdollisuus on merkittävä. Työntekijät tulisi perehdyttää veriviljelynäytteiden esikäsitelyyn hyvin, sillä työ vaatii tarkkaa pipetointitaitoa ja huolellista aseptiikkaa. Aseptisten toimintatapojen puutteellisuuden seurauksena ympäristöstä tulevat kontaminantit voivat päätyä verinäytteeseen ja hankaloittaa tutkimuksen kannalta merkittävän patogeenin löytymistä.

Jatkotutkimuksia ajatellen esikäsitelyn soveltuvuutta mikrobien nopeassa tunnistuksessa olisi kannattavaa tutkia jatkossa isommalla otoskoolla. Esimerkiksi laajasta yli sadasta näytteestä koostuvasta tutkimusaineistosta saataisiin parempi kokonaiskuva verestä löytyvien patogeenien eroavaisuuksista tunnistettavuudessa. Tutkittavien bakteerilajien monimuotoisuutta tulisi myös lisätä valitsemalla tutkimusaineistoksi mahdollisimman monipuolinen näytemateriaali. Lisäksi tulisi tutkia, miten esikäsitelyn eri työvaiheet vaikuttavat tutkittavaan näytteeseen ja vaikuttavatko työhjeiden muutokset tutkimustulosten luotettavuuteen.

10.3 Tutkimuksen eettisyyden arviointi

Hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen tutkimuksessa mukana olleelle kohde-ryhmälle ei saa aiheutua vahinkoja (Vilka 2007). Tässä opinnäytetyössä noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimus ei kohdistunut suoraan ihmisiin vaan tarkoitus oli tutkia laboratorioissa jo valmiiksi käytössä olevien positiivisten veriviljelynäytteiden avulla MALDI Sepsityper Kitin toimivuutta bakteerien identifiointiossa MALDI-TOF MS -laitteella. Opinnäytetyössä tehtävää tutkimusta varten ei siis jouduttu ottamaan ylimääräisiä potilasnäytteitä. Tässä opinnäytetyössä ei esiintynyt tietosuojan, salassapitoon, aineiston hankintaan tai koehenkilön suostumukseen liittyviä eettisiä ongelmia. Tutkijat käsitelivät jokaisen käytetyn positiivinen veriviljelypullon anonyymisti tunnistenumeroiden avulla eli näytteiden potilastiedot eivät olleet näkyvissä missään vaiheessa tutkimusta tehdessä. Tutkimuksen teossa oltiin huolellisia ja kaikkien tutkimustulosten julkaisussa noudatettiin rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta sekä avoimuutta.

Tutkimusta kirjoittaessa pitää noudattaa hyvää lähdekritiikkiä. Tutkijat arvioivat käyttämänsä lähteen laadun ennen sen käyttämistä tutkimuksessaan. Lähdekritiikki on erityisen tärkeä osa tutkimusta, koska sen avulla voidaan vaikuttaa tutkimuksen luotettavuuteen. (Vilka 2007.) Tässä opinnäytetyössä noudatettiin hyvää lähdekritiikkiä eikä plagioitu muita tekstejä. Muualta etsitty tieto on merkity tekstiin lähdeviitteillä.

10.4 Opinnäytetyön rakenne

Ohjeistuksen mukaan opinnäytetyön teoriaosuus tulisi sijoittaa yhden ison otsikon alle. Tämän opinnäytetyön teoreettinen viitekehys on kuitenkin laaja ja se sisältää paljon tutkimuksen kannalta oleellista tietoa ja tärkeitä käsitteitä. Tämän vuoksi teoriaosuus on jaettu useiden isompien otsikoiden alle, jotta se on johdonmukainen, järjestelmällinen ja selkeä kokonaisuus.

