

Hanna Häkkinen

Bakteerien tunnistaminen GEN III:lla ja vertailu referenssimenetelmiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

15.04.2014

| | |
|--|---|
| Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika | Hanna Häkkinen Bakteerien tunnistus GEN III:lla ja vertailu referenssimenetelmiin 35 sivua + 3 liitettä 15.05.2014 |
| Tutkinto | insinööri (AMK) |
| Koulutusohjelma | Bio- ja elintarviketekniikka |
| Suuntautumisvaihtoehto | Tuotekehitys ja laadunvalvonta |
| Ohjaaja(t) | Mikrobiologi Aija Luoma Yliopettaja Veli-Matti Taavitsainen |
| <p>Mikro-organismien identifiointi on tärkeä osa monien laboratorioden päivittäistä työskentelyä. Erytisen tärkeää on elintarvikealalla selvittää laadunvalvonnan puolella esimerkiksi ruokamyrkytystapauksissa taudinaiheuttaja, jotta voidaan sairastuneille saada mahdollisimman pian heidän tarvitsemaansa hoitoa. Identifiointiin on olemassa erilaisia menetelmiä ja tapoja, jotka perustuvat usein erilaisiin aineenvaihduntareaktioihin. Jyväskylän Ympäristötoimen laboratoriossa käytössä olivat työn tekemisen aikana kolme erilaista API-sarjan testiä, jotka olivat jo vuosien käytön jälkeen todettu luotettaviksi. Työn tarkoituksena oli selvittää, voisiko GEN III manuaalinen identifiointijärjestelmä korvata käytössä olevat kolme erilaista API-menetelmää. Tämän lisäksi haluttiin myös selvittää, pystyykö nopeasti tulokset antavavalla RapIDStaph-testillä saamaan luotettavia tuloksia. Tarkoituksena oli selvittää miten GEN III toimii päivittäisessä laboratoriotuotinnassa, minkälaisia tuloksia sillä saa verrattuna referenssimenetelminä toimiviin API-testeihin ja kuinka eri laboranttien toiminta vaikuttaa saatuihin tuloksiin uudella menetelmällä.</p> <p>Näytteiksi valittiin ATTC-kantoja, joiden laji oli etukäteen tiedossa, jotta voitiin selvittää GEN III:n luotettavuus lajitunnistuksessa. Tämän jälkeen lähdettiin selvittämään tuntemattomilla näytteillä tunnistusta API-testeillä sekä rinnakkain GEN III:lla sekä osittain RapIDStaph- testeillä. GEN III:n tulosten tulkintaa testattiin kolmen eri laborantin kesken, sillä tulokset ovat aistinvaraisesti tunnistettavia värireaktioita, joiden tulkinta ei aina ole kovin yksiselitteistä.</p> <p>GEN III osoittautui tulosten perusteella toimivaksi identifiointijärjestelmäksi verrattuna API-testeihin, RapIDStaph testit eivät vertailussa pärjänneet, sillä bakteeriliuos jäi näytteiden osalta liian laimeaksi, ja näin ollen tulokset eivät olleet vertailukelpoisia suurimmalta osin. GEN III tulokset olivat lupaavia, kun vertailtiin kolmen eri laborantin tulkintaa kuoppalevyjen värireaktioista, joskin automaattisella identifiointijärjestelmällä tuloksista saisi vielä luotettavimmat, sillä aistinvaraiseen tulkintaan liittyy aina omat hankaluutensa.</p> | |
| Avainsanat | mikrobien aineenvaihdunta, identifiointi, tunnistusmenetelmät |

| | |
|---|--|
| Author(s) Title Number of Pages Date | Hanna Häkkinen Bacterial identification in GEN III and comparative to reference systems 35 pages + 3 appendices 15 May 2014 |
| Degree | Bachelor of Engineering |
| Degree Programme | Bio and food technology |
| Specialisation option | Quality Control and Research and Development |
| Instructor(s) | Veli-Matti Taavitsainen, Senior Lecturer Aija Luoma, Microbiology |
| <p>Identification of micro-organisms is an important part of many laboratories' daily processes. It is particularly important for the quality control in food industry to determine in food poisoning cases, the causative agent in order in food poisoning cases to provide the sufferers with the necessary treatment as soon as possible. For identification, there are various methods and ways that are often based on a variety of metabolic reactions. During this thesis project, three types of API series tests were used in Jyväskylän environment laboratory, had after years of use, been provide to reliable. The purpose the thesis project was to find out whether the GEN III manual identification system could substitute the three different API methods. In addition, the aim was also to find out whether RapIDStaph, which is a quick test, could yield reliable results. The aim was to find out how to GEN III functions in daily laboratory activities, what kind of results it may yield compared to the reference method, API tests, and how the activities of three different laboratory technicians affect the results obtained from the new method.</p> <p>ATTC strains whose species was known in advance were selected as samples in order to find out the GEN III identification system's reliability of species identification. After that, identification of unknown samples was investigated using API tests as well as the GEN III identification system and partly also RapIDStaph tests. The result of the GEN III was tested by three different laboratory technicians because the results are sensory recognizable color reactions and the interpretation of this kind of reaction is not always simple.</p> <p>According to the results, GEN III proved to be a functional identification systems compared to the API tests. RapIDStaph tests did not succeed in the comparison as the bacterial solution was too diluted in terms of specimens therefore the results were not comparable for the most part. The GEN III results were promising when three different laboratory technicians' interpretations of the well plate color reactions were compared although in an automatic identification system, the results could still be more reliable since the sensory interpretation has its own difficulties.</p> | |
| Keywords | microbial metabolism, identification, identification systems |

Sisällys

| | | |
|-----------------|---|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| KIRJALLINEN OSA | | |
| 2 | Yleistä bakteereista | 2 |
| 2.1 | Bakteerien rakenne yleisesti | 2 |
| 2.2 | Solukalvon rakenne ja tehtävät | 3 |
| 2.3 | Soluseinän rakenne ja tehtävät | 3 |
| 2.4 | Bakteerien muodot | 5 |
| 2.5 | Bakteerien aineenvaihdunta | 5 |
| 3 | Bakteerien kasvatusta laboratoriossa | 7 |
| 3.1 | Elatusaineet | 7 |
| 3.2 | Näytteiden siirrostaminen ja kasvatusta | 8 |
| 3.3 | Puhdasviljelmät | 8 |
| 4 | Bakteerien tunnistaminen | 10 |
| 4.1 | Miksi bakteereja on tärkeää tunnistaa | 10 |
| 4.2 | Entsyymitestit | 10 |
| 4.3 | Lajintunnistusautomaatit | 11 |
| KÄYTÄNNÖN OSUUS | | |
| 5 | Menetelmät | 12 |
| 5.1 | GEN III MicroPlate – manuaalinen identifiointijärjestelmä | 12 |
| 5.1.1 | Testaus | 14 |
| 5.1.2 | Tulosten lukeminen ja tulkitseminen | 15 |
| 5.2 | APIStaph | 16 |
| 5.3 | API 20 E | 17 |
| 5.4 | RapID STAPH | 18 |
| 6 | Työn suoritus | 19 |
| 6.1 | Näytteet | 19 |
| 6.2 | Testaus | 20 |
| 7 | Tulokset | 21 |

| | | |
|-----|--|----|
| 7.1 | ATTC-kannat GEN III:lla | 21 |
| 7.2 | Menetelmien vertailu | 23 |
| 7.3 | Luennan toistettavuus eri henkilöiden kesken | 24 |
| 8 | Tulosten arviointi | 32 |
| 8.1 | ATCC-kantojen tulkinta GEN III:lla | 32 |
| 8.2 | Menetelmien vertailu | 33 |
| 8.3 | Luennan toistettavuus eri henkilöiden kesken | 34 |
| 9 | Yhteenveto | 34 |
| | Lähteet | 36 |
| | Liitteet | |
| | Liite 1. APIStaph testiliuskan tulostaulukko | |
| | Liite 2. API 20E testiliuskan tulostaulukko | |
| | Liite 3. RapIDStaph testiliuskan tulostaulukko | |

1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Jyväskylän Ympäristötoimen mikrobiologian laboratoriossa, jonka tehtäviin kuuluu kunnan asukkaiden ja yritysten ympäristösuojeluviranomaiseen tehtäväalueeseen kuuluvien näytteiden analysointi. Mikrobiologian laboratoriossa analysoidaan pääsääntöisesti elintarvike- ja vesinäytteitä.

Opinnäytetyössä oli tarkoituksena selvittää mikrobien uuden GEN III -tunnistulaitteen käytön luotettavuus ja toimivuus mikro-organismien tunnistuksessa. Referenssimenetelminä käytettiin jo toimiviksi todettuja API-sarjan menetelmiä. Työssä pyrittiin selvittämään, voitaisiinko GEN III:lla korvata jo käytössä olevat testimenetelmät ja siirtyä käyttämään tunnistuksessa ainoastaan tätä. Työssä selvitettiin myös menetelmän toistettavuutta, uusittavuutta eri henkilöiden kesken sekä kuoppalevyjen luennan toistettavuutta eri lukijoiden kesken. Tärkeänä selvityskohteena oli myös inkubointiajan vaikutus tulokseen.

Työssä käytettiin näytteinä sekä jo entuudestaan tunnettuja ATCC-kantojen näytteitä että tuntemattomia näytteitä, joille tehtiin gram-värjäyksellä ja mikroskopoinnilla suuntaa antava identifiointi ennen GEN III:lla tehtyä tunnistusta liuostyyppin valitsemista varten.

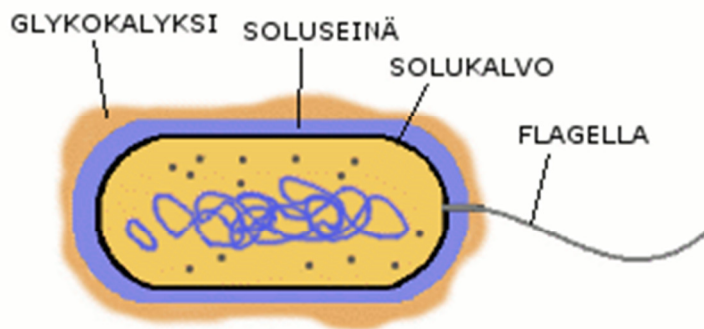
KIRJALLINEN OSA

2 Yleistä bakteereista

2.1 Bakteerien rakenne yleisesti

Bakteerit ovat prokarioottisia eli esitumallisia yksisoluisia eliöitä, joiden koko vaihtelee 0,1 – 50 µm välillä. Nämä pienet eliöt voivat olla muodoltaan joko pyöreitä (kokkeja), sylinterinmuotoisia (sauvoja) tai kiertyneitä (sprillejä). Bakteereilla ei ole lainkaan tumaa eikä juuri muitakaan soluelimiä verrattuna eukariootteihin. Prokariooteilla on joitakin hyvin erikoistuneita soluelimiä, jotka puolestaan puuttuvat eukarioottisoluilta kokonaan (kuva 1). Ensimmäinen liikkumiseen liittyvä karvatyyppi on flagella eli uintisiima. Toinen liikkumiseen liittyvä karvatyyppi on flagellaa lyhyempi proteiinikarva, joka puolestaan helpottaa bakteerien tarttumista pintoihin. Kolmas liikkumiseen liittyvä karvatyyppi on pilus, joka erikoistuneena elimenä liittyy myös bakteerien lisääntymiseen.

Prokarioottien DNA:ta ei ole tumakalvo rajaamassa, joten tätä perintötekijän sisältämää osaa kutsutaan nukleotidiksi. Solukalvo bakteereilla on kaksoiskalvo, joka muodostuu fosfolipideistä, proteiineista ja niihin liittyneistä hiihydraateista. Tällä kalvolla on monia tärkeitä tehtäviä, jotka liittyvät aineiden eritykseen ja siirtoon kalvon läpi sekä solunsisäisen pH:n ylläpitoon. Yksi tärkeimmistä solukalvon tehtävistä on kuitenkin solun hengityksestä ja energia-aineenvaihdunnasta huolehtiminen. Solun sisällä oleva liukoinen osa on solulima eli sytoplasma, jonka tehtäviin kuuluu aineenvaihduntatuotteiden kuljetus solun sisällä. Glykokalyksi on yleisnimitys bakteerisolun ulkoisille osille, jotka voivat koostua kapselista tai limakerroksesta. [1,2]



Kuva 1. Bakterisolun rakenne [5]

2.2 Solukalvon rakenne ja tehtävät

Bakterisolua ympäröi solukalvo, joka on noin 8 nm paksu. Mikäli tämä kalvo hajoaa, seurauksena on solukuolema. Kemialliselta koostumukseltaan kalvo on fosfolipidikaksoiskerros, jossa on mukana kalvon läpi ulottuvia proteiineja. Kalvo on ominaisuuksiltaan puolijähmeä, mutta kuitenkin sitkas, mikä johtuu sen fosfolipidi rakenteesta. Prokariotti- ja eukariottisolujen solukalvon rakenteen suurin ero on, että eukariottisolujen solukalvot sisältävät myös steroleja rasvahappojen lisäksi. Solukalvon tärkeimpänä tehtävänä on päästää lävitseen solulle välttämättömät ravintoaineet. Rasvaliukoiset aineet, kaasut ja vesi kulkeutuvat kalvon läpi passiivisesti, mutta vesiliukoisille aineille kalvo on kulkeutumiseste. Esimerkiksi jonisoituneet molekyylit, kuten suolat, sokerit ja aminohapot, ovat hydrofiilisiä, eivätkä läpäise kalvoa. Ravitsemukselle tärkeät aineet solukalvo kuljettaa aktiivisesti lävitseen. [1,2]

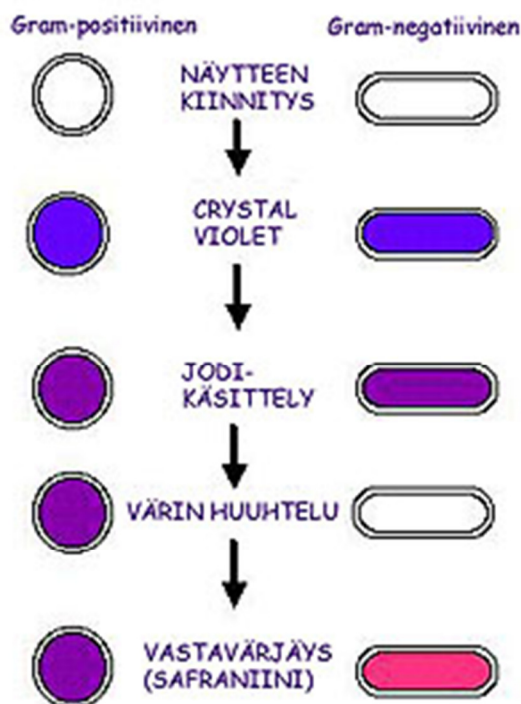
2.3 Soluseinän rakenne ja tehtävät

Prokarioteihin kuuluvilla bakteereilla on yleensä soluseinä, jonka tärkein tehtävä on pitää bakteeri koossa ja antaa sille muoto. Gram-positiivisilla bakteereilla soluseinä on paksumpi ja koostuu pääasiassa peptidoglykaanista. Gram-negatiivisten bakteerien solukalvo on rakenteeltaan ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan huomattavasti monimutkaisempi. Peptidoglykaanikerroksen yläpuolella on lipoproteiineista ja lipopolysakkarideista koostunut toinen kalvomainen kerros. Tässä ulommaisessa kalvossa on myös porineiksi kutsuttuja reikiä, jotka tehostavat aineiden kulkua solukalvon läpi. Useat bakteerit muodostavat soluseinän ulkopuolelle kapselin eli selvärajaisen limakerroksen. Tavallisesta limakerroksesta kapselin erottaa siitä, että

siitä ei tavallisen liman tavoin irtoa soluseinästä vedellä. Tämän kapselin tarkoituksena on säädellä bakteerien tarttumista pintoihin ja suojata bakteeria ulkoisilta uhilta. [2,3]

Gram-värijäys

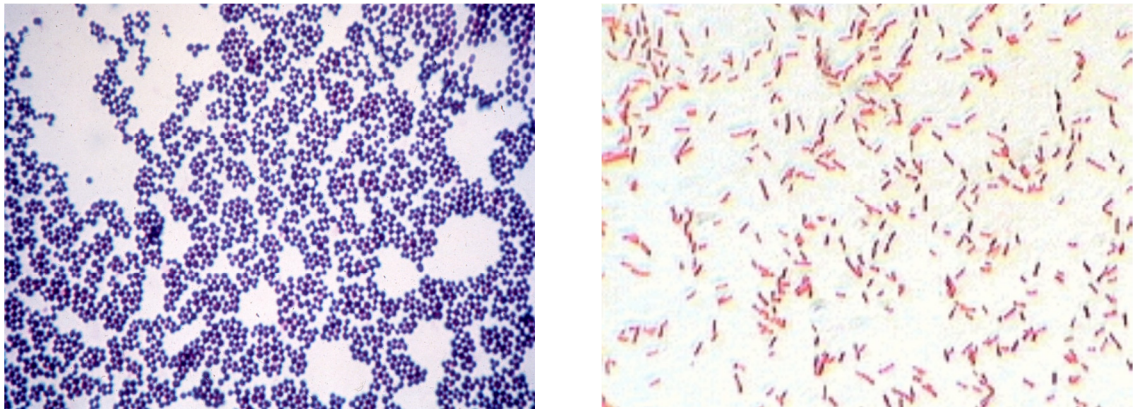
Gram-värijäys on yksi yleisimmistä bakteerivärijäyksistä, joka jakaa bakteerit kahteen ryhmään: gram-negatiivisiin ja gram-positiivisiin. Ero värjäytymisissä perustuu erilaisiin soluseinäarakenteisiin. Gram-värijäys on välttämätön testi lähdetessä identifioimaan tuntematonta bakteerinäytettä. Lasilevyille kuivattu bakteerinäyte käsitellään neljällä eri liuoksella: kristallivioletilla, jodiliuoksella, etanolilla ja safraniinilla. Gram-positiivisissa soluissa kristallivioletti-jodiyhdistelmä ei pääse vuotamaan soluista ulos, kun alkoholikäsitellyllä kutistetaan peptidoglykaanisoluseinät, jolloin gram-positiivisuus näkyy värjäyksessä tumman violetina sävynä. Gram-negatiivisissa soluissa alkoholikäsitely tekee soluista vuotavia ja väriaine pääsee valumaan ulos. Tämän takia jodikäsittelyn jälkeen tehdään vielä jälkivärijäys safraniinilla. Jälkivärijäyksen jälkeen gram-negatiiviset solut näkyvät vaaleanpunertavina soluina. [1,5]



Kuva 2. Gram-värijäyksen vaiheet ja värit gram-positiivisilla ja gram-negatiivisilla bakteereilla. [5]

2.4 Bakteerien muodot

Bakteerisolujen yleisimmät muodot ovat pallomainen kokki (*coccus*) ja sauva. Jälkimmäiset voivat olla muodoltaan lyhyitä, pitkiä tai erikokoisia, ja niitä voidaan kutsua myös basilleiksi (*bacillus*). Vibrioiksi kutsutaan pitkänomaisia soluja, jotka ovat kasvaneet yhteen tai muodostaneet rihmastoa. Spiraalinmuotoiset solut ovat nimeltään sprillejä, joita voidaan kutsua myös kierrebakteereiksi. Bakteerien ryhmyksessä on jonkin verran vaihtelua, jota käytetäänkin hyväksi tunnistettaessa bakteereja. Kokkisolut voivat olla pareittain, ryhmissä, ketjuna tai rykelminä. Näitä ryhmyksiä ei kuitenkaan tule sekoittaa bakteeripesäkkeiden muotoon, sillä bakteeripesäkkeen voi nähdä paljain silmin, mutta yksitöntä bakteeria ei ilman mikroskooppia ole mahdollista havaita.



Kuva 3. Vasemmalla gram-positiivinen kokkibakteeri, vasemmalla puolestaan gram-negatiivinen sauvamainen bakteeri.[3,4]

2.5 Bakteerien aineenvaihdunta

Aineenvaihdunnaksi eli metaboliaksi kutsutaan biokemiallisia reaktioita, joissa organismi sekä hankkii että kuluttaa energiaa. Metabolia voidaan jakaa kahteen osaan: anaboliaan ja kataboliaan. Anabolia on uusien yhdisteiden tuottamista ja katabolia puolestaan yhdisteiden hajottamista eli periaatteessa energian hankkimista. [1]

Monet mikrobit ovat ravintoaineiden suhteen varsin vaatimattomia ja pystyvät elämään hyvinkin niukkojen perusravintoaineiden avulla. Vaatimattomimmat mikrobit pystyvät elämään jopa pelkkien teollisuusjätteiden ravinteilla. Läheskään kaikki eivät tarvitse

ravinnokseen orgaanisia hiiliyhdisteitä, vaan pystyvät syntetisoimaan nämä yhdisteet ilman hiilidioksidista, johon energia saadaan auringon valosta. Jotkut mikrobit ovat puolestaan hyvin vaateliaita ravintonsa suhteen, ja niille tulee tarjota laboratoriokasvatuksessa jopa vitamiineja, jotta mikrobille turvattaisiin mahdollisimman hyvät kasvuolosuhteet.

Joidenkin mikrobien aineenvaihduntaa ja erikoisia ravintotottumuksia voidaan käyttää hyödyksi, esimerkiksi joidenkin kemianteollisuuden tuottamien ongelmajätteiden muuttamiseen vaarattomampaan muotoon. Bakteri tarvitsee energiaa hyvin samankaltaisiin asioihin kuin ihminenkin; liikkumiseen, lisääntymiseen ja muihin lukuisiin entsyymireaktioihin. Monet esimerkiksi elintarviketeollisuudessa esiintyvät bakteerit käyttävät hiilenlähteenään orgaanisia yhdisteitä, kuten glukoosia tai vaikka sitruunahappoa. [1,2]

Tärkein ravintona käytettävä hiiliyhdiste on kuusi hiiltä sisältävä monosakkaridi eli glukoosi. Solu saa tämän energian tuotantoon tarvitsemansa glukoosin joko solun ulkopuolelta osmoottisesti tai solun sisällä olevasta glykogeenistä. Glykolyysissä glukoosi muutetaan solulimassa hapettomissa olosuhteissa kahdeksi palorypälehapoksi. Tässä reaktiossa vapautuu vain vähän energiaa, ja se olisi ainoana energiantuotantomenetelmänä mahdoton. Palorypälehaposta voidaan bakteerien kohdalla reaktiota jatkaa fermentaation kautta esimerkiksi maitohapoksi, etikkahapoksi tai etanoliksi. Lopputuotteena kataboliasta muodostuu ainakin muurahaishappoa, maitohappoa ja meripihkahappoa. Esimerkiksi *Clostridium*-suvun bakteerit osaavat niin sanotun sekakäyttäytymisen: ne pystyvät tuottamaan useita erilaisia käymistuotteita. Näillä bakteereilla on metaboliareittejä muun muassa asetonin, etanolin, vedyn, voihapon, etikkahapon ja hiilidioksidin tuottamiseen. [1]

Bakteerit voidaan jakaa niiden käyttämän energian ja hiilen lähteiden mukaan joko autotrofeihin eli omavaraisiin bakteereihin tai heterotrofeihin eli toisenvaraisiin bakteereihin. Autotrofit voidaan vielä jakaa kahteen ryhmään: fototrofeihin ja kemotrofeihin. Fototrofit käyttävät hiilidioksidia hiilen lähteenä ja auringon valoa energian lähteenä. Kemotrofit puolestaan saavat energiansa epäorgaanisia yhdisteitä hapettamalla tai pelkistämällä, ja hiilen lähteenä toimii epäorgaaninen hiilidioksidi. Bakteerien monenlaiset aineenvaihduntamahdollisuudet ovat myös mahdollistaneet niiden elämän hyvin ääriolosuhteissa kuten suolajärvissä, kuumissa lähteissä ja meren syvänteissä. [1]

Osa aineenvaihduntareiteistä on hyvin tunnusomaisia tietyille bakteeriryhmille. Markkinoilla olevat bakteerientunnistuskokeet perustuvatkin pääosin juuri metaboliareitteihin. Suurinosa näistä kokeista eli niin sanotuista sokerisarjoista perustuvat sokerien metaboliareitteihin. Näissä kokeissa bakteereille tarjotaan erilaisia sokereja kuten glukoosia, laktoosia tai mannitolia. Sokerien avulla tunnistaminen perustuu lopputuotteen fermentaatioon, pH:hon tai kaasumaisten tuotteiden kerääntymiseen testialustoille. Useat markkinoilla olevat testit perustuvat kuitenkin värireaktioihin. [1]

3 Bakterien kasvatus laboratoriossa

3.1 Elatusaineet

Mikrobien kasvattaminen laboratoriossa tapahtuu elatusaineiden avulla. Kasvatus voi tapahtua nesteessä, jolloin puhutaan liemiviljelmistä, tai kiinteällä tai puolikiinteällä kasvualustalla. Kiinteät kasvualustat hydytetään agar agarilla, joka on merilevästä peräisin oleva polysakkaridi. Alustat voidaan jakaa olomuodon lisäksi myös koostumuksen perusteella kemiallisiin ja kompleksisiin alustoihin. Kemialliset alustat ovat usein kirkkaita, ja niiden tarkka kemiallinen koostumus tunnetaan. Kompleksiset alustat puolestaan ovat yleisimpiä ja osittain määrittelemättömiä. Kompleksiset alustat valmistetaan usein keittämällä, minkä jälkeen se steriloidaan eli tehdään autoklaavikäsittely ennen petrimaljoille tai koeputkille valamista, jotta saadaan mahdolliset ei-toivotut mikrobit pois kasvualustalta kuumennuskäsittelyn avulla. Joihinkin kasvatusliuoksiin voidaan vielä autoklaavikäsittelyn jälkeen lisätä erilaisia ainesosia, joiden puhtaus täytyy olla varmistettu ennen niiden lisäämistä kasvatusliuokseen. [1,2]

Elatusalustan pH on aina tarkistettava ennen sterilointia, sillä hapan kasvatusalusta steriloidaan aina neutraalina ja säädetään aseptisesti steriilillä suolaliuoksella vasta steriloinnin jälkeen. Happamuus yhdessä kuumentamisen kanssa saa osan sokereista ja polysakkarideista hajoamaan, mikä ei ole elatusaineessa toivottavaa. Myös jotkin muut reagenssit saattavat hajota kuumennuksen seurauksena, minkä takia nämä aineet lisätään elatusaineisiin vasta autoklavoinnin jälkeen. Steriloinnin jälkeen kasvualusta on noin 60–80-asteista. Tämän jälkeen elatusaine temperoidaan eli jäädytetään haluttuun lämpötilaan (yleensä noin 50 astetta), jossa liuos pysyy vielä

nestemäisenä. Elatusaineita ja kaikkia kasvatusaineen kanssa kosketuksissa olevia asioita käsitellään hyvin aseptisesti, jotta ei-toivottuja mikrobeja ei pääsisi siirtymään elatusaineeseen tai muihin näytteiden kanssa tekemisissä oleviin osiin. Petrimaljoille elatusainetta kaadetaan noin 20 ml, minkä jälkeen maljojen annetaan hyytyä rauhassa ennen siirtämistä. [1]