LÄHTEET

- Anttila, V.-J. 2013. Sepsis. Lääkärin käsikirja. Duodecim. Viitattu 9.9.2013
http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00027&p_haku=bakteeriviljely.
- Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V.-J. 2010. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisia kokkeja. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Duodecim: Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.
- Bakteriologie-Atlas 2013. Streptococcus agalactiae. Viitattu 15.9.2013
http://www.bakteriologieatlas.de/Bakterien/Streptococcus_agalactiae.htm.
- Bakteriologie-Atlas 2013. Enterococcus faecalis. Viitattu 15.9.2013
http://www.bakteriologieatlas.de/Bakterien/Enterococcus_faecalis.htm.
- Buchan, B.; Riebe, K. & Ledebauer, N. 2011. Comparison of the MALDI Biotyper System Using Sepsityper Specimen Processing to Routine Microbiological Methods for Identification of Bacteria from Positive Culture Bottles. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 50, no. 2. Viitattu 28.4.2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264150/>.
- Bruker Daltonik GmbH 2004. MALDI Mass Spectrometry. Teoriavihko. Saksa: Bremen.
- Bruker Daltonik GmbH 2011. MALDI Biotyper 3.0 User Manual – Software for Microorganism Identification and Classification. 2.painos. Saksa.
- Dare, D. 2010. Rapid Bacterial Characterization and Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Teoksessa Tang, Y.-M. & Stratton C.W. (toim.) Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. USA: Spinger.
- Duodecim 2013. Mikrobilääkeprofylaksi. Viitattu 11.9.2013
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02132.
- Hall, K.K. & Lyman, J.A. 2006. Updated Review of Blood Culture Contamination. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 19, no. 4. Viitattu 4.9.2013 <http://cmr.asm.org/content/19/4/788.full>.
- Han, X.Y. 2010. Automated Blood Cultures. Teoksessa Tang, Y.-M. & Stratton C.W. (toim.) Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. USA: Spinger.
- Harju, I. 2013a. Suullinen tiedonanto. Kaupunginsairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorio. 27.9.2013.
- Harju, I. 2013b. Suullinen tiedonanto. Kaupunginsairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorio. 4.10.2013.
- Harju, I. 2013c. Suullinen tiedonanto. Kaupunginsairaalan kliinisen mikrobiologian laboratorio. 1.11.2013
- Heikkilä, R.; Hellsten, S.; Koukila-Kähkölä, P.; Kurkinen, T.; Meurman, O.; Nummelin, R.; Pastila, S.; Richardson, M. & Ylönen, H. 2002. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Heikkilä, R.; Hellstén, S.; Koukila-Kähkölä, P.; Kurkinen, T.; Meurman, O.; Nummelin, R.; Pastila, S.; Richardson, M. & Ylönen, H. 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Heikkilä, M.P. 2006. E.coli-ystävä ja vihollinen. Lääkärilehti 12/2006. Viitattu 13.9.2013
<http://www.fimnet.fi.ezproxy.turkuamk.fi/cgi-cug/brs/artikkeli.cgi?docn=000025510>.

Hirsijärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja Kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Kemi, S. 2013. Johdanto opinnäytetyöprosessiin. Opetusdiat. Turun Ammattikorkeakoulu.

Katila, M. 2004. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian, ja parasitologian tutkimuksissa. Teoksessa: Penttilä, I. (toim.). Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. Painos. Porvoo: WS Bookswell Oy.

Kirkko-Jaakkola, S. 2010. Mikrobiologian teorialuento ja luentomonisteet. Turun Ammattikorkeakoulu.

Kauma, H. & Virolainen-Julkunen, A. 2010. Pneumokokki. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Duodecim: Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Käypähoito 2011. Sepsis (aikuiset). Viitattu 25.10.2013
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/hoi50032>.