3.2 Näytteiden siirrostaminen ja kasvatus

Näytteiden siirrostaminen voidaan tehdä joko ennen elatusaineiden lisäämistä tai sen jälkeen. Siirrostaminen elatusaineen pinnalle tapahtuu joko pipetoimalla tai siirrostussauvan avulla. Siirrostussilmukalla siirrostetaan pääsääntöisesti kiinteitä näytteitä, joita ovat esimerkiksi suoraan bakteeripesäkkeestä otetut näytteet. Nestemäiset näytteet pääsääntöisesti pipetoidaan steriilillä pipetillä kasvatusalustan pinnalle, minkä jälkeen levitys tapahtuu lasikolmiolla tai L-muotoisella sauvalla. Tämän jälkeen siirrostetut maljat/koeputket siirretään sopivaan lämpötilaan kasvamaan. Kasvatuslämpötila riippuu kasvatettavasta näytteestä. Puhdasviljelmissä ja tiettyjä bakteereja etsittäessä näytteen ideaalinen kasvatuslämpötila on tiedossa, mutta useille bakteereille 37 astetta on sopiva lämpötila. Inkuboitumisaika riippuu myös kasvatettavasta bakteerista. Lyhimmillään pesäkkeet alkavat näkyä jo alle vuorokaudessa, mutta yleensä maljoja/koeputkia inkuboidaan vähintään vuorokauden ajan, joitakin hidaskasvuisia bakteereja jopa lähes seitsemän vuorokautta. [1]

3.3 Puhdasviljelmät

Mikrobiologiassa usein työskennellään puhdasviljelmillä eli viljelmillä, jotka sisältävät vain yhtä mikrobilajia. Tällainen viljelmä voidaan tehdä laimentamalla luonnon sekapopulaatiota niin voimakkaasti, että yksittäisten solujen jälkeläiset ovat selvästi erillään toisistaan. Laimentaminen voidaan tehdä joko laimennussarjalla tai harvennusviljelyllä. Nesteellä laimennettaessa alkuperäiseen näytteeseen lisätään useassa vaiheessa steriiliä isotonista vettä. Nämä laimennossarjat ovat kymmenen potensseissa, eli esimerkiksi 10^{-2} , 10^{-3} ja niin edelleen. Puhdasviljelmän tekemistä varten näytettä laimennetaan niin, että 0,1 millilitrassa näytettä kasvaa todennäköisesti vain yhtä lajia. Tämä voi yleensä vaatia laimennuskertoimeksi 10^6 - 10^8 laimennoksia. [1,2]

Laimennuksen jälkeen näytteestä tehdään viljelmä joko maljaamalla tai pintalevitystekniikalla. Maljaamisessa näyte sekoitetaan suoraan elatusaineeseen, jolloin saadaan malja, jossa bakteeripesäkkeet jäävät osittain elatusaineen sisään. Pintalevityksessä näyte puolestaan pipetoidaan ja levitetään elatusaineen pinnalle. Bakteerit, jotka tarvitsevat kasvaakseen ehdottomasti happea, viljellään mieluummin pintalevitysmenetelmällä. Kolmas ja yleisin tapa saada aikaiseksi puhtasviljelmä on niin sanottu harvennusviljely eli puhtaaksi vetäminen. Tässä menetelmässä näytteen ei välttämättä tarvitse olla suspensio, vaan puhdistaminen voidaan aloittaa esimerkiksi pesäkkeestä. Tällainen viljely tehdään siirrostussilmukalla, ja tavoitteena on, että viimeisten harvennusvetojen viimeisessä osuudessa pesäkkeet ovat selkeästi erossa toisistaan. [1,2]

Tietyllä elatusaineella muodostuvan pesäkkeen ulkonäkö on tärkeä tuntomerkki, jota käytetään hyväksi bakteerin tunnistuksessa. Laboratoriossa asiakasnäytteiden värjäykset ja aineenvaihdunnalliset testit tehdään vasta näytteen puhtaaksiviljelyn jälkeen. Hyvin onnistuneessa puhtasviljelmässä kaikki maljalla olevat bakteerit ovat identtisiä keskenään, sillä jokainen pesäke on peräisin saman lajin yksilöstä. Puhtasviljelmiä voidaan käyttää hyödyksi asiakasnäytteiden vertailumalleina sekä elatusaineiden että biokemiallisten testien toimivuuden laatuksentarkoituksina. [1,2]

Kontaminaatioksi kutsutaan vahingossa elatusaineisiin tai näytteisiin joutuneita ei-toivottuja mikrobeja. Tällainen kontaminoituminen on merkki puutteellisesta aseptiikasta näytteiden käsittelyssä. Yleensä kontaminaatio on peräisin työympäristöstä eli välineistä tai muista näytteiden kanssa kosketuksissa olevista asioista. Kontaminaatiota voi tapahtua myös niin sanottuna ristikontaminaationa, jolla tarkoitetaan puhtasviljelmässä olleen mikrobin ilmestymistä väärälle maljalle. Ristikontaminaation yleisin syy on samassa inkubaattorissa kasvatettavien eri puhtasviljelmien lähekkäisyys. Muita tyypillisiä kontaminaatioita ovat ilma, välineet sekä viljelijän kädet, nenä ja nielu. Kontaminaatioiden riskiä voidaan merkittävästi vähentää työskentellessä laminaarivirtauskaapissa, jossa on mahdollista välttää ilmaperäinen kontaminaatio. [1,2]

4 Bakterien tunnistaminen

4.1 Miksi bakteereja on tärkeää tunnistaa?

Mikrobien tunnistamisessa ja luokittelussa etsitään, mihin sukuun, lajiin ja kantaan tutkittava näyte kuuluu. Näistä määryksistä tärkein on laji, sillä se on eliökunnan perusyksikkö. Lajin tunnistaminen tehdään biokemiallisten testien, mikroskooppisen rakenteen, perimäaineksen ja sukulaisuuden pohjalta. Määrykset pystytään usein tekemään hyvin onnistuneesti sukutasolle saakka, mutta lajeja ja varsinkin eri kantoja löytyy kokoajan lisää. Lajien tunnistaminen bakteeripopulaatiosta on hyvin tärkeää esimerkiksi monissa elintarviketeollisuuden, rikostutkimuksen, eläintautiendiagnostiikan ja ympäristötutkimuksen sovelluksissa. Lajin tarkka tunnistaminen esimerkiksi ruokamyrkytys- tai muissa sairaustapauksissa on elinarvoisen tärkeää oikean hoidon aloittamisen kannalta.

4.2 Entsyymitestit

Vieraan lajin tunnistuksessa edetään usein tietyssä järjestyksessä ja halutaan selvittää näytteen ominaisuuksia tietyssä järjestyksessä. Yleisesti ensimmäisenä määryksenä tehdään gram-värijäys ja mikroskooppinen tutkimus. Tämän jälkeen tehdään bakteerin aineenvaihduntaan liittyviä kokeita, joista tyypillisiä kohteita ovat entsyymit. Yleisimmät entsyymitestit ovat katalaasi- ja oksidaasitestit, joilla selvitetään, onko bakteereilla katalaasi- tai oksidaasi-entsyymiä. [1]

Katalaasitestillä tutkitaan, onko bakteerissa katalaasi-entsyymi. Tämän entsyymin tarkoituksena on suojata bakteeria hapen radikaalien vaikutuksilta. Anaeroobeilla bakteereilla ei yleisesti ole happiradikaaleilta suojaavia entsyymejä, eivätkä ne voi sietää happea ja ovat katalaasinegatiivisia. Aerobiset ja fakultatiiviset anaerobit sisältävät entsyymiä, joka nopeuttaa superoksidin hajoamista hapeksi ja vetyperoksidiksi, joten katalaasiaktiivisuus voidaan todeta lisäämällä 2-prosenttista vetyperoksidia vuorokauden vanhaan bakteerikasvustoon. Katalaasiaktiivisuus näkyy vetyperoksidin kuplimisena. Tämä testi on varsin käyttökelpoinen, kun halutaan selvittää ulkonäöltään samanlaisten bakteerinäytteiden lajit. [1,2]

Oksidaasientsyymi puolestaan on tärkeä osa elektroninsiirtoketjussa aerobisessa hengityksessä. Bakteerien kyky tuottaa sytokromioksidaasia voidaan testata lisäämällä oksidaasitestireagenssia maljalla olevien bakteeripesäkkeiden päälle tai poimimalla pesäke kostutettuun suodatinpaperiin. Jälkimmäinen on kuitenkin suositeltavampi menetelmä, sillä näin maljan muut pesäkkeet voidaan käyttää tarvittaessa muiden testien tekemiseen. Oksidaasitesti voidaan tehdä myös kertakäyttöisellä testillä, jossa haalean vaapeanpunainen tai väritön oksidaasireagenssi muuttuu purppuran väriseksi tai violetiksi reaktion ollessa positiivinen. [1]

4.3 Lajintunnistusautomaatit

Mikrobien tunnistuksessa voidaan fysiologisten testin lisäksi käyttää hyödyksi immunologisia menetelmiä, tartutuskokeita, viruksia tai mikrobin genetiikkaa. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) -testaus perustuu vasta-ainetunnistukseen, eli esimerkiksi *Salmonella*, *Listeria* ja *E. coli* O157:n bakteereille on kehitetty monoklonaalisiin vasta-aineisiin perustuvat testit. Tartuntakokeissa tutkittava mikrobi puolestaan istutetaan koe-eläimeen, ja lajin tunnistaminen tapahtuu koe-eläimen oireiden perusteella. Mikrobiologiset menetelmät ovat kuitenkin yleistyneet lajintunnistuksessa jatkuvasti. Useimmat mikrobiologisista menetelmistä hyödyntävät perimäaineksen sekvensointia eli nukleotidijärjestyksen selvittämistä ja PCR (polymeraasiketjureaktio) testausta. Bakteerinäytteiden viljely on edelleen perinteisin tapa tunnistaa bakteerilajeja. Kaikkia lajeja ei kuitenkaan osata viljellä, tai tulos tulee saada valmiiksi niin nopeasti, että viljelyyn ei ole aikaa. Viljelymuotoinen tunnistaminen on ollut käytössä jo vuosisadan, mutta kokoajan kehitellään uusia mikrobiologiaan tukeutuvia tunnistusmenetelmiä. Lajintunnistusautomaattien toiminta perustuu yleisimmin mikrobien aineenvaihduntareaktioihin ja biokemiallisten ominaisuuksien avulla mikrobien perimäaineksen tutkimiseen. Aineenvaihduntakokeista yleisimpiä ovat ns. sokerikokeet, joissa testataan bakteerin kykyä käyttää erilaisia sokereita hyväkseen. Tällaisia testejä ovat mm. APIStaph, API 20E ja RapIDStaph. Markkinoilta löytyy myös erilaisia kemikaaliherkkyyksiä ja hiililähteiden käyttöä testaavia testejä, joista esimerkkinä on GEN III, johon työssä oli tarkoituksena perehtyä. [1]

KÄYTÄNNÖN OSUUS

5 Menetelmät

Tutkimusmenetelmänä käytetään GEN III manuaalista identifiointimenetelmää, josta saatuja tuloksia verrataan seuraavien referenssimenetelmien tuloksiin: APISatph, API 20 E ja RapidIDStaph. GEN III on menetelmänä laboratoriossa uusi, joten puhtasviljelmä näytteet analysoidaan myös jollakin kolmesta käytössä olevasta referenssimenetelmästä.

5.1 GEN III MicroPlate – manuaalinen identifiointijärjestelmä

Biolog GEN III Microplate TM on standardoitu menetelmä, joka tunnistaa suuren määrän sekä gram-negatiivisia että gram-positiivisia bakteereja. Tunnistus tapahtuu 94 biokemiallisen testin avulla, jotka tulkitaan niissä tapahtuvien värireaktioiden perusteella. 94-kuoppaisen kuoppalevyn aineenvaihduntareaktioiden värikuvio syötetään tunnistusohjelmaan, joka aineenvaihduntakuvion perusteella antaa saadun lajin ja sen tunnistustodennäköisyyden prosenttilukuna. [7]