Labquality.2010. Ulkoinen laadunarviointikierros 1/2010. Viitattu 10.9.2013
http://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CDgQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.labquality.org%2F%2Fwww.labquality.org%2F%2Fpdf.aspx%3Fdir%3D3%26path%3DKuvat%2FMB%2F2010_Bakteeriviljely_1.pdf&ei=G6EwUuaWFMHi4QSD-YCoDw&usq=AFQjCNEscDpYCgz08sWSPeapyxjZtxYbDA&bvm=bv.51773540,d.bGE.

Lagare-Wiens, P.; Adam, H.; Karlowsky, J.; Nichol, K.; Pang, P.; Guenther, J.; Webb, A.; Miller, C. & Alfa, M.J. 2012. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 50, no. 10. Viitattu 20.9.2013
<http://jcm.asm.org/content/50/10/3324.full?sid=98a4576c-de2b-4d8b-8cff-c8f1256fd40b>.

Lee, A.; Mirrett, S.; Reller, R.B. & Weinstein, M.P. 2007. Detection of Bloodstream Infections in Adults: How many blood cultures are needed? Journal of Clinical Microbiology. Vol. 45, no. 11. Viitattu 6.9.2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168497/>.

Leino-Kilpi, H. 2009. Hoitotyöntekijä ja tutkimusetiikka. Teoksessa: Leino-Kilpi, H. & Välimäki, M. 5. uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Levinson, W.E. & Jawetz, E. 1994. Medical Microbiology & Immunology. USA: Appleton & Lange.

Liimatainen, O. 2000. Gram- värjäys. Moodi 4-5/2000, vsk 24.

Lumio, J. 2009. Sepsis (verenmyrkytys). Lääkärin käsikirja. Duodecim. Viitattu 2.9.2013
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00604.

Lumio, J. 2013. Luutulehdus eli osteomyeliitti. Lääkärikirja. Duodecim. Viitattu 5.9.2013
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00582.

Lyytikäinen, O.; Vuopio-Varkila, J. & Kotilainen, P. 2010. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Duodecim: Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Meurman, O. 2011. Kromogeeniset maljat primaariviljelyssä. Moodi 4/2011, vol. 35.

Microbiology in pictures 2013. Streptococcus pneumoniae. Viitattu 15.9.2013
<http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/streptococcus%20pneumoniae%20photos/STPN1.html>.

Mikrobiologian syventävä harjoittelu 2013. Muistiinpanot. Turun Kaupunginsairaalan mikrobiologian laboratorio: veriviljelypiste.

Mustajoki, P. 2012. Endokardiitti (sydänläppien tulehdus). Lääkärikirja. Duodecim. Viitattu 5.9.2013 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00679.

Nissinen, A. 2010. Veriviljelyn näytteenotto. Moodi 5/2010, vsk 34.

Peltoniemi, T. & Lepistö, K. 2010. Bakteriologia- Oppimateriaali mikrobiologian opintoihin bioanalyttikko- opiskelijoille. Opinnäytetyö. Turun Ammattikorkeakoulu.

Pincus, D. 2007. Microbial identification using the Biomerieux Vitek® 2 system. Viitattu 9.9.2013 https://store.pda.org/TableOfContents/ERMM_V2_Ch01.pdf.

Prod'hom, G.; Bizzini, A.; Durussel, C.; Bille, J. & Greub, G. 2010. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 48, no. 4. Viitattu 24.9.2013 <http://jcm.asm.org/content/48/4/1481.full>.

Red Book Online 2013. Group A Streptococcal Infections. Viitattu 15.9.2013 <http://aapredbook.aappublications.org/content/1/SEC131/SEC264/G2878.expansion.html>.

Saxen, H. & Vuopio-Varkila, J. 2010. B-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Duodecim: Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Solunetti 2006. Gram-värijäys. Viitattu 16.9.2013 <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/>.

Terveiden ja hyvinvoinninlaitos 2013. Herkkyysmääritykset. Viitattu 5.9.2013 http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/herkkyysmaaritykset.

Tissari, P. & Anttila, V-J. 2010. Muu Enterobacteriaceae-heimo. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Duodecim: Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Tuokko, S.; Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet- opas näytteiden ottoa varten. 1.-2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Tykslab 2011. Tykslabin veriviljelylöydökset vuonna 2011. Viitattu 2.5.2013 <http://www.google.com/search?q=veriviljely%C3%B6yd%C3%B6kset&rls=com.microsoft:fi&ie=UTF-8&oe=UTF-8&startIndex=&startPage=1>.

Tykslab 2012. Tykslabin veriviljelylöydökset vuonna 2012. Viitattu 2.5.2013 <http://www.google.com/search?q=veriviljely%C3%B6yd%C3%B6kset&rls=com.microsoft:fi&ie=UTF-8&oe=UTF-8&startIndex=&startPage=1>.

Tykslab tutkimusohjekirja 2013. B-BaktVi. Viitattu 9.4.2013 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/1153.html>.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2000. Työohje: Optokiini-testi.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2009a. Työohje: Stafylokokkiagglutinaatio.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2009b. Työohje: Streptokokkiagglutinaatio.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2012a. Työohje: MALDI Sepsityper Kitin käyttöohje.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2012b. Työohje: Veriviljely.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2012c. Työohje: U-BaktVi.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2013a. Työohje: Katalaasitesti aerobi- ja anaerobibakteereille.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2013b. Työohje: Veriviljelynäytteen esikäsittely massaspektrometriä varten.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2013c. Työohje: Oksidaasitesti.

Tykslab kliininen mikrobiologia 2013d. Työohje: Mikrobin tunnistus Maldi-TOF:lla.

Viestintätieteellinen tutkimus 2013. Määrällinen vai laadullinen. Viitattu 9.9.2013
<http://viesverk.uta.fi/viesttiet/kaytannot/valinnat/maara.html>.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa – Määrällisen tutkimuksen perusteet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Vuento, R. & Lappalainen, M. 2013. Mikrobiologinen diagnostiikka. Therapia Fennica. Viitattu 6.9.2013 http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Mikrobiologinen_diagnostiikka.

Vuopio-Varkila, J.; Kuusela, P. & Kotilainen, P. 2010. Staphylococcus aureus. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Vuopio-Varkila, J.; Syrjänen, J. & Kotilainen, P. 2010. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia. 1.painos. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Welker, M. & Moore, E.R.B. 2010. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Systematic and Applied Microbiology, vol. 34.



Tyks-Sapa-liikelaitos/Tykslab/hll

T101 / 20.5.013

Päätös Tyks-Sapa/Tykslab T101/13

TUTKIMUSLUPA
(Toimintasääntö § 15)

<u>Tutkimuksen numero:</u>	T101/2013, 3/20.5.13
<u>Tutkimuksen nimi:</u>	<i>Maldi sepsistyperilla saatujen positiivisten veriviljelytulosten luotettavuuden arviointi.</i>
<u>Tutkimuksen ajoitus</u>	2013
<u>Vastuullinen tutkija</u>	Seija Kirkko-Jaakkola (TurkuAMK) Mukana Katjuska Korhonen, Henriikka Tursas (TurkuAMK) ja Inka Harju (Kl. mikrobiologian lab.)
<u>Tutkittavien lukumäärä</u>	-

Myönnän luvan yllä mainittuun tutkimukseen Tyks-Sapa liikelaitoksessa (Tykslab).
Edellytän, että tutkimuksesta ei aiheudu haittaa yksikön normaalille toiminnalle eikä
muita kustannuksia sairaalalle.