GEN III -menetelmässä kuoppalevyjen kuopissa on 94 mikro-organismien fenotyypin analysoivaa testiä: 71 hiililähteen käyttöä selvittävää analyysia ja 23 kemikaaliherkkyyksianalyysia (kuva 4). Kuoppalevyille muodostuu niin sanottu fenotyyppinen sormenjälki, jonka avulla mikro-organismien laji voidaan tunnistaa. Kuoppalevyssä on 94 kuopan lisäksi kaksi kontrollikuoppaa: negatiivinen ja positiivinen. Jokaisessa kuopassa on ravintoaineiden lisäksi tetratsoliumsuolaa, joka pelkistyy violetiksi bakteerien aineenvaihduntareaktioiden seurauksena. Näin voidaan osoittaa värireaktion avulla bakteerin hiililähteen käyttö ja vastustuskyky kasvua estäville kemikaaleille. Violetti väri kuopissa tarkoittaa positiivista reaktiota ja kirkas puolestaan negatiivista. [7,8]

| HIILILÄHTEIDEN SELVITYS | | | | | | | | | KEMIKAALIHERKKYYS | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| A1 Negatiivinen kontrolli | A2 Dekstriini | A3 D-maltoosi | A4 D-trehaloosi | A5 D-sellobioosi | A6 Gentio- bioosi | A7 Sakkaroosi | A8 D- turanoosi | A9 Stakyoosi | A10 Positiivinen kontrolli | A11 pH 6 | A12 pH 5 |
| B1 D- raffinoosi | B2 αD- laktoosi | B3 D- melibioosi | B4 β metyyli-D- glukosidi | B5 D-salisini | B6 N-asetyyli- glukosamiini | B7 N-ase- tyyli β-D-man- nosamiini | B8 N-asetyyli-D- galaktosamiini | B9 N-asetyylineu- ramiinihappo | B10 1% NaCl | B11 4% NaCl | B12 8% NaCl |
| C1 α-D-glukoosi | C2 D-man- noosi | C3 D-fuktoosi | C4 D-galaktosii | C5 3-metyyli- glukoosi | C6 D-fruktoosi | C7 L-fruktoosi | C8 L-ramnoosi | C9 Inosiini | C10 1% natrium- laktaatti | C11 Fusidini- happo | C12 D-seriini |
| D1 D-sorbitoli | D2 D-mannitoli | D3 D-arbitoli | D4 Myoinositoli | D5 Glyseroli | D6 D-glukoosi- 6-PO4 | D7 D-fruktoosi- 6-PO4 | D8 D-aspargiini- happo | D9 D-seriini | D10 Troleando- mysiini | D11 Rifamysiini SV | D12 Mnosykliini |
| E1 Gelatiini | E2 glysiini-L- proliini | E3 L-alaniini | E4 L-argiini | E5 L-aspargiini- happo | E6 L-glutamiini- happo | E7 L-histidiini | E8 L-pyrogluta- miinihappo | E9 L-seriini | E10 Linko- mysiini | E11 Guanidiini HCl | E12 Naproof 4 |
| F1 Pektiini | F2 D-galakturoni- happo | F3 L-galaktonihap- on laktoni | F4 D-glukoni- happo | F5 D-glukuroni- happo | F6 Glukuroni- amidi | F7 Galaktaari- happo | F8 Kiinihappo | F9 D-sokeri- happo | F10 Vanko- mysiini | F11 Tetrasolium violetti | F12 Tetrasolium sininen |
| G1 p-hyd- roksifenyyli- etikahappo | G2 Metyyli- pyruvaatti | G3 D-maitohapon metyylesteri | G4 L-maitohappo | G5 Sitruuna- happo | G6 α-ketoglutaari- happo | G7 D-omena- happo | G8 L-omena- happo | G9 Bromosukliini- happo | G10 Nalidksiini- happo | G11 Litiumkloridi | G12 Kalium- telluriitti |
| H1 Tw een 40 | H2 Y-amino- voihappo | H3 α-hydroksi- voihappo | H4 β-hydroksi-D- L-voihappo | H5 α-ketoosi- voihappo | H6 Aseto- etikahappo | H7 Propioni- happo | H8 Etikka- happo | H9 Muurahais- happo | H10 Astreonaami | H11 Natrium- butyraatti | H12 Natrium- bromaatti |

Kuva 4. Analyysikuoppien järjestys kuoppalevyllä

Menetelmällä voidaan tunnistaa aerobisia gram-negatiivisia ja gram-positiivisia bakteerilajeja, anaerobeille menetelmä ei sovellu. Tietokannassa on 564 gram-negatiivista bakteerilajia tai ryhmää sekä 480 gram-positiivista bakteerilajia, joihin saatua aineenvaihduntakuviota verrataan tunnistuksessa. GEN III:lla voidaan tutkia

- gram-positiivisia sauvoja/kokkeja
- gram-negatiivisia sauvoja/kokkeja
- ympäristössä esiintyviä mikro-organismeja
- patogeenisia mikro-organismeja.

Menetelmä ei kuitenkaan sovi anaerobisten bakteerien, hiivojen tai homeiden tunnistukseen. GEN III sisältää neljä eri menetelmää (taulukko 1.), jotka on tarkoitettu ominaisuuksiltaan erilaisten mikro-organismien tunnistukseen. Menetelmien vaiheet ovat keskenään identtiset, mutta käytettävä siirrostusliuos ja ympin solutiheys poikkeavat toisistaan. Taulukossa 1 on tarkemmin kuvattuna kaikki neljä eri menetelmää ja näiden käytössä olevat siirrostusliuokset (kohta IF). Solutiheys mitataan turbidimetrillä, joka antaa tuloksen prosentteina. Menetelmä valitaan testattavalle näytteelle tehtävän gram-värjäyksen ja mikroskopoinnin perusteella, josta selviää, millä menetelmällä näytettä kannattaa lähteä tutkimaan. [7]

Taulukko 1. Neljä eri testimenetelmää, niiden siirrostusliuokset, solutiheysalueet sekä suuntaa antavat tiedot millä testimenetelmällä näytettä kannattaa lähteä tutkimaan esitutkimuksen perusteella.

| Menetelmä | IF | Solutiheys | Suku |
|-----------|----|------------|--|
| A | A | 90-98%T | Lähes kaikki - oletusmenetelmä |
| B | B | 90-98%T | Voimakkaasti pelkistävät ja kapselia tuottavat gram-negatiiviset (esim. <i>Aeromonas</i> - ja <i>Vibrio</i> -suvun bakteerit) ja gram-positiiviset (esim. useat <i>Bacillus</i> -suvun bakteerit) |
| C1 | C | 90-98%T | Mikroaerofiiliset, kapnofiiliset gram-positiiviset (esim. <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> - ja <i>Weisella</i> -bakteerit sekä eräät <i>Corynebacterium</i> - ja <i>Enterococcus sp.</i> -sukujen bakteerit) |
| C2 | C | 62-68%T | Kasvuolosuhteiltaan vaativat kapnofiiliset ja happiherkät gram-negatiiviset ja gram-positiiviset bakteerit |

5.1.1 Testaus

GEN III -menetelmällä testaus aloitetaan puhdasviljelmien kasvatuksella, eli halutulta näytteeltä eristetään näytettä kasvatusalustalle (veriagar tai TSA/TSA+B) ja näytettä inkuboidaan näytteen esimäärityksistä riippuen 33 – 37 °C:ssa 4 – 48 tuntia; yleisimmin 24 tuntia on sopiva aika. Solujen on oltava vasta kasvatettuja, sillä monet kannat menettävät elinvoimansa ja niiden aineenvaihdunta heikkenee ajan myötä. Puhdasviljelmän kasvatuksen jälkeen valmistetaan ymppe varsinaista testausta varten, jossa käytetään huoneenlämpöisiä siirrostusliuoksia (IF-A, IF-B ja IF-C) ja kuoppalevyjä.

Siirrostusliuokset ovat laitteenvalmistajan omia siirrostukseen tarkoitettuja liuoksia, joiden tarkempaa koostumusta ei ole mahdollista selvittää. Ympin tulee olla vahvuudeltaan tietyllä alueella, joka mitataan sameutena turbidimetrillä, joka antaa tuloksen läpäisyprosenttina. Turbidimetri on laite, jolla mitataan aineen sameutta eli läpäisevyyttä. Tuloksen ollessa 100% on näyte täysin kirkas ja mitä pienempi luku saadaan, sen sameampi näyte on. Näytteiden tulee olla sameudeltaan alueella 90 - 98 %. Jokaiselle siirrostusputkelle tehdään turbidimetrillä niin sanottu. nollakoe ennen bakteerin siirrostusta, sillä putket eivät ole optisesti samankaltaisia keskenään.

Ymppe valmistetaan ottamalla solukasvustoa kasvatusalustalta ja siirrostamalla se siirrostusliuokseen siirrostustikulla, minkä jälkeen turbidimetrillä mitataan näytteen

sameus. Valmistettu solususpensio eli ympäri kaadetaan sekoituksen jälkeen steriiliin nestealustaan, josta otetaan 1200 µl 8-kanavaiseen pipettiin kuoppalevyille pipetoimista varten. Kuoppalevyn jokaiseen kuoppaan pipetoidaan 100 µl näytettä. Pipetoimisen jälkeen kuoppalevyn päälle asetetaan kansi ja levy laitetaan inkuboitumaan mikrobille soveltuvaan lämpötilaan 3 – 36 tunnin ajaksi. Väriin muodostus levyllä alkaa noin kolmen tunnin kuluessa. Inkuboinnin aikana tulee seurata erityisesti negatiivista kontrollia, jonka tulisi pysyä värittömänä. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyn värireaktiot luetaan ja syötetään tulokset ohjelmaan, joka antaa saadun värikuvion perusteella tuloksen. [7]

5.1.2 Tulosten lukeminen ja tulkitseminen

Kuoppalevyjen inkuboinnin jälkeen levyistä saatu värikuvio syötetään tunnistusohjelmaan, joka antaa tuloksen saadun kuvion perusteella. Sarakkeiden 1–9 väriä verrataan negatiiviseen kontrolliin. Kaikki kuopat, jotka näyttävät samalta kuin negatiivinen kontrolli, merkitään negatiiviseksi. Kaikki kuopat, jotka ovat väriltään selvästi punavioletteja, merkitään positiivisiksi. Näiden lisäksi haalean punaviolettia kuopat merkitään rajatapauksiksi, eli raportoidaan kohdalla ”borderline”. Kuoppalevyjen värireaktioiden lukeminen tapahtuu aistinvaraisesti, eli lukija itse tulkitsee onko reaktio negatiivinen, positiivinen vai borderline-reaktio. Useimmat lajit aiheuttavat positiivisesti reagoidessaan selvästi erottuvan tumman punaviolettia värin, mutta joidenkin lajien kohdalla positiivinen reaktio voi olla hyvinkin vaalea ja vain heikosti erottuva punavioletti sävy.

Kemikaaliherkkyyttä testaavien sarakkeiden 10–12 kuoppia verrataan puolestaan positiiviseen kontrolliin. Kaikki kuopat, jotka ovat väriltään puolet positiivisen kontrollin punaisenviolettia sävystä, arvioidaan kasvultaan negatiiviseksi. Näissä kuopissa mikrobi on erittäin herkkä kasvua ehkäisevälle kemikaalille. Reaktiot voivat väriltään olla joko punaisenvioletteja tai hieman siniseen meneviä. Tummuudeltaan positiivisen kontrollin kaltaiset kuopat tulkitaan positiivisiksi, hieman haaleammat ovat tässä tapauksessa rajatapauksia. Laite ilmoittaa tuloksen identifiointiprosenttina, jotka tulkitaan seuraavanlaisesti:

- PROB ≥ 99,9 % tunnistus erinomainen
- PROB ≥ 99,0 % tunnistus erittäin hyvä

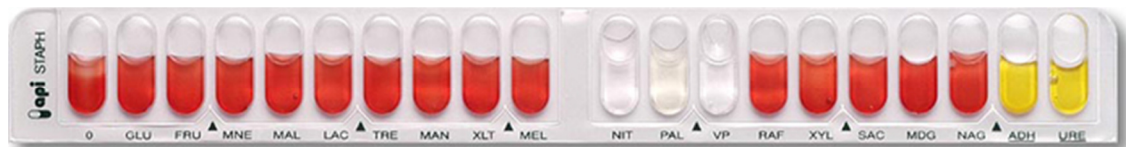
- $PROB \geq 90,0\%$ tunnistus hyvä
- $PROB \geq 80,0\%$ tunnistus tyydyttävä

Käytännössä yli 90% tunnistusta voidaan pitää jokseenkin luotettavana. Alle 90 % tunnistusta voidaan pitää vain suuntaa-antavana tuloksena [7].

5.2 APIStaph

APIStaph on standardoitu menetelmä, jonka tarkoituksena on tunnistaa *Staphylococcus*-, *Micrococcus*- ja *Kocuria*-sukujen bakteereja. Testi käyttää tunnistamiseen pienoiskoossa biokemiallisia testejä. Ennen testaamista näytteille on tehtävä gram-värjäys, mikroskopointi sekä katalaasi/oksidasi-testi, jotta voidaan olla varmoja, että menetelmä on sopiva testattavalle näytteelle. APIStaph-testi sisältää 20 erilaista biokemiallista testiä, jotka perustuvat lähinnä mikrobion aineenvaihduntareaktioihin. Testillä testataan erilaisten sokerien käyttöä energian lähteenä. Menetelmällä pystytään tunnistamaan gram-positiivisiä kokkibakteereja, joista tärkeimmät ovat 20 erilaista *Staphylococcus*-suvun lajia. Testattavien näytteiden tulee olla puhdasviljelmänäytteitä, jotka on viljelty mahdollisuuksien mukaan yleensä veri-agar-elatusaineella. Tunnistus tapahtuu värireaktioiden perusteella, joista saadaan ns. tunnistuskoodi, jolla tietokannasta lukemalla saadaan tulos näytteelle. [9]

APIStaph-testiliuskoilla testaaminen aloitetaan inkubointirasian kostutuksella, joka tapahtuu pipetoimalla 5 millilitraa tislattua vettä rasian pohjalle. Virallinen testiliuska asetetaan tämän päälle. Puhdasviljelmästä valmistetun solususpension tulee olla vahvuudeltaan noin 0,5 McFarlandia, ja se tulee olla kunnolla sekoitettu, jotta liuos on varmasti tasavahvuinen. Solususpensio pipetoidaan näytekuoppiin ja varotaan samalla jättämästä ilmakeuoppia näytekuoppiin, jotka saattavat aiheuttaa muutoksia tuloksissa. Kuopat ADH ja URE (kuva 5) päällystetään vielä mineraaliöljyllä, sillä reaktiot ovat happiherkkiä. Testiliuskoja inkuboidaan noin 36–37 asteessa noin vuorokauden ajan. Inkubointiajan jälkeen jälkeä kuoppiin VP, NIT ja PAL lisätään näille sopivat reagenssit ja annetaan niiden vaikuttaa ennen tulosten lukemista. Positiiviset ja negatiiviset reaktiot kirjataan tulostaulukkoon (LIITE 1), josta saadun numerosarjan avulla saadaan tietokannasta lajille nimi.[9]



Kuva 5. APIStaph-testiliuska, jossa näyte on jo pipetoitu testikuoppiin. [10]

5.3 API 20 E

API 20 E on puolestaan testimenetelmä enterobakteereille ja muille oksidaasinegatiivisille gram-negatiivisille sauvoille. Testi käyttää tunnistamiseen biokemiallisia aineenvaihduntareaktioita. Näytteiden tulee olla puhtasviljelmänäytteitä ja testi edellyttää myös etukäteen tehdyn oksidaasinegatiivisen tuloksen. Testi käyttää tunnistamiseen APIStaph-menetelmän tavoin 20 biokemiallista testiä, jotka perustuvat entstymaattisiin reaktioihin, substraattien hyväksikäyttöön, kemiallisten yhdisteiden tuottoon ja fermentaatioon. Tunnistus tapahtuu värireaktioiden perusteella, mistä saadaan tunnistuskoodi näytteelle. Tulos saadaan koodin avulla tietokannasta tarkistamalla. Testiliuskassa on sokeritestien lisäksi esimerkiksi nitraatti- ja nitriittitestejä, joiden avulla tunnistus tapahtuu. [11]

Testaaminen aloitetaan kastelemalla inkubointirasia viidellä millilitralla tislattua vettä. Valmistettu solususpensio voidaan tehdä API20E-testin mukana tulleisiin laimennosliuoksiin tai valmistaa itse. Puhtasviljelmästä valmistettu solususpensio pipetoidaan ilmakuplia välttämällä testikuoppiin. Kuoppien ADH, LDC, H₂S ja URE (kuva 6) päälle laitetaan mineraaliöljyä, sillä reaktiot ovat anaerobisia. Inkubointi tapahtuu 37 asteessa noin vuorokauden ajan. Inkuboinnin jälkeen testiliuskasta tarkistetaan positiiviset reaktiot. Jos niitä on enemmän kuin kolme jo tässä vaiheessa, kirjataan ne ylös. Tämän jälkeen tehdään testit, jotka tarvitsevat tuloksia varten muita reagensseja. Kuoppiin TDA, IND ja VP (kuva 6) lisätään näille varatut reagenssit, ja tulokset luetaan vasta vaikutusajan jälkeen. Tulosten lukeminen tapahtuu tässäkin tapauksessa aistinvaraisesti, eli lukija tulkitsee värireaktiot ohjeiden mukaisesti. Tämän jälkeen saadut positiiviset reaktiot kirjataan ylös tulostaulukkoon (LIITE 2) ja saadun numerokoodin avulla tarkistetaan tietokannasta saatu laji. [11]



Kuva 6. API 20 E-testiliuska inkubointiajan jälkeen. [12]

5.4 RapID STAPH

Remelin RapIDStaph Plus System on testimenetelmä, jolla pystytään APIStaph menetelmän tavoin tunnistamaan *Staphylococcus*-suvun bakteereja ja muita gram-positiivisia kokkibakteereja sekä katalaasinegatiivisia bakteereja erilaisten biokemiallisten reaktioiden perusteella. Menetelmä on niin sanottu pikatesti, jonka tulokset ovat yleensä valmiita noin neljässä tunnissa. RapIDStaph-testin tunnistaminen perustuu *Staphylococcus*-sukuisten bakteerien sokerien, nitraattien ja erilaisten reagenssien käyttöön aineenvaihdunnassa. Testi sisältää 18 reaktiokuoppaa, joista 12 on erilaisia sokeri- testejä ja loput testit ovat testimenetelmän omien reagenssien testejä sekä kahden erilaisen nitraatin testaavia testejä. Tulokset saadaan tässäkin menetelmässä värireaktioiden avulla. Jokaiselle reaktiokuopalle ja värireaktiolle on oma tietty väri negatiivisesta ja positiivisesta reaktiosta. Lopulta saadaan koodi, jonka avulla tietokannasta saadaan tulos. [13]

Tässäkin menetelmässä testaamiseen käytettävät solususpensiot tulee valmistaa puhtasviljelmänäytteistä, joten näytteessä käytettävä bakteeriviljelmä ei saa olla yli 72 tuntia vanha. Solususpension valmistamiseen käytetään testin mukana tulevaa laimennusliuosta. Näytteen tulee olla vahvuudeltaan noin kolme McFarlandia, jotta värireaktiot saadaan tapahtumaan alle neljässä tunnissa. McFarland on silmämääräisesti arvioitava näytteen vahvuus, jossa kolme McFarlandia vastaa vahvuudeltaan liuosta, jossa on noin 9×10^8 bakteerisolua/ml. Laimennosliuosta on kaksi millilitraa, ja se kaadetaan ilmakuplia välttämällä kokonaan testikaukalo, josta se kallistamalla liuskaa tasaisesti saadaan valumaan testikuoppiin. Testiliuskaa inkuboidaan 35–37 asteessa vähintään neljä tuntia, mutta kuitenkin enintään vain kuusi tuntia. Tämän jälkeen liuskalta luetaan aistinvaraisesti positiiviset reaktiot ohjeiden mukaisesti ja kirjataan ne tulostaulukkoon (LIITE 3). Tulos saadaan saadun numerosarjan perusteella tietokannasta selvittämällä. [13]



Kuva 7. RapIDStaph testiliuska [14]

6 Työn suoritus

6.1 Näytteet

ATCC-kannan näytteistä valittiin näytteiksi sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia (Taulukko 1.). Ensimmäiset testaukset tehtiinkin näillä kannoilla, jotta voitiin varmistaa, että GEN III antaa varmasti luotettavia tuloksia. Varsinaisista analysoitavista tuntemattomista näytteistä, joiden laji ei ollut etukäteen tiedossa, keskityttiin pääasiassa gram-positiivisiin kokkibakteereihin. Mukaan valittiin myös kokeilumielessä muutamia kiinnostavia ja ennakkoon epäselviä näytteitä, joista osa tehtiin ainoastaan yhden laborantin lukemana ja analysoitiin ainoastaan GEN III:lla. Muutama näytteistä vastasi mikroskopoinnin ja gram-värijäyksen jälkeen selvästi *bacillus*-sukuisilta bakteereilta, jonka takia näytteet valittiin mukaan. Näytteiden numeroyhdistelmät ovat laboratorion oman tietojärjestelmän näyttenumeroita, joiden perusteella tulokset kirjataan tietokantaan ja niiden perusteella tuloksia voidaan myöhemmin myös etsiä.

Taulukko 1. Näytteeksi valitut ATCC-kannat

| | | |
|------------|---------------------------------|--------|
| ATCC 25922 | <i>Escherichia coli</i> | gram - |
| ATCC 10876 | <i>Bacillus cereus</i> | gram + |
| ATCC 25932 | <i>Staphylococcus aureus</i> | gram + |
| ATCC 27853 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | gram - |
| ATCC 9927 | <i>Streptococcus uberis</i> | gram + |
| ATCC 13525 | <i>Pseudomonas fluorescenes</i> | gram + |
| ATCC 7644 | <i>Listeria monocytogenes</i> | gram + |
| NTCT 6013 | <i>Salmonella abony</i> | gram - |
| ATCC 29212 | <i>Enterococcus faecalis</i> | gram + |
| ATCC 35657 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | gam - |

6.2 Testaus

Ensimmäiset testaukset tehtiin ATCC-kannoilla, joiden lajit olivat jo etukäteen tiedossa. Näytteet kasvatettiin veri-agarilla ja tuoreista kannoista tehtiin tunnistus GEN III:lla. ATCC-kantojen työ toteutettiin yhden laborantin toimesta puhtasviljelmien kasvatuksesta tulosten lukemiseen saakka. Vasta kun ATCC-kannoista saatiin suuntaa-antavat tulokset, siirryttiin testaamaan näytteitä, joiden laji ei ollut etukäteen tiedossa. Tuntemattomille näytteille tehtiin gram-värijäys, mikroskopiointi ja tarvittaessa katalaasi/oksideasi testi ennen GEN III -analyysin tekemistä, jotta voitiin selvittää, mitä referenssimenetelmää näytteelle käytetään. Näytteiden testaukset suoritettiin työohjeiden mukaisesti. GEN III:lla analysoitaessa näytteitä tarkasteltiin inkubointiajan vaikutusta näytteiden lukemiseen ja kuoppalevyjen värjäytymiseen. Lähinnä tarkoituksena oli selvittää erilaisten näytteiden kasvatusta ja menetelmän toimivuutta työskenneltäessä virka-aikana laboratorion työpäivien rajoissa.

7 Tulokset

7.1 ATTC-kannat GEN III:lla

ATTC-kantojen testauksen lähtökohtana oli varmistaa, että laitteella saataisi varmasti ennakkoon tiedossa oleva bakteerilaji. Kuitenkin jo ensimmäisten testausten kohdalla huomattiin, että tulokset eivät olleet aivan toivotunlaisia. *E. coli* (ID 99,3 %) ja *Staphylococcus aureus* (ID 99,6%) -näytteet antoivat GEN III:lla heti ensimmäisellä testauskerralla oikeat tulokset (taulukko 2.). Useimmille näytteille ei kuitenkaan ensimmäisellä yrittämällä saatu vielä tulosta. Kaikkia näytteitä lähdettiin analysoimaan työohjeen mukaisesti liuoksella A, jonka seurauksena esimerkiksi *Bacillus cereus* ei luonnollisesti antanut tulosta, mutta uusinta testi tehtiin liuoksella B ja tulokseksi saatiin *Bacillus cereus*, vaikkakin tunnistusprosentti olikin vain tyydyttävä 82,3 %. *Salmonella abony* näyte antoi tulokseksi *Salmonella enterica*, joka on kelvollinen tulos, sillä *Salmonella abony* on laboratorion oma kanta, jota ei virallisissa ATCC-kannoissa ole lainkaan mukana.

Taulukoissa esiintyvät lyhenteet:

- PROB (probability) = todennäköisyys eli identifiointi prosentti
- SIM (similarity) = samanlaisuus eli 1 tarkoittaa 100%:sta sopivuutta ja 0 tarkoittaa yhteensopimattomuutta
- DIST (distance) = etäisyys eli mitä suurempi luku sen kauempana ollaan yhteensopivasta tuloksesta annetun tuloksen ja näytteen välillä

Taulukko 2. ATCC-kantojen tulokset GEN III:lla tehtynä. Osa näytteistä analysoitiin useampaan kertaan eri GEN III menetelmällä.

| ATCC | | | | | | |
|---------------|----------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| | Näyte | Species | PROB | SIM | DIST | Menetelmä |
| ATCC 25922 | <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | 0,993 | 0,759 | 4,042 | A |
| ATCC 10876 | 1. <i>Bacillus cereus</i> (A) | No ID | | | | A |
| ATCC 10876 | 2. <i>Bacillus cereus</i> (B) | <i>Bacillus cereus</i> | 0,823 | 0,652 | 4,442 | B |
| ATCC 25932 | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,996 | 0,761 | 4,164 | A |
| ATCC 27853 | 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | No ID | | | | A |
| ATCC 27853 | 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0,94 | 0,648 | 5,433 | A |
| ATCC 9927 | <i>Streptococcus uberis</i> | <i>Streptococcus</i> | - | 0,244 | 4,936 | C1 |
| ATCC 13525 | <i>Pseudomonas fluorescenes</i> | No ID | | | | A |
| ATCC 7644 | 1. <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria innocua</i> | - | 0,457 | 2,547 | A |
| ATCC 7644 | 2. <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 0,664 | 0,559 | 2,85 | A |
| NTCT 6013 | 1. <i>Salmonella abony</i> | <i>Salmonella enterica</i> | 0,879 | 0,671 | 4,548 | A |
| NTCT 6013 | 2. <i>Salmonella abony</i> | <i>Salmonella enterica</i> | 0,757 | 0,55 | 5,075 | A |
| ATCC 29212 | <i>Enterococcus faecalis</i> | No ID | | | | C1 |
| ATCC 35657 | 1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NO ID | | | | A |
| ATCC 35657 | 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NO ID | | | | B |
| ATCC 35657 | 3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - | 0,178 | 8,016 | C1 |

7.2 Menetelmien vertailu

Työn tarkoituksena oli selvittää GEN III:n luotettavuus muihin referenssimenetelmiin, joiden käytöstä on jo kokemusta aiemmin. Pääosin GEN III pärjäsikin vertailussa hyvin (taulukko 3.), vaikka mukaan mahtui myös joitakin kyseenalaisia tuloksia. RapidIDStaphilla ei tuloksia juuri saatu, sillä puhdasviljelmistä valmistetut solususpensiot jäivät liian laimeiksi, minkä seurauksena tuloksia ei ollut mahdollista lukea.