Benita Paloheinä
Ylihoitaja

JAKELU Vastuullinen tutkija
Opinnäytetyön tekijät
TurkuCRC
Hoitotyön toimisto

MALDI Sepsityper Kitillä esikäsitellyistä verinäytteistä saadut bakteerinimet ja vastaavuuspisteet MALDI-TOF MS-laitteella sekä muilla rutiinitutkimuksilla saadut tulokset

Näytenro	ID	MALDI:lla saatu nimi	vastaavuuspisteet (score value)	Muilla rutiinimenetelmillä saadut tulokset
1a	FX622S	not reliable identification	1.169	Streptococcus pneumoniae
1b	FX622SFA	not reliable identification	1.122	Streptococcus pneumoniae
2a	FX623S	Escherichia coli	2.294	Escherichia coli
2b	FX623SFA	Escherichia coli	2.347	Escherichia coli
3a	FX626S	no peaks found	< 0	Escherichia coli
3b	FX626FA	not reliable identification	1.059	Escherichia coli
4a	FX630S	Serratia marcescens	1.847	Serratia marcescens
4b	FX630SFA	Serratia marcescens	1.867	Serratia marcescens
5a	FX934.1	no peaks found	< 0	Klebsiella pneumoniae
5b	FX934.1FA	no peaks found	< 0	Klebsiella pneumoniae
6a	FX934.2	Klebsiella pneumoniae	2.177	Klebsiella pneumoniae
6b	FX934.2FA	Klebsiella pneumoniae	2.248	Klebsiella pneumoniae
7a	FX918.1	Streptococcus pyogenes	2.252	Streptococcus pyogenes
7b	FX918.1FA	Streptococcus pyogenes	2.258	Streptococcus pyogenes
8a	FX918.2	Streptococcus pyogenes	2.111	Streptococcus pyogenes
8b	FX918.2FA	Streptococcus pyogenes	2.176	Streptococcus pyogenes
9a	FX935.1	no peaks found	< 0	Klebsiella pneumoniae
9b	FX935.1FA	no peaks found	< 0	Klebsiella pneumoniae
10a	FX935.2	Klebsiella pneumoniae	2.149	Klebsiella pneumoniae

10b	FX935.2FA	Klebsiella pneumoniae	1.907	Klebsiella pneumoniae
11a	FX932.1	no peaks found	< 0	Streptococcus pyogenes
11b	FX932.1FA	no peaks found	< 0	Streptococcus pyogenes
12a	FX932.2	no peaks found	< 0	Streptococcus pyogenes
12b	FX932.2FA	no peaks found	< 0	Streptococcus pyogenes
13a	FX887	no peaks found	< 0	Staphylococcus epidermidis
13b	FX887FA	no peaks found	< 0	Staphylococcus epidermidis
14a	FX915	not reliable identification	1.544	Staphylococcus-laji, koagulaasi negatiivinen
14b	FX915FA	not reliable identification	1.239	Staphylococcus-laji, koagulaasi negatiivinen
15a	FX1247	no peaks found	< 0	Staphylococcus aureus
15b	FX1247FA	no peaks found	< 0	Staphylococcus aureus
16a	FX1249	Staphylococcus aureus	2.154	Staphylococcus aureus
16b	FX1249FA	Staphylococcus aureus	2.227	Staphylococcus aureus
17a	2-1395.1	not reliable identification	1.634	Staphylococcus aureus
17b	2-1395.FA	not reliable identification	1.655	Staphylococcus aureus
18a	2-1395.2	not reliable identification	1.314	Staphylococcus aureus
18b	2-1395.2FA	not reliable identification	1.375	Staphylococcus aureus
19a	2-1396	not reliable identification	1.496	Staphylococcus aureus
19b	2-1396FA	no peaks found	< 0	Staphylococcus aureus
20a	FX1365.1	Citrobacter braakii	2.155	Citrobacter braakii
20b	FX1365.1FA	Citrobacter braakii	2.12	Citrobacter braakii
21a	FX1365.2	Citrobacter braakii	2.244	Citrobacter braakii
21b	FX1365.2FA	Citrobacter braakii	2.213	Citrobacter braakii