Taulukko 3. Menetelmien vertailu

| Tuntemattomat näytteet | | | | | |
|------------------------|----------------------------------|-------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Näyte | Biolog GEN III | ID | API 20 E | APIStaph | RapID STAPH |
| 3026-1 | NO ID | - | | - | |
| 3026-6 | NO ID | - | | - | |
| 3027-3 | No ID | - | | - | |
| 3026-3 | <i>Staph. capitis</i> | 0,910 | | <i>Staph. capitis</i> 0,998 | |
| 3026-4 | <i>Staph. caprae</i> | - | | <i>Staph. cohnii</i> 0,846 | |
| 3026-8 | <i>Staph. epidermidis</i> | 1,00 | | <i>Staph. epidermidis</i> 0,977 | |
| 3026-9 | <i>Staph. capitis</i> | 0,997 | | <i>Staph. capitis</i> 0,987 | |
| 3026-10 | NO ID | - | | <i>Staph. Hominis</i> 0,46 | |
| 3027-5 | <i>Staph. hominis</i> | 0,984 | | NO ID | |
| 3027-7 | <i>Micrococcus bovicus</i> | 0,995 | | <i>Staph. saprophyticus</i> 0,962 | |
| 3027-8 | <i>Staph. saprophyticus</i> | 0,992 | | <i>Staph. hominis</i> 0,974 | |
| 3027-10 | <i>Staph. epidermidis</i> | 0,945 | | <i>Staph. epidermidis</i> 0,967 | |
| 4030-6 | <i>Diezia maris</i> | 0,683 | | | <i>Micrococcus sp.</i> |
| 4030-8 | <i>Staph. capitis</i> | 0,945 | | <i>Staph. Capitis</i> 0,997 | <i>Staph. Capitis</i> |
| 4030-11 | <i>Micrococcus luteus A</i> | - | | | |
| 4030-12 | <i>Pantoea agglomerans 3</i> | 0,627 | <i>Pantoea spp3</i> 0,998 | | |
| 4030-16 | <i>Corynebacterium capitovis</i> | 0,978 | | | |
| 4030-17 | <i>Micrococcus luteus A</i> | 0,985 | | | |

7.3 Luennan toistettavuus eri henkilöiden kesken

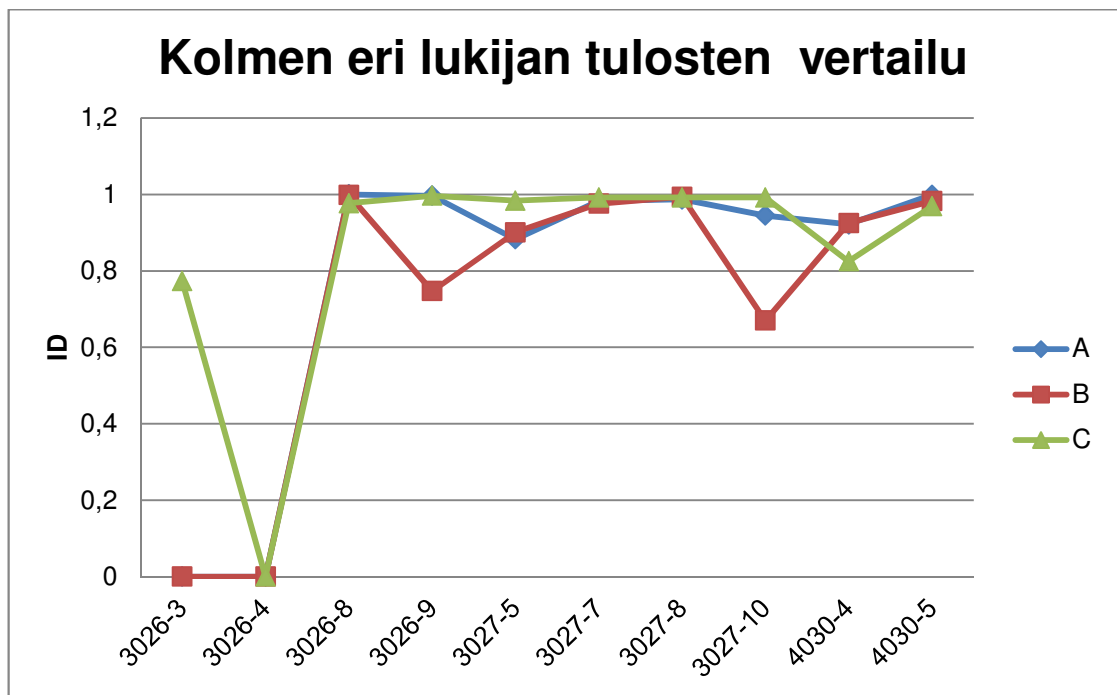
Työn tarkoituksena oli myös selvittää, onko kuoppalevyjen värireaktioiden tulkitseminen lukijoista riippuvaista. Tulosten lukeminen tapahtuu aistinvaraisesti eivätkä värireaktiot aina ole selkeästi positiivisia tai borderline-tapauksia. Positiivisia reaktioita verrataan kuoppalevyssä olevaan positiiviseen kontrolliin ja puolestaan negatiivisen kontrollikuopan tulisi olla täysin kirkas, jotta negatiiviset reaktiot olisi helpompi tunnistaa.

Kuvassa kahdeksan on näkyvissä kuoppalevy näytteestä 3026-3, jossa jotkut borderline-reaktiot näkyvät heikosti havaittavana violetin sävynä. Ja osa borderline-reaktioista puolestaan ovat lähes positiivisen reaktion kaltaisia. Kuoppalevyjen lukemista testattiin kolmen eri lukijan kesken, ja tulokset olivat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta varsin yhdenmukaisia. Kuvissa 9, 10 ja 11 ovat näkyvissä näytteen 3026-3 tulosten tulkinnat eri lukijoiden kesken. Taulukossa 4 olevat tulokset kertovat laboranttien 1, 2 ja 3 saaduista tuloksista. Saadut identifiointiprosentit olivat ainoastaan yhdessä näytteessä (3026-9) kahdella lukijalla samat. Suurimmat erot olivat näytteessä 3026-3, jossa lukija 3 sai identifiointiprosentilla 77,3 % tulokseksi *Staphylococcus capitis*, kun kaksi muuta eivät puolestaan saaneet tuloksia lainkaan.

Taulukko 4. Kolmen eri lukijan tulokset

| Luentatarkkuus | | | | | | |
|----------------|---------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| Lukija | Näyte | Species | PROB | SIM | DIST | Menetelmä |
| 1. | 3026-3 | <i>NO ID</i> | - | - | - | B |
| 2. | | <i>NO ID</i> | - | - | - | |
| 3. | | <i>Staphylococcus capitis</i> | 0,773 | 0,533 | 5,413 | |
| 1. | 3026-4 | <i>Staphylococcus caprae</i> | - | - | - | A |
| 2. | | <i>Bacillus megateium</i> | - | - | - | |
| 3. | | <i>Staphylococcus caprae</i> | - | - | - | |
| 1. | 3026-8 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1,00 | 0,764 | 4,365 | A |
| 2. | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0,999 | 0,841 | 3,018 | |
| 3. | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0,977 | 0,784 | 3,577 | |
| 1. | 3026-9 | <i>Staphylococcus capitis</i> | 0,997 | 0,800 | 3,360 | A |
| 2. | | <i>Staphylococcus capitis</i> | 0,747 | 0,571 | 4,232 | |
| 3. | | <i>Staphylococcus capitis</i> | 0,997 | 0,800 | 3,488 | |
| 1. | 3027-5 | <i>Staphylococcus hominis</i> | 0,883 | 0,709 | 3,413 | A |
| 2. | | <i>Staphylococcus hominis</i> | 0,901 | 0,723 | 3,803 | |
| 3. | | <i>Staphylococcus hominis</i> | 0,984 | 0,828 | 2,79 | |
| 1. | 3027-7 | <i>Macrocooccus bovicus</i> | 0,983 | 0,642 | 6,072 | A |
| 2. | | <i>Macrocooccus bovicus</i> | 0,976 | 0,602 | 6,893 | |
| 3. | | <i>Macrocooccus bovicus</i> | 0,992 | 0,648 | 6,392 | |
| 1. | 3027-8 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0,987 | 0,830 | 2,646 | A |
| 2. | | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0,994 | 0,836 | 2,715 | |
| 3. | | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0,992 | 0,834 | 2,453 | |
| 1. | 3027-10 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0,945 | 0,651 | 5,825 | A |
| 2. | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0,670 | 0,512 | 4,442 | |
| 3. | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0,992 | 0,832 | 2,452 | |
| 1. | 4030-4 | <i>Paenibacillus pabuli</i> | 0,922 | 0,776 | 2,509 | B |
| 2. | | <i>Paenibacillus pabuli</i> | 0,925 | 0,815 | 2,073 | |
| 3. | | <i>Paenibacillus pabuli</i> | 0,825 | 0,694 | 3,020 | |
| 1. | 4030-5 | <i>Bacillus cereus</i> | 0,999 | 0,652 | 6,028 | B |
| 2. | | <i>Bacillus cereus</i> | 0,983 | 0,641 | 7,595 | |
| 3. | | <i>Bacillus cereus</i> | 0,969 | 0,668 | 5,536 | |

Kuviossa 1 näkyvät tulokset kolmen eri laborantin kuoppalevyjen tulkinnoista. Suurimmat erot olivat näytteiden 3026-3, 3026-8 ja 3027-10 tulkinnoissa. Näiden näytteiden kuoppalevyissä negatiivinen kontrolli oli lievästi violetin värinen, joka aiheutti ongelmia muiden värireaktioiden tulkitsemisessä, lähinnä tapauksissa borderline-positiivinen. Näytteet 3026-8, 3027-7, 3027-8 ja 4030-5 olivat lukijoiden kesken lähes identtiset.



Kuvio 1. Kolmen eri lukijan tulokset näytteiden lukemisesta. Y-akselilla PROB arvot, eli identifiointi todennäköisyydet ja x-akselilla näytteiden numerot.

Lukijoiden välisiä eroja tulkittiin kaksisuuntaisella ANOVA:lla (Taulukko 5), jonka tarkoituksena on selvittää, eroavatko lukijoiden tulokset merkittävästi toisistaan. Nämä laskut suoritettiin Excelissä ohjelmalla ANOVA: Two factor without replication. Taulukosta tärkeimpiä seurattavia arvoja ovat keskihajonnat eli minkä verran tulokset eroavat yleisestä keskiarvosta sekä arvo kohdassa p-value, joka kertoo ryhmien välisten erojen merkitsevyyden. Keskihajonnat laskettiin ottamalla taulukon *Variance* arvoista neliöjuuri. Taulukon p-valueen ollessa kohdassa *column* suurempi kuin 0,05 voidaan todeta, että ryhmien väliset erot eivät ole tilastollisesti merkitseviä. Tarkasteltaessa lukijoiden välisten tulosten keskihajontoja, voidaan todeta, että näytteiden 3026-3, 3026-9 ja 3027-10 kohdalla keskihajonnat ovat huomattavan suuria, ja näin ollen näiden näytteiden kohdalla lukutarkkuudessa on ollut merkittävästi eroa henkilöiden kesken. [15]

Taulukko 5 Lukijoiden väliset erot tulosten tulkinnessa

Anova: Two-Factor Without Replication

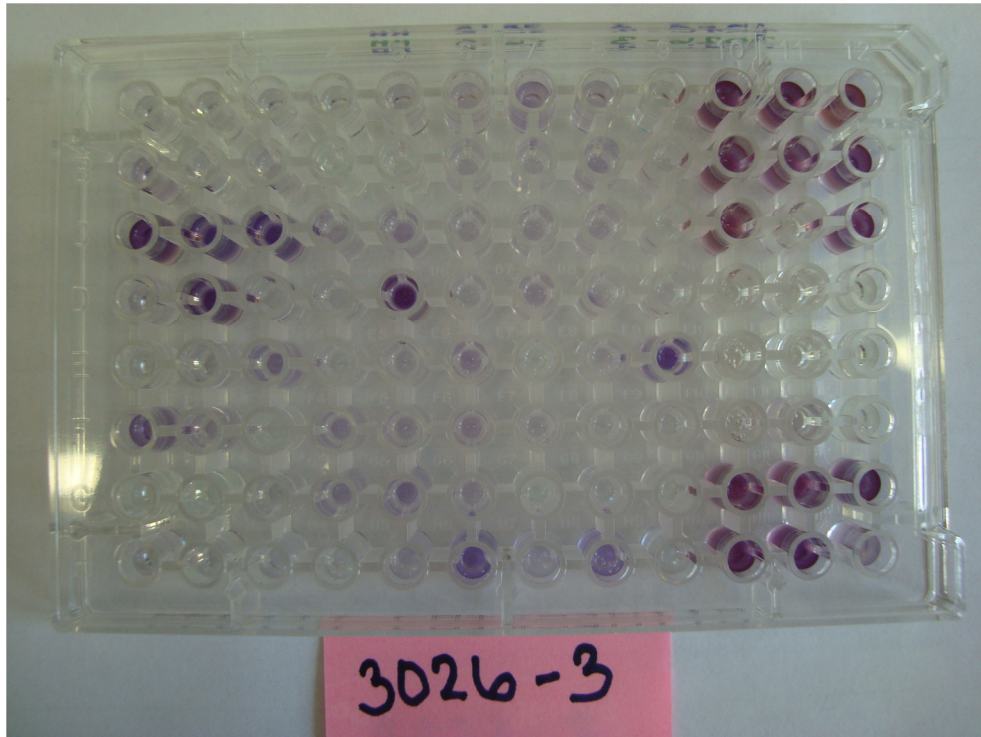
| <i>SUMMARY</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> | <i>Standard deviation</i> |
|----------------|--------------|------------|----------------|-----------------|---------------------------|
| 3026-3 | 3 | 0,773 | 0,257667 | 0,19917633 | 0,446291758 |
| 3026-3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3026-8 | 3 | 2,976 | 0,992 | 0,000169 | 0,013 |
| 3026-9 | 3 | 2,741 | 0,913667 | 0,02083333 | 0,144337567 |
| 3027-5 | 3 | 2,768 | 0,922667 | 0,00290233 | 0,053873308 |
| 3027-7 | 3 | 2,951 | 0,983667 | 6,4333E-05 | 0,008020806 |
| 3027-8 | 3 | 2,973 | 0,991 | 0,000013 | 0,003605551 |
| 3027-10 | 3 | 2,607 | 0,869 | 0,030253 | 0,173933895 |
| 4030-4 | 3 | 2,672 | 0,890667 | 0,00323633 | 0,05688878 |
| 4030-5 | 3 | 2,951 | 0,983667 | 0,00022533 | 0,015011107 |

| | | | | |
|---|----|-------|--------|------------|
| A | 10 | 7,716 | 0,7716 | 0,16684449 |
| B | 10 | 7,195 | 0,7195 | 0,15582606 |
| C | 10 | 8,501 | 0,8501 | 0,09548899 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|---------------|
| Rows | 3,336133 | 9 | 0,370681 | 15,6148509 | 8,71942E-07 | 2,456281 |
| Columns | 0,086443 | 2 | 0,043222 | 1,82070177 | 0,190495068 | 3,554557 |
| Error | 0,427303 | 18 | 0,023739 | | | |

Kuvassa 8 on näytteen 3026-3 kuoppalevy, jonka tulkinnessa oli selvästi eroa lukijoiden kesken. Kaksi kolmesta lukijasta sai tulokseksi ainoastaan suvun *Staphylococcus*, yksi puolestaan lajin *Staphylococcus capitis* tunnistusprosentilla 77,3%. Lukijoiden yksi ja kaksi (kuvat 9 ja 10) analyysit värireaktioista olivat muutamaa kuoppaa lukuunottamatta lähes identtiset, lukijalla kolme (kuva 10) on puolestaan muutamassa kuopassa analyysina borderline, kun lukijoilla yksi ja kaksi näissä kuopissa reaktiona on negatiivinen.