22a	FX1366.1	Citrobacter braakii	2.276	Citrobacter braakii
22b	FX1366.1FA	Citrobacter braakii	2.248	Citrobacter braakii
23a	FX1366.2	Citrobacter braakii	1.988	Citrobacter braakii
23b	FX1366.2FA	not reliable identification	1.613	Citrobacter braakii
24a	3-13927	Staphylococcus epidermis	1.833	Staphylococcus epidermidis
24b	3-13927FA	Staphylococcus epidermis	1.702	Staphylococcus epidermidis
24c	3-13927	Staphylococcus epidermis	1.93	Staphylococcus epidermidis
25a	FX1533	no peaks found	< 0	Staphylococcus hominis
25b	FX1533FA	Staphylococcus hominis	1.864	Staphylococcus hominis
26a	FX1535	Staphylococcus aureus	2.159	Staphylococcus aureus
26b	FX1535FA	Staphylococcus aureus	2.021	Staphylococcus aureus
27a	FX1592	Escherichia coli	2.534	Escherichia coli
27b	FX1592FA	Escherichia coli	2.385	Escherichia coli
28a	FX1593	Escherichia coli	1.989	Escherichia coli
28b	FX1593FA	Escherichia coli	1.971	Escherichia coli
29a	FX1566	Staphylococcus epidermis	2.141	Staphylococcus epidermidis
29b	FX1566FA	Staphylococcus epidermis	2.146	Staphylococcus epidermidis
30a	2-1435	Klebsiella oxytoca	1.965	Klebsiella-laji
30b	2-1435FA	Klebsiella oxytoca	1.847	Klebsiella-laji
31a	2-1436	not reliable identification	1.053	Klebsiella-laji
31b	2-1436FA	not reliable identification	1.269	Klebsiella-laji
32a	FX1678.1	Streptococcus agalactiae	2.419	Streptococcus agalactiae
32b	FX1678.1FA	Streptococcus agalactiae	2.376	Streptococcus agalactiae
33a	FX1678.2	Streptococcus agalactiae	2.332	Streptococcus agalactiae
33b	FX1678.2FA	Streptococcus agalactiae	2.268	Streptococcus agalactiae
34a	FX1679.1	Streptococcus agalactiae	2.304	Streptococcus agalactiae

34b	FX1679.1FA	Streptococcus agalactiae	2.304	Streptococcus agalactiae
35a	FX1679.2	Streptococcus agalactiae	2.245	Streptococcus agalactiae
35b	FX1679.2FA	Streptococcus agalactiae	2.184	Streptococcus agalactiae
36a	FX1680	Bacillus cereus	2.25	Bacillus cereus
36b	FX1680FA	Bacillus cereus	2.175	Bacillus cereus
37a	FX1684	Escherichia coli	2.443	Escherichia coli
37b	FX1684FA	Escherichia coli	2.45	Escherichia coli
38a	V21441	Enterococcus faecium	2.196	Enterococcus faecium
38b	V21441FA	Enterococcus faecium	2.199	Enterococcus faecium
39a	V21442	Enterococcus faecium	2.314	Enterococcus faecium
39b	V21442FA	Enterococcus faecium	2.338	Enterococcus faecium
40a	FX1694	no peaks found	< 0	Streptococcus sanguinis
40b	FX1694FA	no peaks found	< 0	Streptococcus sanguinis
41a	FX1703.1	Streptococcus sanguinis	1.881	Streptococcus sanguinis
41b	FX1703.1FA	Streptococcus sanguinis	1.86	Streptococcus sanguinis
42a	FX1703.2	not reliable identification	1.054	Streptococcus sanguinis
42b	FX1703.2FA	no peaks found	< 0	Streptococcus sanguinis
43a	FX1713	no peaks found	< 0	Haemophilus influenzae
43b	FX1713FA	not reliable identification	1.328	Haemophilus influenzae
44a	FX1739	Escherichia coli	2.18	Escherichia coli
44b	FX1739FA	Escherichia coli	2.018	Escherichia coli