Kuva 8. Kuoppalevy näytteestä 3026-3

Kuvassa 9 on lukijan yksi tulokset näytteestä 3026-3, jossa oli lukijoiden kesken selvää eroa saaduissa tuloksissa. Kuvassa kahden kuopan päällä olevat rastit ovat ohjelman antamia ehdotuksia mahdollisista positiivista/borderline -reaktioista. Kuvassa violetti ympyrä tarkoittaa lukijan tulkitsemia positiivista reaktioita, sini-valkoinen borderline-tulkintaa ja valkoinen negatiivista tulkintaa kuopan värireaktiosta.

The screenshot shows the 'File Plate Data' window with the following details:

- Project:** MLS
- Plate Number:** 1
- Plate Type:** GEN III
- Protocol:** A
- Strain Type:**
- Incubation Hours:** 24
- Sample ID:** 3026-3
- Fields:** Field 2 through Field 10 are listed.

The central 'Pos/Neg Graphic' shows a 96-well plate layout (rows A-H, columns 1-12) with color-coded results:

- Row A:** Wells 1-8 are white, 9 is light blue, 10-12 are purple.
- Row B:** Wells 1-2 are light blue, 3-4 are white, 5-8 are light blue, 9-12 are purple.
- Row C:** Wells 1-3 are purple, 4-8 are light blue, 9-12 are white.
- Row D:** Wells 1-2 are white, 3 is purple, 4 is white with a cross, 5-8 are light blue, 9-12 are white.
- Row E:** Wells 1-2 are white, 3 is light blue, 4-8 are white, 9 is purple, 10-12 are white.
- Row F:** Wells 1-2 are light blue, 3-8 are white, 9-12 are white.
- Row G:** Wells 1-4 are white, 5-8 are light blue, 9-12 are white.
- Row H:** Wells 1-2 are white, 3-8 are white, 9-12 are white.

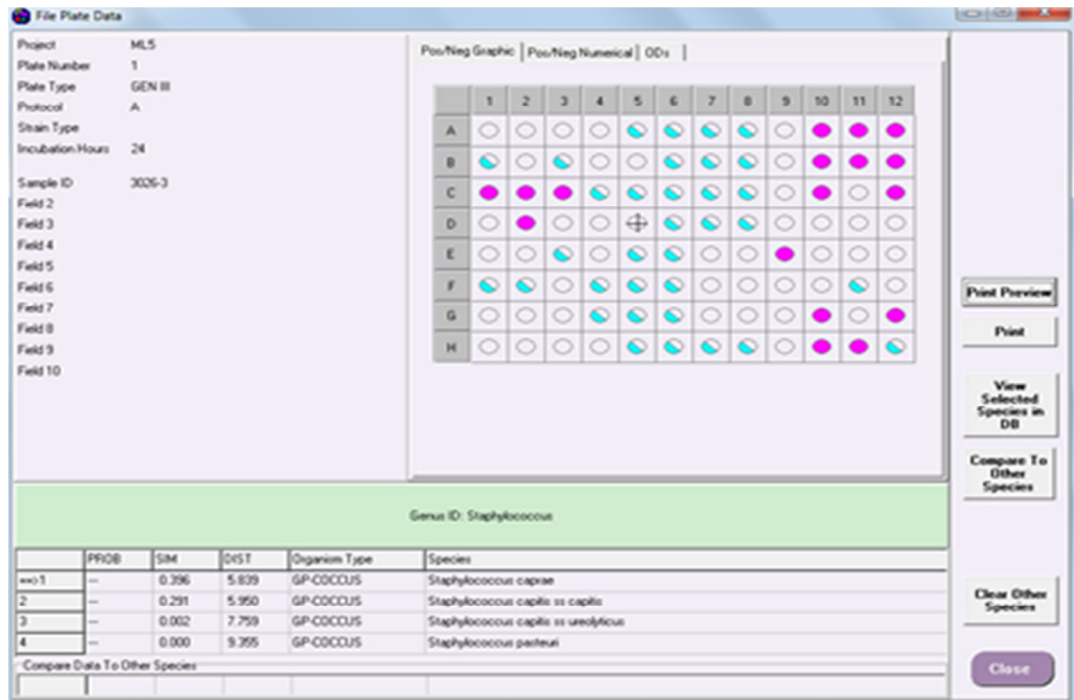
The 'Genus ID: Staphylococcus' section contains the following table:

| | PFIDB | SIM | DIST | Organism Type | Species |
|---|-------|-------|-------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | -- | 0.277 | 6.037 | GP-COCOUS | Staphylococcus capitis ss capitis |
| 2 | -- | 0.273 | 6.153 | GP-COCOUS | Staphylococcus caprae |
| 3 | -- | 0.002 | 7.902 | GP-COCOUS | Staphylococcus capitis ss ureolyticus |
| 4 | -- | 0.000 | 8.881 | GP-COCOUS | Staphylococcus pasteurii |

Buttons on the right include: Print Preview, Print, View Selected Species in DB, Compare To Other Species, Clear Other Species, and Close.

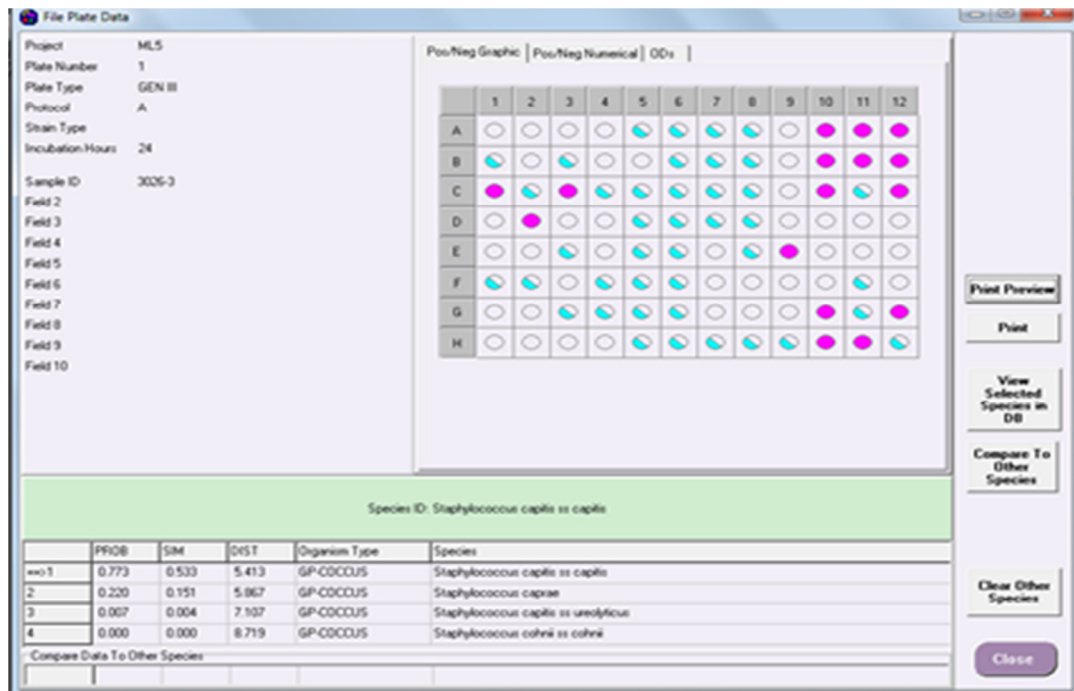
Kuva 9. Lukija 1 sai näytteestä 3026-3 tulokseksi *Staphylococcus* ilman tunnistusprosenttia

Kuvassa 10 näkyy puolestaan lukijan kaksi tulokset näytteestä 3026-3. Lukijoiden yksi ja kaksi tulokset ovat näytteestä lähes identtiset lukuun ottamatta kuoppien A2 ja F11 tuloksia, joissa lukija kaksi on laittanut reaktioksi ”borderline” ja lukija yksi ”negatiivinen”.



Kuva 10. Lukija kaksi sai näytteestä 3026-3 tulokseksi *Staphylococcus* ilman tunnistusprosenttia.

Kuvassa 11 on näkyvillä lukijan kolme tulokset samasta näytteestä. Tässä tulokseksi saatu *Staphylococcus capitis* poikkeaa kahden muun lukijan tuloksista merkittävästi. Suurin ero kahden aikaisemman lukijan tuloksiin on kuopassa C2, jonka lukija 3 on merkinnyt "borderline"-tilalla, kun taas kaksi muuta lukijaa saivat tulokseksi "positiivinen".



Kuva 11. Lukija 3 sai näytteestä 3026-3 tulokseksi *Staphylococcus capitis* tunnistusprosentilla 77,7 %

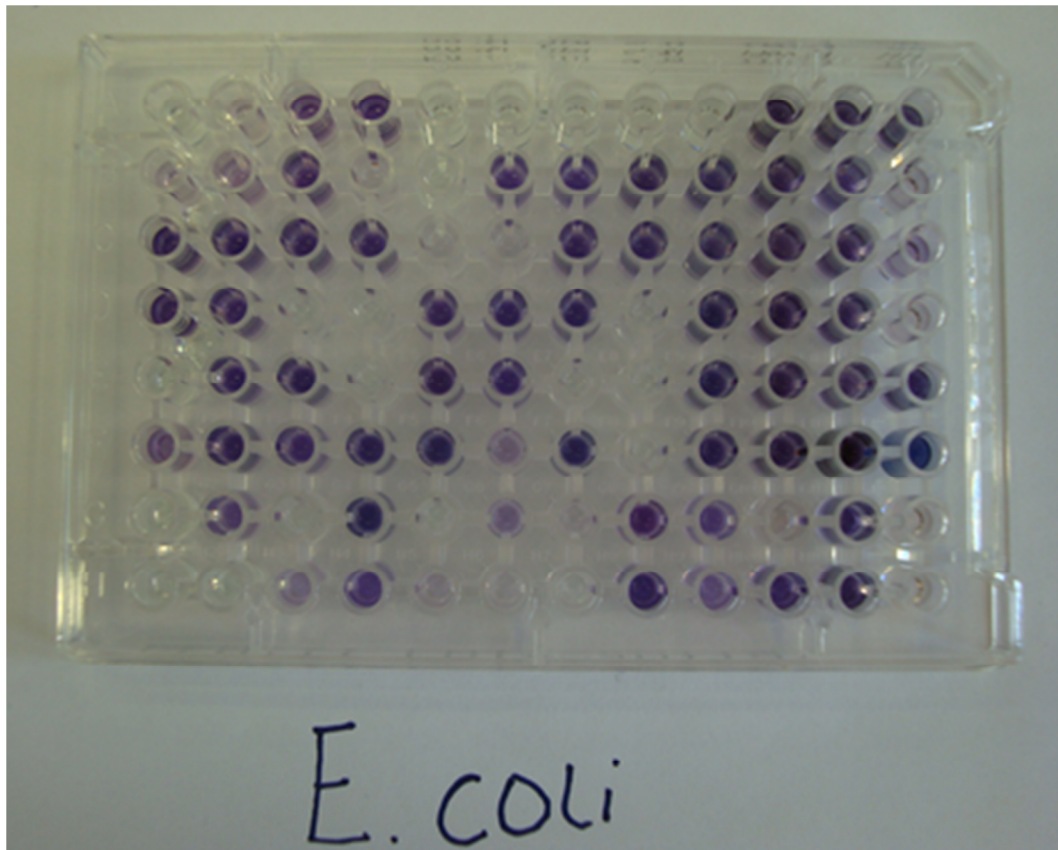
8 Tulosten arviointi

8.1 ATCC-kantojen tulkinta GEN III:lla

ATCC-kantojen tulokset olivat tuntemattomien näytteiden tuloksiin nähden vaihtelevampia. Helposti tunnistettavat ja varmasti A-liuoksella tuloksen antavat kannat, kuten *E. coli* ja *Staphylococcus aureus*, onnistuivat oikein hyvin. Inkubointiajat ja kuoppalevyjen reaktioiden värit olivat kutakuinkin selkeästi tulkittavissa, eikä suurempia ongelmia näin ollen ollut. *Bacillus cereus* aiheutti ongelmia A-liuoksella tehtäessä, sillä negatiiviseen kontrolliin muodostui violettiä väriä, joka aiheutti ongelmia muiden kuoppien värireaktioiden tulkitsemisessa. B-liuoksella tehtäessä *Bacillus cereus* antoi jo paremman tuloksen, vaikkakaan saatu tunnistamisprosentti oli vain 82.3%. Ongelmana tässä näytteessä oli inkubointiajan saaminen laboratoriontyöaikoihin sopivaksi, sillä kuoppalevy inkuboitui lämpökaapissa niin sanotusti yliaikaa, ja näin ollen positiivisten ja borderline reaktioiden tulkitseminen muuttui hankalaksi.

Suurin osa näytteistä testattiin kahteen tai jopa kolmeen kertaan. Kuoppalevyjen rajallisen määrän vuoksi vähemmän tarpeellisten näytteiden testaamista ei lähdetty uusimaan, vaikka tulosta ei saatukaan. C-liuoksella analysoidiut *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus uberis* ja *Klebsiella pneumoniae* eivät antaneet tuloksia lainkaan. Viimeinen *Klebsiella*-näyte antoi mahdolliseksi tulokseksi *Klebsiella pneumoniae*, mutta tulokselle ei saatu tunnistusprosenttia lainkaan, joten tulosta ei voi sanoa luotettavaksi. ATCC-kantojen tuloksiin saattaa merkittävästi vaikuttaa se, että menetelmän käyttö oli aivan uutta eikä jokaisen värireaktion tulkitseminen ollut aivan yksinkertaista. Tuntemattomien näytteiden tulkitseminen oli jo huomattavasti helpompaa kuin lukemiseen oli saatu tietty varmuus.

Kuvassa 12 on *E. coli* -näytteen kuoppalevy inkubointiajan jälkeen. Kuoppalevystä on selvästi huomattavissa, että näytteen kasvatus on onnistunut, sillä negatiivinen kontrolli on kirkas ja puolestaan positiivinen kontrolli on tumman violetti. Värireaktiot negatiivinen-borderline-positiivinen ovat selkeästi luettavissa, ja näin ollen saatu identifiointiprosenttikin on erittäin hyvä.



Kuva 12. *E. coli* – näytteen kuoppalevy inkubointiajan jälkeen.

8.2 Menetelmien vertailu

GEN III ja ApiStaph/API 20 E antoivat kutakuinkin yhteneviä tuloksia keskenään. Tunnistusprosentit erosivat toisistaan jonkin verran, mutta pääsääntöisesti saadun tulokset olivat keskenään yhteneviä. RapIDStaph-testauksessa näytteet jäivät liian laimeiksi, minkä takia tuloksia ei saatu kuin kahdelle näytteelle. Näyte 4030-6 antoi GEN III tulokseksi *Diezia maris* ja ID oli vain 68.3 %, RapIDStaphilla puolestaan tulokseksi saatiin *Micrococcus sp*, joten tästä voidaan päätellä, että toinen testaustuloksista ei pidä lainkaan paikkaansa. Tämä voitaneen selittää ainakin osittain sillä, että RapIDStaph-testauksessa näytteet jäivät yleisesti liian laimeiksi, eikä reaktioita näin ollen ehtinyt inkubointiajan rajoissa muodostua.

Näyte 3027-3 antoi GEN III:lla tulokseksi *Staphylococcus hominis* ja tunnistusprosentiksi 98,4 %, joka on hyvä, kun puolestaan APIStaph ei antanut lainkaan tulosta. Tähän voi yhtenä syynä olla ainakin API-testauksen solususpension vahvuus, joka ei välttämättä ollut tarpeeksi vahva. Näytteessä 3027-7 GEN III on

antanut tulokseksi *Macrococcus bovicus* ja APIStaph puolestaan *Staphylococcus saprophyticus*. Tulos on sikäli hyvä, että se antaa bakteerille oikean suvun, vaikka laji on väärä. Tuloksia tarkastellessa huomaa selvästi, että mikäli GEN III ei antanut tulosta, ei tulosta yleisesti saatu myöskään referenssimenetelmillä.

8.3 Luennan toistettavuus eri henkilöiden kesken

Eri lukijoiden kesken tulokset olivat yllättävänkin yhteneviä, sillä menetelmä oli kaikille kolmelle lukijalle täysin uusi, eikä värireaktioiden tulkitseminen ollut ihan yksinkertaista. Viimeinen näyte (4030-5) antoi erittäin hyvin kuvan *Bacillus*-sukuisten bakteerien tunnistuksesta, sillä varsinkin puhtaita ATCC-kantoja testatessa juuri nämä osoittautuivat kaikista vaikeimmiksi testattavaksi ja tulkittavaksi, sillä negatiivinen kontrollikuoppa värjäytyy helposti hennon vaaleanvioletiksi. Kaikkien lukijoiden saadut identifiointiprosentit olivat kahta näytettä (3026-9 ja 3027-10) lukuunottamatta hyviä, Edellä mainituissa näytteissä lukijan 2 identifiointiprosentit jäivät alle hyväksytyn rajan, mutta saatu laji on kuitenkin yhtenevä kahden muun lukijan kanssa. Lukijoiden väliset tulkintaerot näytteiden kesken tilastollisesti tarkasteltuna eroavat kyllä merkitsevästi toisistaan, mutta tähän vaikuttaa se, että tulosten analysointi on tapahtunut kaikkien näytteiden kesken, eikä ainoastaan yhden näytteen sisällä. Todellisesta erosta lukijoiden kesken kertoo enemmän keskihajonnan arvo, joka on selvästi suurempi näytteissä 3026-3, 3026-9 ja 3027-10. Näiden näytteiden kohdalla värireaktiot olivat hankalasti eroteltavissa varsinkin reaktioissa borderline-positiivinen.

9 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli selvittää, pystyisikö GEN III:lla korvaamaan kaikki käytössä olevat useammat referenssimenetelmät ja siirtymään tunnistuksessa käyttämään ainoastaan sitä. Menetelmäkohtaisen vertailun tuloksena voidaan hyvin sanoa, että GEN III:lla voitaisiin korvata ainakin käytössä olevat API-testit. RapIDStaph on menetelmänä laboratoriossa, jossa työ suoritettiin, uusi eikä virallisessa käytössä ole juurikaan ollut, jota tarkoituksena olisi korvata ainoastaan API-testit. GEN III antaa laajemmat mahdollisuudet mikrobien testaamiseen, eikä testaamista ennen tarvita muita testejä (katalaasi/oksidiaasi), vaan mikroskopoinnin ja gram-värjäyksen jälkeen voidaan suoraan siirtyä testaamaan haluttuja näytteitä. Testausmenetelmänä GEN III

manuaalinen identifiointi järjestelmä on loppujen lopuksi hyvin yksinkertainen ja antaa testausajassa luotettavia tuloksia.

Tulokset eri henkilöiden lukijoiden kesken puoltavat sitä, että vaikka GEN III:n värireaktiot eivät välttämättä ole aina kovin selkeitä positiivisia tai negatiivisia, pystyvät eri lukijat kuitenkin saamaan samasta näytteestä varsin yhteneviä tuloksia, vaikka reaktiot ovat melko tulkinnanvaraisia. Testin uusittavuutta alusta alkaen tehtynä on hankala arvioida, sillä useampi henkilö ei toteuttanut testiä alusta alkaen samalla näytteellä uudestaan. Voidaan ainoastaan todeta, että kuoppalevyjen lukeminen eri henkilöiden toistamana onnistuu melko hyvin. ATCC-näytteiden analysointi ei puolestaan antanut tulosten valossa kovinkaan positiivista kuvaa GEN III:n tulosvarmuudesta, mutta nämä tulokset ovat selitettävissä luultavasti sillä, että menetelmä oli ensimmäisten testauksien kohdalla vielä uusi ja tulosten tulkinta oli epävarmaa, mikä varmasti vaikuttaa tuloksiin.

GEN III:n käyttö laboratoriossa, joka on auki kahdeksan tuntia päivässä ja vain arkipäivisin, saattaa aiheuttaa joidenkin näytteiden kohdalla kuoppalevyjen ylivierittymistä eli inkubointiajan venymistä liian pitkäksi, mikä vaikeuttaa tulosten tulkittamista. Tällaisia näytteitä tulosten valossa ovat pääsääntöisesti liuoksella B analysoidut näytteet, esimerkiksi *Bacillus*-sukuiset bakteerit. Yleisenä lopputuloksena voidaan kuitenkin sanoa, että GEN III:n käyttöönotto ainoaksi testimenetelmäksi näyttäisi tulosten tarkastelun perusteella olevan hyvin mahdollista.

Tulosten värireaktioiden tulkittaminen ei aistinvaraisesti ole välttämättä kovinkaan yksinkertaista jokaisen levyn kohdalla, ja näin ollen virhetulkintoja saattaa syntyä. Tähän ratkaisuna olisi käyttää laboratoriossa täysin automatisoitua GEN III OmniLog® ID System-menetelmää, joka inkuboinnin ja lämpötilojen asettamisen lisäksi lukee erillisellä lukijalla kuoppalevyt ja antaa näistä tulokset tietokoneelle valmiiksi. Tällä vältettäisiin aistinvaraisen tulkinnan virheitä, mutta investointikustannukset ovat automaattisella menetelmällä huomattavasti suuremmat kuin manuaalisen identifiointijärjestelmän hankkimisessa.

Lähteet

- [1] Kirsi Soljakka & Maija-Liisa Välimäki. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos.
- [2] Mikrobiologian perusteita. 2002. Mikrobiologian julkaisuja. 2002. Opetushallitus.
- [3] Gram-positive cocci. Microbe World. Verkkodokumentti
<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7532>. Luettu 2.5.2013.
- [4] Gram-negative rod. Neal R. Chamberlain, Ph.D. and Betty Cox, M.A. 1996-1997. Verkkodokumentti.
<http://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/lab/idlab/gmnegro.htm>. Luettu 2.5.2013.
- [5] Bakteerisolun ulkoiset rakenteet. Solunetti. 2006.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerien_ulkoiset_rakenteet/
- [6] Gram-värijäys. Solunetti. 2006. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/>. Luettu 6.4.2013
- [7] GEN III MicroPlate™ ,Käyttöohjeet – BiOLOG, LABEMA
- [8] Biolog. MicroStation™System/MicroLog. User´s Guide. 2009.
- [9] APiStaph. Verkkodokumentti.
<http://www.netropica.org/bacteriologia/ApiStaph%281%29.pdf>. Luettu 7.4.2013.
- [10] ApiStaph testiliuska. 4science. Verkkodokumentti.
http://www.4science.net/main.asp??=item/item_view&item_idx=11360. Luettu 7.4.2013.
- [11] API20E. Netropica. Verkkodokumentti.
<http://www.netropica.org/bacteriologia/Api20E%281%29.pdf>. Luettu 9.4.2013.
- [12]. API20E testiliuska. Bluegrass. Community&Technical college. Verkkodokumentti
http://legacy.bluegrass.kctcs.edu/natural_sciences/biology/bsl_214_virtual_lab/virtual_lab_4_enteric_microorganisms/ . Luettu 9.4.2013.
- [13] RapIDStaph. Verkkodokumentti.
http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/IFU8311009_RapID_Staph_Plus_Jan2007.pdf. Luettu 10.4.2013.



[14] RapIDStaph testiliuska. Oxoid. Verkkodokumentti.

<http://www.oxid.com/uk/blue/press/press.asp?art=Y&arch=Y&pRef=PR0317&c=UK&lang=EN&yr=2008>. Luettu 10.4.2013.

[15]Koesuunnittelukurssi. Veli-MattiTaavitsainen. Verkkodokumentti.

http://users.metropolia.fi/~velimt/Koesuunnittelu/Koesuunnittelun_pk.pdf. Luettu 9.11.2013.

APIStaph testiliuskan tulostaulukko

| | | | |
|---|--------------------------------|---|---|
|  | | REF: 3027-17 |  |
| CE 07222 B | | Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie : | |
| - + + 1 2 4 O GLU FRU | - + + 1 2 4 MNE MAL LAC | - - - 1 2 4 TRE MAN XLT | - + - + 1 2 4 1 2 4 MEL NIT PAL VP RAF XYL |
| + 1 2 4 SAC MDG NAG | - + - 1 2 4 ADH URE LSTR | Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy : | |
| Ident. / Tautominen : Staph. epidermidis 96.4 % | | Imprimé en France / Printed in France | |

API 20E testiliuskan tulostaulukko

api[®] 20E CE 07223 C REF: _____ / _____ / _____ BIO MÉRISUX

Origine / Source / Herkunft /
Origin / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelene / Pochodzenie :

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| [Microscopic images of API 20E strips showing various test results] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

© 1998-2002 Bio Mérieux / Produced in France

| | |
|--|--------------------------------------|
| Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Άλλα τεστ / Andra testy : | Ident. / Ταυτοποίηση : 99.2 % |
| Pantoea spp 3 | |

RapIDStaph testiliuskan tulostaulukko

remel

RapID™ STAPH PLUS System

Report Form

Riferimento N. / N° de referencia: _____
 Date / Fecha: _____
 Tech / Tec: _____
 Origine / Origen: _____

| Rangosta Sordista | Sisäero / Negativo | | | | | | | | | | | RapID STAPH PLUS NEGATIV / REACTIVO RapID STAPH PLUS | | | | | | Sisäro AAS |
|---|---|-----|----|---|-----|-----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|---|---------------------------------|--|-----|----------------------------------|-----|---------------|
| | Pöytä, ölä, göle ölä o Mörö, ölä, göle ölä o göle ölä o | | | Göle o göle ölä o / Jöle o ölä o | | | Göle o göle ölä o / Göle ölä o | | | | | Göle o ölä o | Pöytä o Mörö o göle ölä o | Pöytä o, ölä o, ölä ölä o o Mörö o, göle ölä o o ölä ölä o | | Pöytä o, ölä o, göle ölä o | | |
| Resistenti positiivis Resistentis positiivis | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Qualit. / SP de control | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Orden Código de prueba | ATM | COE | LP | SLC | AVO | FOC | ORL | ORU | ORP | ORR | ORW | ORX | ORZ | ARA | ABA | LEU | LAB | SET |
| Valore / Valor | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| Resultado Resultado | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Valore totale Valor total (Resistente) | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | |

