



Dermatofyytti-PCR-menetelmän verifiointi

Jenni Rapo

OPINNÄYTETYÖ
Lokakuu 2023

Kliininen asiantuntija (YAMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Kliininen asiantuntija (YAMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

RAPO, JENNI:
Dermatofyytti-PCR-menetelmän verifiointi

Opinnäytetyö 67 sivua, joista liitteitä 7 sivua
Lokakuu 2023

Dermatofyytit aiheuttavat valtaosan ihon, hiusten ja kynsien sieni-infektioista. Sieniviljely on tutkimuksena tarkka, mutta aikaa vievä ja siihen liittyy korkea väärän negatiivisen vastauksen riski. Pintasieninäytteiden nukleiinihappotutkimuksella pystytään osoittamaan sienten nukleiinihappoa suoraan näytteestä sieniviljelyä nopeammin ja herkemmin. Tässä opinnäytetyössä pintasienien PCR-tutkimus suoritettiin Seegenen Novaplex™ Dermatophyte Assay -menetelmällä.

Opinnäytetyön tarkoituksena on verifioida dermatofyytti-PCR-tutkimus mikrobiologian laboratorion käyttöön. PCR-tutkimusta verrataan nyt käytössä olevaan viljelyyn ja suoraan värjäykseen perustuvaan menetelmään. Opinnäytetyössä selvitetään myös, kuinka PCR-tutkimuksen käyttö vaikuttaa vastausviiveeseen pintasieninäytteiden diagnostiikassa. Käytetty tutkimusmenetelmä on kvantitatiivinen ja tulosten analysointi tapahtui IBM SPSS Statistics Data Editor -ohjelmaa käyttäen.

Tässä tutkimuksessa näytteistä 86,1% (n=68) oli värjäyspositiivisia, viljelypositiivisia oli 65,8% (n=52) ja PCR-tutkimuksessa positiivisia näytteitä oli 79,7% (n=63). Kun dermatofyytti-PCR-tutkimusta verrattiin sieniviljelyyn, oli PCR-tutkimuksen herkkyys 84,6% ja tarkkuus 29,6%. PCR-tutkimuksen herkkyys oli 84,7% ja tarkkuus 71,4%, kun vertailu tehtiin sekä sieniviljelyyn että -värjäykseen. PCR-tulos saatiin tässä tutkimuksessa keskimäärin 10,0 vuorokaudessa, kun viljelytuloksen osalta vastaus saatiin 23,2 vuorokaudessa. Ero PCR-tutkimukseen ja viljelyyn kuluneessa ajassa on tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p < ,001$).

Dermatofyytti-PCR parantaa saatujen tulosten perusteella pintasieninäytteiden diagnostiikkaa, koska tutkimus on viljelyyn verrattuna herkempi, tarkempi ja nopeampi. Tämän tutkimuksen perusteella dermatofyytti-PCR-tutkimus soveltuu pintasienidiagnostiikkaan Fimlab mikrobiologian sienilaboratoriossa. Jatkotutkimusaiheena voisi selvittää asiakaskokemuksia PCR-menetelmän tuomista hyödyistä pintasienidiagnostiikassa ja mahdollistaako uusi menetelmä esimerkiksi suurempien näytemäärien käsittelyn viljelymenetelmään verrattuna.

Asiasanat: dermatofyytti, PCR, verifiointi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Master's Degree in Clinical Expertise and Development

RAPO, JENNI:
Verification of the Dermatophyte-PCR Method

Master's thesis 67 pages, appendices 7 pages
October 2023

Dermatophytes cause infections of the skin, hair and nail. Fungal culture is a specific technique but time consuming and there is a risk of false negative result. Polymerase chain reaction techniques provide a faster and more sensitive diagnostic approach. The purpose of this thesis was to verify Seegene Novaplex™ Dermatophyte Assay. PCR approach was compared to the fungal culture and microscopy. The purpose of this study was also to clarify how PCR method affects to the response delay. The quantitative data were analyzed using IBM SPSS Statistics Data Editor.

In this study 86,1% (n=68) of the samples were positive by microscopy, 65,8% (n=52) by culture and 79,7% (n=63) by PCR. Sensitivity of the PCR was 84,6% and specificity 29,6% when the method was compared to the culture. When the comparison was made with culture and microscopy the sensitivity was 84,7% and the specificity 71,4%. In this study the results from PCR were ready on average in 10,0 per day and by culture in 23,2 per day. The difference in time used between PCR and culture was statistically very significant ($p = <,001$).

The findings indicate that PCR method of the dermatophytes is more sensitive, specific and faster than fungal culture. The PCR method suits well in diagnosis of the dermatophytes in Fimlab Laboratoriot Oy. Further research is required to clarify the customer experience of the PCR method, and also, to clarify how the new method affects the work flow in laboratory.

Key words: dermatophyte, PCR, verification

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	DERMATOFYYTIT.....	8
2.1	Dermatofyytit taudinaiheuttajina	8
2.1.1	Yleisimmät pintasieni-infektioita aiheuttavat sienilajit	9
2.1.2	Kynsisilsa	10
2.1.3	Ihon ja hiuspohjan silsainfektio	11
2.2	Pintasienidiagnostiikka	11
2.2.1	Pintasieninäytteen ottaminen	12
2.2.2	Calcofluor-värjäys.....	14
2.2.3	Viljelymenetelmä	15
2.3	Infektioiden hoito	16
3	REAALIAIKAINEN POLYMEERAASIKETJUREAKTIO.....	19
3.1	Polymeraasiketjureaktion periaate	19
3.2	Reaaliaikainen PCR.....	21
3.2.1	Fluoresoivat merkkiaineet ja detektio	22
3.2.2	Multiplex-PCR.....	24
3.3	PCR-tutkimuksen haasteet	25
3.4	PCR-tutkimus sienilajien tunnistamiseksi.....	25
4	VERIFIOINTI.....	28
5	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	29
6	TUTKIMUSMENETELMÄT	30
6.1	Tutkimusaineisto	30
6.2	PCR-näytteiden esikäsittely	32
6.3	Seegenen Novaplex™ Dermatophyte Assay	32
6.4	Tutkimusaineiston analysointi	36
7	TULOKSET	38
7.1	PCR-tutkimuksen herkkyys ja tarkkuus pintasienidiagnostiikassa	38
7.2	PCR-tutkimukseen kulunut aika viljelyyn verrattuna.....	43
8	POHDINTA	46
8.1	Tulosten tarkastelu.....	46
8.1.1	PCR-tutkimuksen herkkyys ja tarkkuus pintasienidiagnostiikassa	46
8.1.2	PCR-tutkimukseen kulunut aika viljelyyn verrattuna	48
8.2	Luotettavuus	50
8.3	Etiikka	52

8.4 Johtopäätökset.....	54
LÄHTEET	55
LIITTEET	61
Liite 1. Opinnäytetyön tiedonhaku.....	61
Liite 2. Aikaisemmat dermatofyytti-PCR-tutkimukset	62
Liite 3. Värjäys-, PCR-, ja viljelytulokseen kulunut aika vuorokausissa näytteenottopäivämäärästä alkaen näytekohtaisesti.....	67

1 JOHDANTO

Sieni-infektiot ovat kliinisessä potilastyössä yleisiä löydöksiä. On tärkeää erottaa sieni-infektion aiheuttamat iho- ja kynsimuutokset muiden sairauksien aiheuttamista muutoksista. Oikea diagnoosi on tärkeää myös siksi, että hoitoajat sieni-infektioissa ovat pitkiä ja varsinkin sisäisiin sienilääkkeisiin liittyy haittavaikutuksia. Sieni-infektioiden diagnostiikka perustuu pääosin sieniviljelyyn ja värjäykseen. Osassa Suomen laboratorioista on käytössä nukleiinihappo-osoitukseen perustuvia menetelmiä sieni-infektioiden diagnostiikkaan. Niiden etuna on nopeus ja suurempi herkkyys sieniviljelyihin nähden. (Ihoinfektiot 2021.)

Nukleiinihappo-osoitusmenetelmällä saatu positiivinen tulos pintasieninäytteestä riittää, eikä viljelyä tällöin tarvitse tehdä (Ihoinfektiot 2021). Mikäli tutkimustulos jää negatiiviseksi, voidaan ottaa viljelynäyte PCR-tutkimukseen kuulumattomien sienilajien tunnistamiseksi (Sherman ym. 2018, 125; Gräser & Saunte 2020; Ihoinfektiot 2021). PCR-tutkimus on perinteisiä menetelmiä kalliimpi ja kontaminaatiot saattavat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. PCR-tutkimukseen liittyy kuitenkin vain vähäinen väärien negatiivisten vastausten riski. (Watanabe & Ishida 2017, 282-286; Falotico & Lipner 2022, 1937.)

ISO-standardissa 15189 määritellään, että kliinisessä laboratoriossa käytetään tutkimuksille tarkoituksenmukaisia ja laboratoriopalveluiden käyttäjien tarpeet täyttäviä tutkimusmenettelyjä (SFS-EN ISO 15189 2013, 46). Uuden menetelmän käyttöönottoa laboratoriossa edeltää sen toiminnan koestaminen eli testaaminen (Kärki 2022, 12). Validoitu menetelmä verifioidaan ennen sen käyttöönottoa (Hägg 2016, 8; Kärki 2021, 2-3) ja sillä tarkoitetaan objektiiviseen näyttöön perustuvaa varmistumista määriteltyjen vaatimusten täyttymisestä (Hägg 2016, 7; Validointi ja verifiointi 2022).

Fimlab Laboratoriot Oy (jatkossa Fimlab) on suurin laboratorioalan yritys Suomessa ja sen pääomistajia ovat Pirkanmaan, Keski-Suomen, Päijät-Hämeen, Kanta-Hämeen sekä Pohjanmaan hyvinvointialueet. Fimlab tuottaa laboratoriopalveluita, koulutusta ja tutkimusta omistajiensa julkisen terveydenhuollon tarpeisiin yli 110 toimipisteessä noin 1200 ammattilaisen voimin. (Fimlab n.d.)

Fimlab tuottaa mikrobiologian diagnostiikkaa asiakkailleen perusterveydenhuolosta erikoissairaanhoidon. Sieniviljelyt ovat pääosin keskitetty klinisen mikrobiologian bakteriologian laboratorioon Tampereelle (Seiskari 2022a), missä pintasienidiagnostiikka perustuu viljely- ja värjäysmenetelmään.

Mikrobiologian laboratoriossa on todettu, että asiakkailla on tarve viljelymenetelmää nopeampaan sienidiagnostiikkaan. Tästä syystä laboratoriossa selvitetään mahdollisuutta käyttää PCR-tutkimusta sieniviljelyn rinnalla tai sijaan. (Seiskari 2022b). Tämän opinnäytetyön tavoitteena on nopeuttaa ja parantaa pintasienien tunnistusta. Opinnäytetyön tarkoituksena on verifioida Seegenen dermatofyytti-PCR-tutkimus mikrobiologian laboratorion käyttöön. Tällä hetkellä pintasienidiagnostiikassa käytössä olevaa viljelyyn ja värjäykseen perustuvaa menetelmää verrataan verifioitavaan PCR-tutkimukseen ja selvitetään, kuinka PCR-tutkimuksen käyttö vaikuttaa pintasieninäytteiden diagnostiikassa vastausviiveeseen.

Opinnäytetyön tiedonhaku suoritettiin syksyllä 2022 käyttäen tietokantoja Medline (EBSCO) ja Cinahl Complete (EBSCO). Opinnäytetyössä käytettiin 22 vertaisarvioitua tieteellistä artikkelia dermatofyytti-PCR-tutkimuksista vuosilta 2017-2022. Tiedonhaku on kuvattu tarkemmin liitteessä 1. Tiedonhaku täydentyi opinnäytetyöprosessin aikana keväällä 2023 julkaistulla Seegenen dermatofyytti-PCR-tutkimukseen liittyvällä artikkelilla. Liitteessä 2 on taulukoitu tässä opinnäytetyössä käytetyt aiemmat dermatofyytti-PCR-tutkimukset. Taulukkoon on koottu tutkimusasetelmat ja niiden keskeisimmät tulokset.

2 DERMATOFYYTIT

2.1 Dermatofyytit taudinaiheuttajina

Dermatofyytit eli silsasienet ovat keratinisoituneessa orvaskeden osassa, kynsissä sekä hiuksissa kasvamaan erikoistuneita sieniä. Niiden olemassaolo ja hyvinvointi perustuu siirtymiseen isännältä toiselle, koska monet niistä eivät enää kykene elämään saprofyytteina ympäristössä. (Kuusela, Richardson & Richardson 2020.) Dermatofyytit aiheuttavat valtaosan ihon, hiusten ja kynsien sieni-infektioista (Pihet & Le Govic 2017, 170; Ihoinfektiot 2021). Infektiot ovat pääosin pinnallisia, mutta ne voivat olla riskitekijöitä akuuttiin selluliittiin esimerkiksi diabeetikoilla (Pihet & Le Govic 2017, 170). Dermatofyyttien aiheuttamaa infektiota iholla, kynsissä, karvoissa ja hiuspohjassa kutsutaan silsaksi eli tineaksi (Heikkilä, Richardson & Richardson 2020a). Myös hiivasienet eli kandidat voivat aiheuttaa pinnallisia sieni-infektioita (Kuusela ym. 2020).

Dermatofyytti-infektioita esiintyy kaikkialla maapallolla, mutta ne ovat yleisempiä trooppisissa maissa lämpötilan ja kosteuden takia. Dermatofyyttien aiheuttamien tautien esiintyvyyteen vaikuttaa potilaan ikä, sukupuoli, vuodenaika, sosioekonomiset ja kulttuuriset tekijät sekä maantieteellinen sijainti. Sieni-infektio voi esiintyä iästä riippumatta, mutta riski infektioiden kasvaa iän myötä ja tämä todennäköisesti johtuu muiden riskitekijöiden lisääntymisestä. (Petrucci ym. 2020, 2.)

Hiivasieni voi aiheuttaa ihoinfektion vasta ihon vastustuskyvyn alennuttua. Tällöin ihoalue, tyypillisesti taiveissa, on punottava ja toisinaan jopa vetistävä. Hiivasienet voivat myös harvoin aiheuttaa sekundaarisia kynsi-infektioita ja tällöin kyseessä on sairauksien tai vammojen jo vaurioittamat kynnet lähinnä sormissa. Myös esimerkiksi erilaiset immuunipuutostilat voivat altistaa hiivojen aiheuttamille primaareille kynsimuutoksille. (Ihoinfektiot 2021.)

2.1.1 Yleisimmät pintasieni-infektioita aiheuttavat sienilajit

Ihmisille sieni-infektioita yleisesti aiheuttavia lajeja on kymmenkunta ja ne kuuluvat kolmeen sienisukuun, joita ovat *Trichophyton*, *Microsporum* ja *Epidermophyton*. Jotkut sienilajit ovat levinneet maailmanlaajuisesti, kun taas toisia lajeja tavataan vain tietyistä maanosista tai alueilta. (Heikkilä ym. 2020a.) Dermatofyytit jaotellaan antropofiilisiin, zoofiilisiin ja geofiilisiin lajeihin. Ensiksi mainitut ovat ihmispatogeenieja, kun taas zoofiiliset silsasienet ovat ensisijaisesti eläinpatogeenieja aiheuttaen infektioita myös ihmisille. Eläinperäiset infektiot ovat tyypillisempiä lapsilla kuin aikuisilla. Maaperän mikrobistoon kuuluvat geofiiliset lajit aiheuttavat vain satunnaisesti ihmisten tai eläinten infektioita. (Heikkilä ym. 2020a.) Antropofiiliset lajit aiheuttavat tyypillisesti kroonisia, lieviä ja ei-tulehduksellisia infektioita, jotka tarttuvat helposti ihmisestä toiseen. Zoofiiliset ja geofiiliset dermatofyytit puolestaan aiheuttavat yleensä akuutteja ihoinfektioita, joihin liittyy merkittävä tulehduksellinen vaste. (Lin, Pattle, Kelley & Jaksic 2021, 1.)

Antropofiilisiä silsasieniä on mahdollista ryhmitellä yleisimmän infektiotilan mukaan, esimerkiksi *Trichophyton rubrum* aiheuttaa yleisesti infektioita jalkaterässä ja kynsissä, kun taas *Microsporum audouinii* hiuspohjassa. Zoofiiliset sienet voidaan ryhmitellä puolestaan niiden pääasiallisen isännän mukaan. Kissoissa ja koirissa esiintyy *Microsporum canis*, kun taas *Trichophyton verrucosum* on naudatarjaan sopeutunut laji. (Heikkilä ym. 2020a.) Taulukossa 1 kuvataan ihmisille infektioita aiheuttavien silsasienten lajittelua.

TAULUKKO 1. Ihmistä infektoivien dermatofyyttien jaottelu (Heikkilä ym. 2020a, muokattu).

Antropofiilisiä lajeja	Zoofiilisiä lajeja	Geofiilisiä lajeja
<i>Trichophyton rubrum</i>		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> - kompleksi	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> - kompleksi	<i>Trichophyton terrestre</i>
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton equinum</i>	
<i>Trichophyton violaceum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>	
<i>Trichophyton soudanense</i>		
<i>Microsporum audouinii</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>		

2.1.2 Kynsisilsa

Kynsisilsa on yleisin kynsitauti, jossa kynsi-infektion aiheuttaa dermatofyytti, ei-dermatofyytti-home tai hiiva (Álvarez-Mosquera ym. 2018, 778; Hayette ym. 2019, 277; Falotico & Lipner 2022, 1933; Gupta, Hall, Cooper & Ghannoum 2022, 1; Pospischil ym. 2022, 1; Trovato ym. 2022, 539). Kynsisilsaa esiintyy Suomessa noin 11%:lla aikuisväestöstä, mutta sitä ei juurikaan todeta lapsilla. Maailmalla kynsisilsan esiintyvyys on tutkimuksesta riippuen 2-14%. (Ihoinfektiot 2021.) Kynsisilsariskiä lisää dermatologiset tilat, kuten liikahikoilu, varvasvälisilsa ja psoriasis. Ulkoisia riskitekijöitä ovat esimerkiksi trauma ja huono kynsien hoito. Riskiä lisäävät myös liittämissairaudet kuten, diabetes, immunosuppressio, kasvaimet, laskimoiden vajaatoiminta, perifeerinen valtimotauti, ylipaino ja tulehdukselliset suolistosairaudet. Geneettinen riski voi vaikuttaa taudin puhkeamiseen ja riskiä lisää myös samassa taloudessa asuvan henkilön sieni-infektio. Lapsilla infektoriskiä lisää Downin syndrooma ja immuunipuutos. (Falotico & Lipner 2022, 1933.) Kynsisilsaa edeltää monesti silsa varvasvälissä (Watanabe & Ishida 2017, 282). Kynsisieni-infektio on miehillä yleisempi kuin naisilla (Petrucci ym. 2020, 2).

Kynsisilsa voi aiheuttaa kipua ja psykososiaalisia ongelmia. Potilaat kertovat sairauden leimaavuudesta ja esteettisestä tyytymättömyydestä kynsien ulkonäköön, mikä voi johtaa sosiaaliseen eristäytymiseen. (Falotico & Lipner 2022, 1933-1934.) Kynsisieni voi esiintyä sekä varpaiden että sormien kynsissä, mutta varpaankynsien infektiot ovat yleisempiä (Ihoinfektiot 2021; Falotico & Lipner 2022, 1935). Kynsisieni aiheuttaa kynsien kellastumista ja paksuuntumista (Watanabe & Ishida 2017, 281; Heikkilä, Richardson & Richardson 2020b; Falotico & Lipner 2022, 1935; Trovato ym. 2022, 539).

Dermatofyytit ovat kynsisilsan aiheuttajia 60-90% tapauksista. Yleisimpiä taudinaiheuttajia ovat *Trichophyton rubrum* ja *Trichophyton mentagrophytes*. Muita harvinaisempia taudinaiheuttajia ovat *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Epidermophyton floccosum* ja *Microsporum*-laji. Lapsilla infektion voi aiheuttaa myös *Trichophyton tonsurans*. Infektioista noin 10% on ei-dermatofyytin rihmasienen eli homeen aiheuttamia ja tällöin kyseessä on yleisimmin *Aspergil-*

lus-, *Fusarium*- tai *Acremonium*-laji, *Scopulariopsis brevicaulis* tai *Alternaria alternata*. Hiivainfektioita on noin 10-20% ja tällöin aiheuttajana on yleensä *Candida*-laji kuten *C.albicans*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* ja *C.glabrata*. Infektion voi aiheuttaa myös kaksi tai useampi taudinaiheuttaja. Tällöin infektiot ovat vaikeammin hoidettavia ja niihin liittyy suurempi uusiutumisen riski. (Falotico & Lipner 2022, 1934.)

2.1.3 Ihon ja hiuspohjan silsainfektio

Tavallisin sieni-infektio iholla on varvasvälin silsa eli tinea pedis ja aineistosta riippuen, sitä esiintyy 4-60% tutkituista. Yleisin aiheuttaja Suomessa on *Trichophyton rubrum*. Iho voi olla maseroitunut eli vettynyt, kutiseva ja siinä voi olla rakkuloita. Paksuilla ihoalueilla iho on hyperkeratoottinen, punoittava ja hilseilevä. Nivusalueen silsalle on tyypillistä aluksi toispuoleinen rengasmainen muutos, joka on reunastaan koholla, tarkkarajainen, punainen ja hilseilevä. Anatomiset syyt vaikuttavat siihen, että nivussilsa on yleinen miehillä ja naisilla puolestaan harvinainen. Nivusalueella todettavaa silsaa edeltää yleensä jalkasilsa. Paljailla ihoalueilla, kuten kasvoissa ja kaulalla esiintyvä vartalon silsa on yleensä etenkin lapsilla eläinperäinen. (Ihoinfektiot 2021.)

Hiuspohjan silsa eli tinea capitis diagnosoidaan Suomessa lähes yksinomaan maahan muuttaneilta lapsilta. Hiuspohjainfektioissa yleisimpiä dermatofyyttejä ovat *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum audouinii* ja *Trichophyton soudanense*. Hiuspohjassa voidaan nähdä punoittava, hilseilevä ja joskus karstainenkin läiskä. Karvatuppeen tunkeutunut sieni aiheuttaa nopeasti pahenevan märkäisen taudin, mikä voi johtaa hoidon viivästyessä hiusten pysyvään menetykseen. (Heikkilä ym. 2020b; Ihoinfektiot 2021.)

2.2 Pintasienidiagnostiikka

Ihon ja kynsien monet sairaudet muistuttavat sienitauteja. Siksi on tärkeää, että iho- ja kynsimuutosten etiologia selvitetään. (Álvarez-Mosquera ym. 2018, 778; Koo ym. 2019, 1642; Ihoinfektiot 2021; Lin ym. 2021, 1, 10; Marcos-Tejedor ym.

2021, 1; Falotico & Lipner 2022, 1939; Pospischil ym. 2022, 2; Trovato ym. 2022, 540.) Sienilajin tunnistus auttaa kliinikkoa tartunnan lähteen selvittämisessä. Negatiivinen tulos on myös diagnostiikan kannalta oleellinen, kun muita mahdollisia aiheuttajia arvioidaan. (Gräser & Saunte 2020, 218.) Kynsissä olevien sieni-infektioita muistuttavien muutosten taustalla voi olla myös esimerkiksi trauma, kynsipsoriasis, kynsien jäkälätauti, bakteeri-infektio tai okasolusyöpä (Ihoinfektiot 2021; Falotico & Lipner 2022, 1939).

Sieniviljelyä varten näytteet on otettava ennen hoidon aloittamista luotettavan viljelytuloksen saamiseksi. Nukleiinihappotutkimukseen sienilääkityksellä ei ole vaikutusta. (Ihoinfektiot 2021.) Sienilajin tunnistaminen on tärkeää, jotta voidaan valita oikea sienilääke (Pihet & Le Govic 2017, 170; Shimoyama, Satoh, Makimura & Sei 2019, 676; Gräser & Saunte 2020, 218; Petrucelli ym. 2020, 4; Kabtani ym. 2021,10; Gupta ym. 2022, 1; Pospischil ym. 2022, 1; Trovato ym. 2022, 540). Hoitoajat pintasieni-infektioissa ovat viikkoja tai kuukausia. Varsinkin sisäisiin sienilääkkeisiin liittyy haittavaikutuksia ja näistä syistä hoidon on perustuttava oikeaan diagnostiikkaan. (Koo ym. 2019, 1642; Ihoinfektiot 2021; Marcos-Tejedor ym. 2021, 2; Falotico & Lipner 2022, 1939.) Turhia lääkekuureja on hyvä välttää myös, jotta voidaan hillitä sienilääkeresistenssin kasvua (Gräser & Saunte 2020, 218).

2.2.1 Pintasieninäytteen ottaminen

Pinnallinen sieniviljelynäyte pyydetään Kuntaliiton laboratoriotutkimusnimikkeellä Sk-SienVi. Tutkimukseen kuuluu näytteen suora mikroskopiointi eli natiivitutkimus ja viljely. Lääkepitoisuudet iholla ja kynnessä säilyvät pitkään, vaikka sienilääkitys onkin lopetettu ja tämä vaikuttaa viljelynäytteeseen. Luotettavia varoajoja ei näytteenoton kannalta voida määrittää. (Ihoinfektiot 2021.) Taulukkoon 2 on koottu Käypä hoito -suosituksen mukaiset ohjeet sieninäytteen ottamisesta sienilääkkeen käytön jälkeen.

TAULUKKO 2. Sieninäytteenotto sienilääkkeen käytön lopettamisen jälkeen (Ihoinfektiot 2021, muokattu).

Näytteenottoaika	Käytetty sienilääke	Näytteenotto aikaisintaan
iho	ulkoinen sienilääke	kaksi viikkoa lääkityksen lopettamisesta
kynsi	amorolfiinilakka	kolme kuukautta lääkityksen lopettamisesta
iho	sisäinen sienilääke	kaksi kuukautta lääkityksen lopettamisesta
kynsi	sisäinen sienilääke	kuusi kuukautta lääkityksen lopettamisesta

Ennen sieninäytteenottoa näytteenottoalue puhdistetaan 80% alkoholilla. Sieninäyte otetaan terveen ja sairaan alueen rajalta kynsilevyn alapinnasta. (Pihet & Le Govic 2017, 170; Heikkilä, Richardson & Richardson 2020c; Ihoinfektiot 2021; Sieni, viljely 2021.) Näytteeksi raaputetaan runsaasti mahdollisimman hienojakoista kynttä tai hilsettä steriilillä veitsellä, jotta se riittää sekä natiivivärjykseen että sieniviljelyyn. Kuivat näytteet kuten kynsi, iho ja hius kuljetetaan laboratorioon kierrekorkillisessa muovipurkissa. Kostean alueen näytteet otetaan geelikuljetusputkeen geeliin kostutetulla vanupuikolla hiivojen kuivumisen estämiseksi kuljetuksen aikana. (Aho-Laukkanen & Mikkola 2021; Sieni, viljely 2021.)

Näytteissä pitää olla tunnistetiedot ja laboratoriokohtaiset lähetetiedot (Aho-Laukkanen & Mikkola 2021). Hiivat ja kosteat näytteet lähetetään kuivumisen estämiseksi geelikuljetusputkessa kylmäkuljetuksena (Sieni, viljely 2021), hilse-, kynsi- ja hiusnäytteet sen sijaan säilyvät hyvin huoneenlämmössä. Sieninäytteet tulee toimittaa laboratorioon kolmen vuorokauden kuluessa. (Aho-Laukkanen & Mikkola 2021; Sieni, viljely 2021).

2.2.2 Calcofluor-värjäys

Pintasienitutkimukseen kuuluu perinteisesti näytteen suora mikroskopointi eli natiivitutkimus ja viljely. Natiivitutkimusta voidaan käyttää löydöksen kliinisen merkityksen arviointiin, vaikka tulos viljelystä jäisikin negatiiviseksi. (Ihoinfektiot 2021.) Sieninäytteen natiivivärjäys on tutkimuksena nopea ja edullinen, mutta sen herkkyys riippuu osaavasta henkilökunnasta ja otetun näytteen laadusta. Värjäyksen perusteella ei ole mahdollista tunnistaa sienilajia. (Motamedi ym. 2017, 692-693; Pihet & Le Govic 2017, 171,174; Watanabe & Ishida 2017, 282-285; Walser & Bosshard 2018, 1490; Shimoyama ym. 2019, 675-676; Lin ym. 2021, 1; Falotico & Lipner 2022,1936-1937; Gupta ym. 2022, 3-4; Pospischil ym. 2022, 2.)

Mikroskooppisella tutkimuksella voidaan nähdä sienien osia, kun näytettä on käsitelty 5-40% KOH-liuoksella. Tällöin isommat keratinosyytit voidaan liuottamalla saada ohuemmiksi ja solurajat himmeämmiksi. KOH-liuoksen lisäksi voidaan käyttää myös esimerkiksi Calcofluor white -reagenssia, jolloin tutkimus tehdään fluoresenssimikroskoopilla. (Pihet & Le Govic 2017, 171-173; Falotico & Lipner 2022, 1936.) Fluoresenssivärjäys esimerkiksi Calcofluor white -reagenssilla lisää suoran mikroskopoinnin herkkyyttä (Pospischil ym. 2022, 2).

Värjäyksessä käytettävä Calcofluor white on fluoresoiva väriaine, joka sitoutuu sienien soluseinän sisältämään kitiiniin ja/tai selluloosaan, mikä mahdollistaa väriaineen käytön sienivärjäyksessä. Alkuperäiseen näytepurkkiin lisätään viljelyn suorittamisen jälkeen noin viisi tippaa 10 % KOH-liuosta ja näytettä liuotetaan vähintään 10 minuuttia ja enintään yön yli. Objektisille laitetaan ensin tippa Calcofluor white -liuosta, jonka jälkeen näyte lisätään puutikulla. Tämän annetaan seistä 1-2 minuuttia ennen peitinlasin laittamista. Värjäys katsotaan fluoresenssimikroskoopilla. Värjäyslöydös vastataan laboratoriotietojärjestelmään sienirihmasto ja/tai sieni-itiöitä. Tarvittaessa voidaan vastata hiivarihmaa ja/ tai -soluja. Esimerkiksi puuvillakuidut ja bakteerit saattavat fluoresoida, mutta niiden erottaminen sienirihmoista tapahtuu morfologian avulla. Jotkut sienet saattavat jäädä värjäytymättä ja fluoresoimatta aiheuttaen väärän negatiivisen tuloksen. (Nevala 2023c.)

2.2.3 Viljelymenetelmä

Sieniviljely on tutkimuksena tarkka, mutta viljelyvastauksen saaminen kestää viikosta viiteen viikkoon. Sieniviljelyyn liittyy korkea väärän negatiivisen vastauksen riski, koska viljely edellyttää elossa olevaa sienikasvua. (Motamedi ym. 2017, 692-693; Pihet & Le Govic 2017, 171,174; Watanabe & Ishida 2017, 282-285; Lin ym. 2021, 1; Falotico & Lipner 2022,1936-1937; Gupta ym. 2022, 3-4; Pospischil ym. 2022, 2.)

Pintasieniviljely tehdään Fimlab kliinisen mikrobiologian sienilaboratoriossa DTM- eli Dermatophyte test medium -agarmaljalle ja mikäli näytettä on riittävästi, viljellään myös Sabouraud-malja. Koko näytemateriaali viljellään sellaisenaan, mutta tarvittaessa isot kynnenpalat paloitellaan pienemmiksi. DTM-maljoja kasvatetaan huoneenlämmössä neljä viikkoa ja kasvatusta jatketaan yhden viikon ajan, mikäli värjäys on ollut positiivinen ja malja on negatiivinen neljän viikon kasvatuksen jälkeen. Sabouraud-maljoja kasvatetaan +35 °C lämpökaapissa kahden viikon ajan. DTM-maljoja tarkastellaan kasvun havaitsemiseksi kerran viikossa ja Sabouraud-maljoja kahdesti viikossa. (Nevala 2023b.)

Elatusainemaljoilla kasvavan sienilajin tarkka tunnistaminen on tärkeää löydöksen kliinisen merkityksen arvioinnissa, tartuntalähteen selvittämisessä sekä epidemiologisten riskien arvioinnissa (Pihet & Le Govic 2017, 169-180; Gräser & Saunte 2020, 218; Faramarzi ym. 2021, 2; Ihoinfektiot 2021; Kabtani ym. 2021, 10). Sienikasvusto voidaan tunnistaa mikroskopoimalla, massaspektrometrillä tai nukleiinihappopohjaisilla menetelmillä (Petrucci ym. 2020, 4; Ihoinfektiot 2021). Perinteiset menetelmät sienikasvuston tunnistamiseksi ovat riippuvaisia laboratoriohenkilökunnan osaamisesta (Hafirassou ym. 2017, 639; Gräser & Saunte 2020, 218; Faramarzi ym. 2021, 2; van Herk ym. 2023, 1).

Fimlab kliinisen mikrobiologian sienilaboratoriossa kasvusto tunnistetaan ensisijaisesti Vitek Prime -analysointilaitteella huomioiden vastauksessa pesäkkeen ulkonäkö. Jos tunnistaminen ei näin onnistu, tehdään tunnistus mikroskooppisen morfologian avulla. Natiivipreparaatti tehdään laittamalla objektilasille tippa sieninatiiviliuosta. Tämän jälkeen otetaan sienikasvustoa siten, että materiaalia pre-

paraattiin tulee pesäkkeen reunoilta ja keskeltä. Objektillasilla oleva näyte peitetään peitinlasilla ja tarkastellaan mikroskoopissa 10x ja 40x objektiiveilla. (Nevala 2023a.) Morfologisia tunnistuskriteereitä ovat pesäkkeen ulkonäkö, väri ja kasvunopeus (Petrucci ym. 2020, 4).

Mikroskopoinnissa nähty sienirihma ei välttämättä kasva viljelyssä. Tähän voi olla syynä riittämätön näytemäärä, ei-elossa oleva sienikasvu tai lääkehoito ennen näytteenottoa. (Pihet & Le Govic 2017, 175; Gräser & Saunte 2020, 218.) Väärään negatiiviseen vastaukseen voi olla syynä myös liian lyhyt kasvatusaika, väärä kasvatuslämpötila tai kontaminanttikasvu, joka peittää dermatofyytin kasvun (Pihet & Le Govic 2017, 175). Mikäli näytteestä löytyy homekasvua, on se yleensä merkki siitä, että näytteenottoa on huonosti puhdistettu. Tiedetyt homesienet, kuten *Scopulariopsis brevicaulis* ja jotkut *Fusarium*-lajit, voivat joskus olla kuitenkin myös opportunistisia infektiota aiheuttajia etenkin varpaan kynsissä. (Heikkilä ym. 2020c.)

2.3 Infektioiden hoito

Sieni-infektion hoidon tarkoituksena on poistaa patogeeni sieni ja palauttaa kohdealueen normaali tila. Hoitoprosessi on suhteellisen hidas. Sieni-infektioiden hoidon tulisi olla yksilöllistä, riippuvaista taudin vakavuudesta, infektoivasta patogeenista, hoidon hinnasta, potilaan rinnakkaisairauksista sekä lääketieteellisestä historiasta. Kynsi-infektioihin liittyy 20-25% uusiutumisen riski. Riskin pienentämiseksi on hyvä huolehtia esimerkiksi jalkojen pitäminen viileinä ja kuivina, kynsien pitäminen lyhyinä sekä kenkien käyttö kosteissa julkisissa tiloissa. (Falotico & Lipner 2022, 1939-1940, 1950.)

Sieni-infektioiden hoitoon käytettäviin lääkeaineisiin liittyy sivuvaikutuksia. Terbinafiinin sivuvaikutukset ovat lieviä, kuten päänsärkyä, kutinaa ja ruuansulatuselimistön vaivoja. Harvoin esiintyviä sivuvaikutuksia ovat maksatoksisuus ja makuaistin häiriöt. Itrakonatsolin sivuvaikutuksia ovat päänsärky, ylempät hengitystieinfektiot, vatsavaivat, hypertriglyseremia, kohonneet maksa-arvot ja harvoin perifeerinen neuropatia ja hepatiitti. (Falotico & Lipner 2022, 1940-1941.)

Huolestuttavaa sieni-infektioiden hoidon kannalta on lääkeresistenssin lisääntyminen etenkin *Tichophyton rubrumin* ja *Trichophyton mentagrophytesin* osalta (Pospischil ym. 2022, 2).

Ennen kuin lapsen hiuspohjan sieni-infektiota aloitetaan hoitamaan systeemilääkkeellä, suositellaan alaniiniaminotransferaasi-arvon (P -ALAT) tutkimista. Mikäli tulos on poikkeava tai tiedossa on maksasairaus, seurataan arvoa hoidon aikana. Perusverenkuvan seuranta harkitaan, mikäli lapsella on tiedossa oleva hematologinen sairaus. (Ihoinfektiot 2021.) Infektioiden hoitoa on kuvattu taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Sieni-infektioiden hoito (Ihoinfektiot 2021; Falotico & Lipner 2022, 1940, muokattu).

Infektioalue	Hoitomuoto	Hoito	Huomioita
kynsi	systemilääkitys	atsoli-ryhmän lääkkeet tai terbafiini, paikallishoito amorolfiinilakalla tueksi	kynnen kliininen paraneminen jatkuu lääkkeen käytön jälkeen vielä viikkoja
kynsi (lapset)			noudatetaan päänahansilsan hoito-ohjeita
varvasvälisilsa	paikallishoito	terbinafiini tai atsoli-johdos	
jalkapohja ja käsi	systemilääkitys		paikallishoito usean viikon ajan, mikäli systemilääkitystä ei voida käyttää
nivusalue	paikallishoito	terbinafiini- tai atsoli-voide	hankalaan infektiin lisäksi sisäinen sienilääke
vartalo	paikallishoito	klotrimatsoli, ekonatsoli, ketokonatsoli tai terbinafiini, tarvittaessa mikonatsoli	laaja-alaisten infektioiden hoitoon käytetään systemihoitoa
hiuspohja	systemihoito	terbinafiini, itrakonatsoli tai flukonatsoli	lasten infektioiden perusterveydenhuollosta konsultoidaan tarvittaessa erikoissairaanhoidon kanssa
ihon hiivainfektiot	antimykootinen voide tai puuteri	klotrimatsoli, nystatiini, mikonatsoli	tarvittaessa myös paikalliskortikosteroidi
<i>Malassezia</i> -hiivojen aiheuttama savipuoli	paikallishoito	atsolivoide, ketokonatsolishampoo, terbinafiinisumute tai -voide, seleenisulfidishampoo, laaja-alaiseen infektiin suun kautta otettava itrakonatsoli	savipuolen hoidossa on huomioitavaa, että infektio uusiutuu osalla potilaista helposti

3 REAALIAIKAINEN POLYMERAASIKETJUREAKTIO

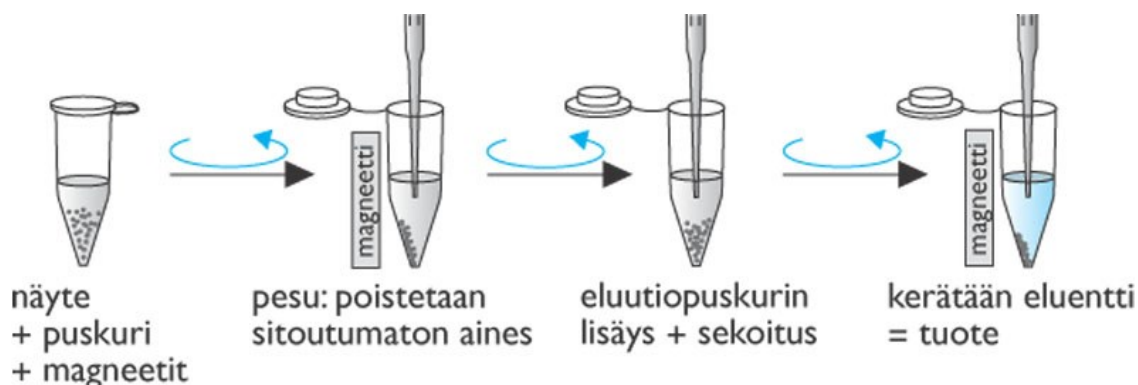
3.1 Polymeraasiketjureaktion periaate

Polymeraasiketjureaktiota (PCR) käytetään, kun halutaan monistaa DNA-jaksoja nukleotidijärjestykseltään tunnetun kahden DNA-jakson välistä. PCR:ssa käytetään korkeaa lämpötilaa kestävää eli termostabiilia DNA-synteesiä katalysoivaa entsyymiä eli DNA-polymeraasia, joka ei inaktivoidu korkeissakaan lämpötiloissa. Näitä polymeraaseja on eristetty esimerkiksi kuumissa lähteissä elävistä bakteereista, kuten *Thermus aquaticus* -bakteerista eristettyä *Taq*-polymeraasia. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 153; Zhu ym. 2020, 317.)

PCR-reaktiossa käytetään kahta erilaista, mutta tarkalleen tunnettua aluketta (primer), jotka ovat lyhyitä, synteettisiä ja yksinauhaisia ssDNA-fragmentteja. Alukkeet suunnitellaan niin, että ne kiinnittyvät eri juosteisiin kaksinauhaisessa DNA:ssa monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Monistettava alue on alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso. DNA:n mallina eli templaattina toimii yleensä kaksijuosteinen DNA. PCR-reaktiossa usein riittää, että DNA vapautetaan soluista, mutta DNA:n eristyksessä pyritään myös poistamaan häiritseviä ja estäviä eli inhiboivia tekijöitä. DNAasi-inhibiittorien avulla hidastetaan entsyymien hajotettavaa toimintaa ja tällä tavoin pyritään välttämään näytteen hajoaminen. (Suominen ym. 2013, 154.)

DNA:n puhdistamiseen on erilaisia menetelmiä. Silikamenetelmän yhtenä soveltuksena on magneettipartikkeliteknologiaan perustuvat menetelmät. Näissä menetelmissä DNA (tai RNA) sidotaan silikapäälystettyihin paramagneettisiin partikkeleihin. Näiden menetelmien etuna on, että ne ovat helposti automatisoitavissa ja mahdollistavat näin suurten näytemäärien käsittelyn. Näyteputkessa olevat magneettipartikkelit sidotaan putken tai kuopan pohjalle asettamalla riittävän voimakas magneetti kiinni putken tai kuoppalevyn pohjan ulkopuolelle. Tämän jälkeen on mahdollista imeä neste pois, jonka jälkeen voidaan pipetoida uusi liuos ja partikkelit saadaan vapautumaan loitontamalla magneetti riittävän kauas pohjasta. Näitä vaiheita toistetaan tarpeellinen määrä. (Suominen ym. 2013, 107;

Salgado & Hussain 2019, 119-120.) Magneettipartikkelien käyttö DNA:n puhdistuksessa on esitetty kuvassa 1.



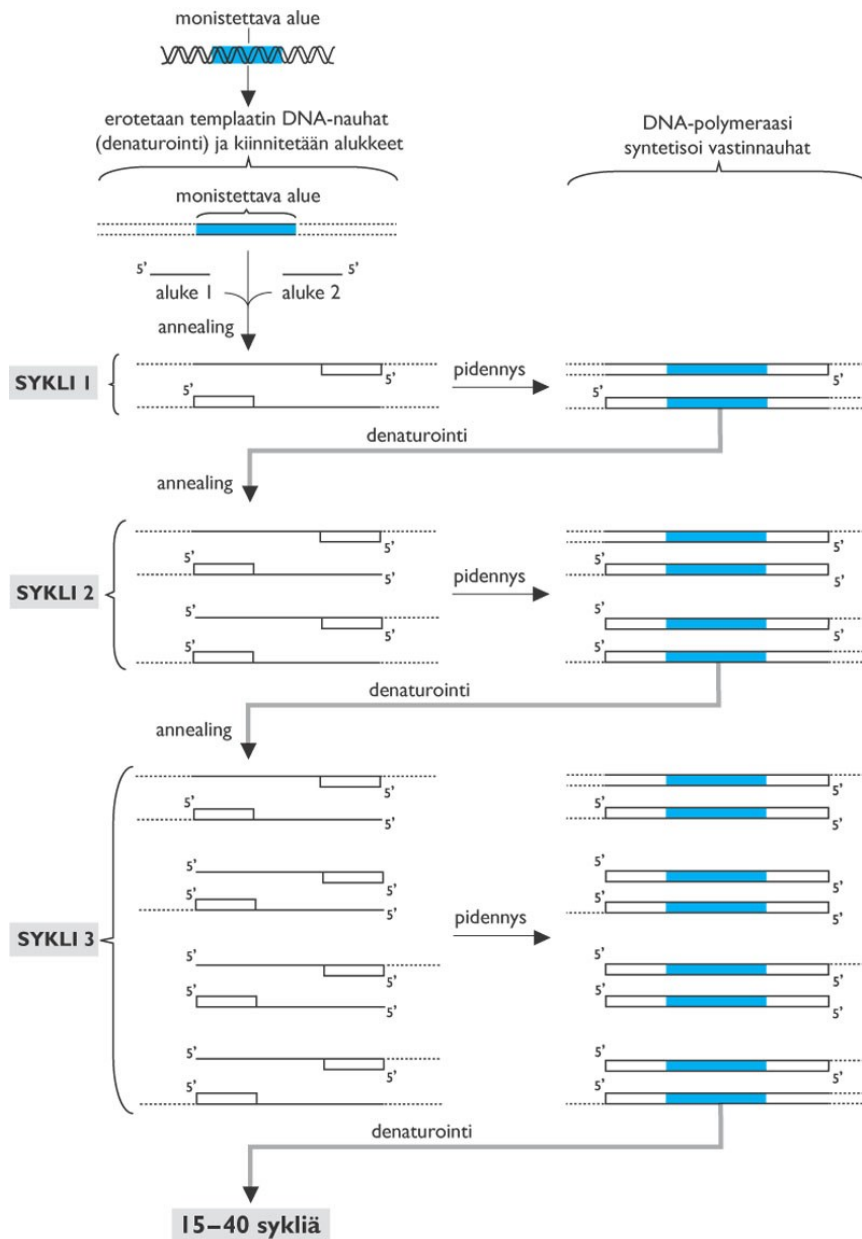
KUVA 1. DNA:n puhdistus magneettipartikkeleilla (Suominen ym. 2013, 107).

DNA:n eristyksen jälkeen tehdään varsinaiset monistusreaktiot, jotka aloitetaan templaatin denaturoinnilla kuumennuskäsittelyllä (Suominen ym. 2013, 154), jossa kaksijuosteinen DNA avataan yksijuosteiseksi ja entsyymittainen toiminta pysähtyy. Denaturaatiolämpötila, noin 93-96°C, hajottaa H-sidokset juosteiden väliltä. Lämpötilaa, jossa puolet kaksijuosteisesta DNA:sta on yksijuosteista, kutsutaan sulamislämpötilaksi eli T_m . (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 1.)

Denaturaation jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti alukkeiden kiinnittymiseksi templaattiin eli tapahtuu annealing-reaktio. Tämän lyhyen ajan kuluessa templaatti ei ainakaan kokonaan ehdi renaturoitumaan eli sitoutumaan takaisin kaksijuosteiseksi. Alukkeet ovat pienikokoisia ja nopeita, joten ne sitoutuvat templaattiin niille komplementaariseen kohtaan. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan, jolloin DNA-polymeraasi alkaa templaatin mukaisesti liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja (dNTP) aloittaen alukkeen 3'-päätä. Tätä vaihetta kutsutaan templaatin pidennysreaktioksi eli ekstensioksi, jolloin kummallekin templaatin nauhalle syntyy vastinnauha alukkeista alkaen. (Suominen ym. 2013, 154; Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 2.)

Muutaman minuutin kuluttua nauhan synteesi on valmis ja lämpötilaa nostetaan nauhojen irrottamiseksi jälleen toisistaan. Sykli on sarja, jossa tapahtuu peräkkäin denaturointi-, annealing- ja ekstensioreaktioita. Yhdessä syklissä syntyy kahdesta DNA-nauhasta neljä, joten syklejä toistamalla pienestä templaatti-DNA määrästä on mahdollista saada monistettua suuri määrä tarkalleen määriteltyjä

DNA-jaksoja. (Suominen ym. 2013, 154.) PCR-reaktion periaate on esitetty kuvassa 2.



KUVA 2. Polymeerasiketjureaktion periaate (Suominen ym. 2013, 157).

3.2 Reaaliaikainen PCR

PCR-menetelmien kliininen käyttö lisääntyi, kun kehitettiin kvantitatiivinen ja reaaliaikainen PCR eli qPCR, joka mahdollisti ei ainoastaan kohdenukleinihappojen havaitsemisen, mutta myös kvantitatiivisen analysoinnin (Suominen ym.

2013, 165; Kuypers & Jerome 2017, 1621; Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 3). qPCR edellyttää Thermo Cyclers -laitetta, jolla näytettä pystytään mittaamaan kesken PCR-syklin (Lee, Squirrel, Leslie & Brown 2013, 2; Suominen ym. 2013, 167).

Reaaliaikainen seuranta perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön. Väriaineessa oleva fluoresenssisignaali moninkertaistuu, kun se sitoutuu valmistuvaan kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen. (Suominen ym. 2013, 166-167.) Eksponentiaalisesti kasvavan monistuksen aikana kerättyä fluoresenssisignaalia käytetään mittaamaan halutun nukleinihapon määrää näytteessä (Lee ym. 2013, 2). Reaaliaikainen PCR paitsi nopeuttaa PCR-prosessia, mutta myös DNA-ristikontaminaatoriski pienenee (Suominen ym. 2013, 167; Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 4).

3.2.1 Fluoresoivat merkkiaineet ja detektio

Reaaliaikaisessa PCR:ssa on mahdollista käyttää joko kaksijuosteiseen DNA:han epäspesifisesti sitoutuvia fluoresoivia merkkiaineita tai fluoresenssi-merkittyjä spesifejä koettimia, jotka mahdollistavat jatkuvan monistumisen mittaamisen (Lee ym. 2013, 2-3; Kuypers & Jerome 2017, 1621; Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 4). qPCR:ssa yleisimmin käytetty kaksijuosteiseen DNA:han epäspesifisesti sitoutuva väriaine on SYBR Green I. DNA:han sitoutuneen väriaineen fluoresenssi on 1000 kertaa korkeampi kuin vapaana olevan väriaineen, joten sitä voidaan käyttää mittaamaan monistuvan tuotteen määrää. Väriaineen käyttö on edullista, mutta PCR-reaktion optimoinnissa on huomioitavaa amplifikaation spesifisyys sulamispisteanalyysin avulla. (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 4-5.)

Fluoresenssi-merkityt spesifit koettimet voidaan jakaa hydrolyysikoettiin ja hybridisaatiokoettiin. Fluoresenssisignaalin mittaaminen perustuu joko fluoresenssin aiheuttaman resonanssienergian siirtoon (FRET) tai fluoresenssin sammuttamiseen. TaqMan-koettimet ovat yleisesti tunnettuja hydrolyysikoettimia ja ne koostuvat 5'-päädyssä olevasta fluoresoivasta reportterista ja 3'-päädyssä ole-

vasta sammuttajasta. Kun reportteri ja sammuttaja ovat kiinni toisissaan, reportterin fluoresenssi estyy. Koettimien käyttö perustuu niiden kykyyn hyödyntää termostabiilien polymeeraasien 5'-eksonukleaasi aktiivisuutta. Monistusreaktion annealing-vaiheessa koetin kiinnittyy kohdesekvenssiin ja ekstensiossa polymeeraasi irrottaa 5'-päädystä reportterin. Kun koettimen reportteri ja sammuttaja irtoavat toisistaan, voidaan mitata reportterista vapautuva fluoresenssi. Spesifien koettimien käyttö mahdollistaa multiplex-sovellukset. (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 5-7.)

Hybridisaatiokoettimet eivät hajoa PCR-reaktiossa hydrolyysikoettimien tavoin. Hybridisaatiokoettimia ovat esimerkiksi Molecular beacon -, Scorpion- ja FRET-koettimet. Hybridisaatiokoetinmenetelmät käyttävät kahta aluketta ja kahta sekvenssispesifiä koetinta. Jokaisella koettimella on yksi leima, 3'-päädystä sijaitseva luovuttaja ja 5'-päädystä vastaanottaja. Luovuttajan emissiospektri ylittää vastaanottajan spektrin. Koettimet kiinnittyvät lähelle toisiaan ja näin ollen mahdollistuu fluoresenssin aiheuttaman resonanssienergian siirto. Reaktiossa tarkkaillaan luovuttajan siirtämästä fluoresenssin resonanssienergiasta peräisin olevaa vastaanottajan emission aallonpituutta eli vastaanottajan fluoresenssin määrä on suoraan verrannollinen näytteen PCR-tuotteeseen. Kahden itsenäisen koettimen käyttö mahdollistaa niiden joustavan ja spesifin suunnittelun sekä sulamiskäyräanalyysin. (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 7-8.)

Detektiolla tarkoitetaan PCR-tuotteen muodostaman fluoresenssisignaalin havaitsemista PCR-laitteella. qPCR:ssa havaitun fluoresenssin määrä on suoraan verrannollinen näytteessä olevaan tukittavaan DNA:han. Fluoresenssin määrä voidaan nähdä monistuskäyränä. Ensimmäisten PCR-sykliden aikana vapautuvaa fluoresenssia ei voida erottaa taustasta. Eksponentiaalisen monistuksen aikana myös fluoresenssi kasvaa eksponentiaalisesti ennen kuin kasvu saavuttaa taantumisvaiheen. Tässä kohtaa havaitun fluoresenssin määrä ei enää kasva. Kvantitatiivinen analyysi on mahdollista vain eksponentiaalisen fluoresenssin kasvun aikana. Monistuksen kynnyisarvo eli Ct-arvo saadaan, kun havaitun fluoresenssin määrä ylittää taustafluoresenssin. Kohde-DNA:ta on näytteessä sitä enemmän, mitä pienempi sen Ct-arvo on. (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 10-11.)

3.2.2 Multiplex-PCR

Multiplex-PCR tarkoittaa, että yhdessä PCR-putkessa voidaan samanaikaisesti eri alukepareja käyttäen tuottaa eri pituisia amplikoneja eli monistuneita kohdesekvenssejä (Zhu ym. 2020, 317). Tämä säästää huomattavasti aikaa ja työtä sekä vähentää halutun kohteen tunnistamiseen näytteestä vaadittavien reaktioiden määrää. Multiplex-PCR-menetelmän käyttö voi johtaa kuitenkin ongelmiin, kuten väärin PCR-tuotteiden muodostumiseen. Alukkeiden tulee soveltua menetelmää käytettäessä samaan annealing-lämpötilaan. Myös monistustuotteiden pituuksien tulee olla samankaltaisia, jotta vältetään monistumisen kohdentuminen lyhyempiin kohteisiin pidempien sijaan. (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 3.)

Seegene kehitti multiplex qPCR -tekniikan, MuDT™ (Multiple Detection Temperatures), joka mahdollistaa useiden kohteiden havaitsemisen yhdessä fluoressikanavassa ilman sulamiskäyräanalyysiä. Tämä mahdollistuu, kun kohde-DNA:illa on erilaiset sulamislämpötilat (T_m) ja fluoresenssi mitataan samassa kanavassa eri lämpötiloissa. MuDT™ hyödyntää TOCE™-tekniikkaa (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension), jossa käytetään oligonukleotideja kohde-DNA:n tunnistamiseksi. TOCE™ hyödyntää epäsuoran signaalin luomiseen kahta komponenttia, jotka on nimetty syöttäjäksi ja sieppariksi. Jokaisessa syklistä syöttäjä kiinnittyy spesifisesti kohde-DNA:han ja polymeraasientsyymi pilkkoo sen valmistuvasta DNA-nauhasta. Tällöin vapautuu leimaamaton aluke, joka kiinnittyy fluoressissisammutettuun molekyyliin eli sieppariin. Ekstensio-vaiheessa sieppariin kiinnitetty fluoresoiva reportteri etäännyttävä sammuttajasta muodostaen fluoresenssin, joka on suoraan verrannollinen kohde-DNA:n määrään. (Lee, Kim, Lee & Chun 2014, 1.)

3.3 PCR-tutkimuksen haasteet

PCR on menetelmänä herkkä ja tästä syystä se on herkkä myös kontaminaatiolle eli muualta kuin varsinaisesta monistettavasta näytteestä peräisin olevasta pienestä määrästä DNA:ta. Mikäli laboratoriossa on edellisistä PCR-reaktioista peräisin olevia tuotteita ja ne joutuvat vahingossa reaktioputkeen, kontaminoivakin DNA monistuu. Reagenssikontaminaatiot voivat myös aiheuttaa virheellisiä tuloksia PCR-reaktioon. Kontaminaatioita vältetään tila- ja logistiikkajärjestelyillä ja noudattamalla hyviä laboratoriotyöskentelytapoja. (Suominen ym. 2013, 165; Lee, Leslie & Squirrel 2019, 147; Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 13.)

PCR-reaktiossa käytettävillä kontrolleilla varmistetaan oikeat PCR-reaktion tulokset. Negatiivista kontrollia käytetään selvittämään mahdollisia epäspesifisiä eli vääriä positiivisia tuloksia. (Suominen ym. 2013, 154.) Reaktion sisäinen kontrolli (IC) on toinen kohdemolekyylä, jonka monistuminen voidaan mitata, mutta erottaa muista tuotteista samassa putkessa. Ihannetilanteessa sisäinen kontrolli voi kontrolloida melkein mitä tahansa reaktion reagenssia ja PCR-laitteen toimintoja, mutta ei toisen kohde-DNA:n spesifiä aluketta. Multiplex-sovelluksissa PCR-putkea ei tarvitse uudelleen avata, joten sisäistä kontrollia voidaan käyttää kontrolloimaan negatiivisia näytteitä. Samalla, kun putkia ei tarvitse uudelleen avata, siirtymä näytteiden välillä vähenee ja tämä vähentää väärin positiivisten vastausten riskiä. (Lee ym. 2019, 137-138.) PCR-tutkimus on kuitenkin riippuvainen näytteen sisältämän nukleiinihapon laadusta (Zhu ym. 2020, 321).

3.4 PCR-tutkimus sienilajien tunnistamiseksi

Pintasieninäytteiden nukleiinihappotutkimuksia (NhO-tutkimuksia) tehdään osassa Suomen laboratorioista. Sieniviljelyä ei tarvita, mikäli nukleiinihappo-osoitusmenetelmällä on saatu positiivinen tulos. (Ihoinfektiot 2021.) Nukleiinihapon osoitusmenetelmillä pystytään osoittamaan sienten nukleiinihappoa suoraan näytteestä. Nämä menetelmät ovat sieniviljelyä nopeampia ja herkempiä. (Mota-medi ym. 2017, 693; Verrier & Monod 2017, 193-202; Álvarez-Mosquera ym. 2018, 778; Sherman ym. 2018, 125; Shimoyama ym. 2019, 676; Petrucelli ym.

2020, 4; Faramarzi ym. 2021, 5; Ihoinfektiot 2021; Kabtani ym. 2021, 2; Trovato ym. 2022, 540; van Herk ym. 2023, 1.)

Nukleiinihappo-osoitusmenetelmien tunnistamat sienet kuitenkin riippuvat käytössä olevasta laboratorikohtaisesta menetelmästä. Tästä syystä tutkimustuloksen jäädessä negatiiviseksi, kun epäily sieni-infektiosta on vahva, tulee ottaa viljelynäyte tutkimukseen kuulumattomien sienilajien tunnistamiseksi. (Sherman ym. 2018, 125; Gräser & Saunte 2020; Ihoinfektiot 2021; Lin ym. 2021, 5.) Esimerkiksi Faramarzi ym. (2021, 6) toteavat tutkimuksessaan, että heidän käyttämänsä PCR-menetelmää ei voida käyttää pintasieridiagnostiikassa yksinään.

PCR-testit eivät yleensä myöskään erottele ihmisiä tai eläimiä infektoivia sienilajeja toisistaan, mikä olisi hoidon kannalta oleellista (Hayette ym. 2019, 281; Gräser & Saunte 2020; Kabtani ym. 2021, 10). Myös ei-dermatofyytit rihmasienet saattavat aiheuttaa pintasierien-infektioita, mutta näitä ei PCR-testeillä yleensä pystytä tunnistamaan (Gräser & Saunte 2020; Kabtani ym. 2021, 10). Álvarez-Mosquera ym. (2018, 780) toteavat omassa tutkimuksessaan menetelmän haasteena olevan lajitasoisen tunnistamisen. Infektion aiheuttajan tunteminen on kuitenkin tärkeää uusinta- ja sekundaari-infektioiden välttämiseksi (Kabtani ym. 2021, 10).

Perinteiseen pintasierienviljelyyn verrattuna PCR-tutkimuksesta vastaus saadaan nopeasti. Álvarez-Mosquera ym. (2018, 781) mukaan nopeampi diagnostiikka voi tehostaa potilaiden hoitoa ja sitä kautta vähentää kustannuksia. Nopeampi diagnostiikka myös vähentää ylimääräisten sienilääkkeiden käyttöä (van Herk ym. 2023, 3) ja tätä kautta lääkkeisiin liittyviä sivuvaikutuksia sekä resistenttien kantojen määrän lisääntymistä (Trovato ym. 2022, 543). Nopeutetun diagnostiikan lisäksi RT-PCR-tutkimus mahdollistaa myös suurempien näytemäärien tutkimisen ja vähentää laboratoriohenkilökunnan työajan tarvetta (Lin ym. 2021, 1-2).

PCR-tutkimusta käytettäessä on huomioitava siihen liittyvät rajoitukset (Hafirasou ym. 2017, 643; van Herk ym. 2023, 4). PCR-tutkimuksessa kontaminaatiot voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vastauksia, mutta väärin negatiivisten vastausten riski on PCR-tutkimuksessa vähäinen (Watanabe & Ishida 2017, 282-286; Falotico & Lipner 2022, 1937). Väärän negatiivisen PCR-tuloksen voi selittää

näytteiden epätasalaatuisuus (Álvarez-Mosquera ym. 2018, 781-782; Koo ym. 2019; Faramarzi ym. 2021, 6; Lin ym. 2021, 4; van Herk ym. 2023, 4.), PCR-inhibiittori (Álvarez-Mosquera ym. 2018, 781-782; Hayette ym. 2019, 281; van Herk ym. 2023, 4) sekä kohdegeenien vaihtelu PCR-menetelmien välillä (Faramarzi ym. 2021, 6; van Herk ym. 2023, 4). PCR-tutkimus on kallis perinteisiin menetelmiin verrattuna (Falotico & Lipner 2022,1937; Watanabe & Ishida 2017, 282-286) ja oikean diagnoosin varmistamiseksi tarvitaan riittävän runsas näyte (Álvarez-Mosquera ym. 2018, 782).

4 VERIFIOINTI

Laboratoriossa tulee käyttää sellaisia tutkimusmenettelyjä, jotka ovat tutkimuksille tarkoituksenmukaisia ja täyttävät laboratoriopalveluiden käyttäjien tarpeet. Laboratoriossa käytetään vain validoituja menetelmiä ja niitä tulee arvioida ja niiden tulee antaa hyväksyttäviä tuloksia ennen lääketieteellistä käyttöä. Kaikki tutkimusmenettelyt dokumentoidaan. (SFS-EN ISO 15189 2013, 46.) Laboratoriossa käytössä olevat menetelmät valitaan niin, että käyttötarkoitus huomioiden saavutetaan riittävän hyvä analyttinen laatutaso. Menetelmien vaihtaminen pitää perustua niiden toimivuuteen, käytettävään laitteistoon tai reagensseihin liittyviin syihin. (Kärki 2022, 12.) Dermatofyytti-PCR-tutkimuksen käyttö perinteisen sieniviljelyn rinnalla tai sen sijaan on lähtöisin asiakkaiden tarpeesta saada vastaukset nopeammin kuin perinteisestä sieniviljelmästä ne on mahdollista saada (Seiskari 2022b). Ennen kuin uusi menetelmä voidaan ottaa käyttöön, on sen toiminta koestettava eli testattava (Kärki 2022, 12).

Verifiointi eli todentaminen on objektiiviseen näyttöön perustuvaa varmistumista määriteltyjen vaatimusten täyttymisestä (Hägg 2016, 7; Validointi ja verifiointi 2022). Aiemmin esimerkiksi menetelmävalmistajan toimesta validoitu menetelmä verifioidaan ennen sen käyttöönottoa (Hägg 2016, 8; Kärki 2021, 2-3). Tätä varten tehdään suunnitelma, jossa kuvataan muun muassa testattava menetelmä, vertailumenetelmä, koestajat, verifiointin ajankohta ja näyttemateriaali. Verifiointista laaditaan raportti, jossa kuvataan esimerkiksi tulokset ja johtopäätökset. (Kärki 2021, 2-3.) Tässä opinnäytetyössä verifioidaan valmistajan validoima dermatofyytti-PCR-kitti.

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena on verifioida dermatofyytti-PCR-tutkimus mikrobiologian laboratorion käyttöön. PCR-tutkimusta verrataan nyt käytössä olevaan viljelyyn ja suoraan värjäykseen perustuvaan menetelmään pintasienidiagnostiikassa. Opinnäytetyössä selvitetään myös, kuinka PCR-tutkimuksen käyttö vaikuttaa vastausviiveeseen pintasieninäytteiden diagnostiikassa.

Tavoitteena tässä opinnäytetyössä on nopeuttaa ja parantaa pintasienien tunnistusta.

Työssä vastataan seuraaviin kysymyksiin:

1. Mikä on PCR-tutkimuksen herkkyys ja tarkkuus pintasieni-infektioiden diagnostiikassa viljelyyn verrattuna?
2. Kuinka paljon nopeammin PCR-tutkimuksella saadaan vastaus pintasieninäytteestä viljelyyn verrattuna?

6 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tässä opinnäytetyössä käytettiin kvantitatiivista tutkimusmenetelmää. Keskeistä on, että aiemmista tutkimuksista tehdään johtopäätöksiä, tutustutaan aiempiin teorioihin, esitellään hypoteesi ja määritellään käsitteet. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 140.) Kvantitatiivisessa tutkimuksessa hyödynnetään määrien jakaumia, muutoksia ja eroja. Näillä kuvataan ja tulkitaan tutkittavaa ilmiötä, havaittuja yhteyksiä ja vaikutussuhteita. Analysointi kvantitatiivisessa tutkimuksessa tapahtuu tilastollisesti. (Hirsjärvi ym. 2009, 140; Ronkainen, Pehkonen, Lindblom-Yläne & Paavilainen 2011, 83.)

Kvantitatiivinen tutkimus edellyttää, että otos on riittävän suuri ja edustava. Tuloksia pyritään yleistämään tutkittua otosta suurempaan joukkoon tilastollisen päättelyn keinoin. Tuloksien havainnollistamiseen voidaan käyttää kuvia ja taulukoita. (Heikkilä 2014, 15.) Tämän opinnäytetyön otos oli ensisijaisesti tietynä ajanjaksona otetut, riittävän runsaat ja Calcofluor-värjäyksessä positiiviset pintasieninäytteet. Tämän lisäksi otosta täydennettiin värjäysnegatiivisilla näytteillä ja tunnetuilla sienikannoilla mahdollisimman edustavan otoksen saavuttamiseksi.

Tutkimus suoritettiin vertailevana ja kokeellisena tutkimuksena. Kokeellisessa tutkimuksessa pyritään tutkimaan tietyn tai tiettyjen muuttujien vaikutus vakioimalla muut tekijät. Tutkimuksessa selvitetään pitääkö ennalta suunniteltu oletta-
mus paikkaansa. (Heikkilä 2014, 19.) Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää, tunnistaaako dermatofyytti-PCR herkemmin, tarkemmin ja nopeammin dermatofyytin pintasieninäytteistä kuin perinteinen sieniviljely. Molemmat tutkimukset suoritettiin samasta näytekäytöstä, jotta näytteet olivat mahdollisimman vertailukelpoiset suhteessa toisiinsa.

6.1 Tutkimusaineisto

Tutkimusaineistona oli Fimlab mikrobiologian sienilaboratorioon tutkimuksen teon aikana saapuneita pintasieninäytteitä kynnestä, ihosta ja hiuspohjasta sekä

pakastettuja kontrollikantanäytteitä. Potilaat saivat vastauksen Calcofluor-värjäyksestä ja pintasieniviljelystä käytössä olevan menetelmän mukaisesti. Näytteet käsiteltiin laboratoriossa käytössä olevalla juoksevalla numeroinnilla ja näin mahdollistettiin tietosuojan säilyminen. Tutkimusaineistona oli 80 riittävän runsasta pintasieninäytettä Fimlabin toimialueelta. Näytteet oli otettu marras-joulukuun aikana 2022 muovisiin kierrekorkillisiin näytteenottopurkkeihin. Kontrollikantoja tutkittiin 13 kappaletta, joten tutkimusaineiston koko yhteensä oli 93 näytettä. Koska yhden potilasnäytteen pipetointi epäonnistui eristysvaiheessa, ei sille voitu suorittaa PCR-tutkimusta, joten todellinen tutkimusaineisto oli 92 näytettä.

Riittävän runsaista potilasnäytteistä otettiin ensin puutikulla näytteeksi maksimissaan kolme ihon, kynnen tai hiuksen palasta 1,5 ml:n eppendorf-putkeen. Eppendorf-putket, joissa näyte oli, numeroitiin samalla juoksevalla numeroinnilla kuin värjäys- ja viljelynäytteet. Tämän jälkeen tehtiin normaali sieninäytteen viljely ja Calcofluor-värjäys työhjeen mukaisesti. Kerätyistä PCR-näytteistä otettiin tutkimukseen mukaan aluksi värjäyspositiiviset näytteet. Myöhemmin tutkimuksen aikana otettiin mukaan myös värjäysnegatiivisia näytteitä PCR-tutkimukseen saattamiseksi huomioiden kuitenkin, että tutkimukseen saataisiin myös hiusnäytteitä. Kerätyt PCR-näytteet säilytettiin huoneenlämmössä sienilaboratoriossa ennen PCR-esikäsitteilyn tekemistä. Näytteiden keräämiseen osallistuivat sienilaboratoriossa kyseisenä ajanjaksona työskennelleet laboratoriohoitajat.

Ensimmäiseen PCR-ajoon kerättiin kolmen vuorokauden ajalta Calcofluor-värjäyksessä positiiviset riittävän runsaat näytteet, joita oli 18 kappaletta. Toisessa PCR-ajossa tutkittiin 29 potilasnäytettä, joista yksi oli Calcofluor-negatiivinen näyte hiuspohjasta. Näytteet toiseen PCR-ajoon oli otettu 23.11.-2.12.2022. Kaikki kyseisenä aikana laboratorioon saapuneet riittävän runsaat ja Calcofluor-värjäyksessä positiiviset näytteet otettiin mukaan tutkimukseen. Värjäyksessä negatiiviseksi jäänyt näyte otettiin mukaan, jotta tutkimukseen saatiin näyte, joka sisälsi hiusta. Kolmannessa PCR-ajossa tutkittiin 33 potilasnäytettä, joista 10 oli Calcofluor-värjäyksessä negatiivisia ja 23 positiivista. Näytteet otettiin mukaan tutkimukseen niiden saapumisjärjestyksessä. Tämän lisäksi tutkittiin 13 tunnettua sienikantaa, joista neljä oli ATCC-kantaa ja loput yhdeksän laaduntarkkailunäytteitä. Sienikannat otettiin -70°C säilytetyistä maito- ja helmikannoista viljellen ne DTM-maljalle +35°C lämpökaappiin kasvun nopeuttamiseksi. Sienikasvua otettiin

puutikulla eppendorf-putkeen maljalta arviolta saman verran kuin potilasnäytettä oli otettu. Kolmannen PCR-ajon potilasnäytteet oli otettu 7.-16.12.2022.

6.2 PCR-näytteiden esikäsittely

PCR-näytteiden käsittely suoritettiin menetelmän edustajan antaman esikäsitteilyohjeen mukaisesti sienilaboratoriossa laminaarivirtauskaapissa. Työskentely suoritettiin huolellisesti suojakäsineet kädessä avaten yhden näyteputken kerrallaan. Eppendorf-putkeen lisättiin 200µl AL-puskuria (Buffer AL, Qiagen). Tämän jälkeen näyteputkiin lisättiin 15µl proteinaasi K -liuosta (Seegene). Näytteitä sekoitettiin voimakkaasti 30 sekunnin ajan. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin yön yli huoneenlämmössä sienilaboratoriossa.

Inkuboinnin jälkeen näyteputkiin lisättiin 10µl proteinaasi K-liuosta. Näytteet sekoitettiin voimakkaasti 30 sekunnin ajan. Tämä työvaihe suoritettiin vetokaapissa PCR-eristysautomaattien laboratoriotilassa. Esikäsitteilyn jälkeen näytteille suoritettiin PCR-tutkimus.

6.3 Seegenen Novaplex™ Dermatophyte Assay

Pintasienien PCR-tutkimus suoritettiin Seegenen menetelmällä. Novaplex™ Dermatophyte Assay on mahdollista tehdä iho-, hius- ja kynsinäytteistä. Sekä eristys että PCR-ajo voidaan suorittaa automaateilla. Novaplex™ Dermatophyte Assay sisältää 28 pintasieni-infektion aiheuttajaa. Menetelmällä on mahdollista tunnistaa yhdestä putkesta *Trichophyton rubrum complex*, *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Microsporum spp.*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum* ja *Candida albicans*. (Bühlmann 2022.) Menetelmä kattaa yli 99% kliinisissä pinnallisissa sieniviljelynäytteissä ilmenevät dermatofyytit, mutta hieman huonommin niissä ilmenevät *Candida*-lajit. Valtaosa eli noin 92% pintasieniviljelyn löydöksistä on dermatofyyttejä tai menetelmän kattavaa *Candida albicansia*. Menetelmä ei kata homeita, joiden osuus kliinisissä näytteissä todetuista löydöksistä on kuitenkin alle 5%. (Seiskari 2023.) Taulukossa 4 on tarkemmin eritelty Novaplex™ Dermatophyte Assay:n tunnistamat pintasieni-infektion

aiheuttajat. *T. tonsurans* on mahdollista tunnistaa sekä osana *Trichophyton mentagrophytes complex*:a että omanaan *Trichophyton tonsurans*.

TAULUKKO 4. Novaplex™ Dermatophyte Assay:n tunnistamat pintasieni-infektion aiheuttajat (Bühlmann 2022, muokattu).

PCR-tutkimuksesta saatu tulos	Tunnistettavat sienilajit
<i>Trichophyton rubrum complex</i>	<i>T. rubrum</i> <i>T. balcaneum</i> <i>T. circonvolutum</i> <i>T. gourvilii</i> <i>T. kuryangei</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. yaoundei</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes complex</i>	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. benhamiae</i> <i>T. bullosum</i> <i>T. concentricum</i> <i>T. erinacei</i> <i>T. eriotrephon</i> <i>T. equinum</i> <i>T. interdigitale</i> <i>T. quinckeanum</i> <i>T. schoenleinii</i> <i>T. simii</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. verrucosum</i> <i>T. cf. schoenleinii/quinckeanum</i>
<i>Microsporum spp</i>	<i>M. audouinii</i> <i>M. canis</i> <i>M. ferrugineum</i>
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>

Menetelmä on toistaiseksi hyväksytty tutkimuskäyttöön, mutta valmistajan suunnitelmassa on hankkia menetelmälle CE-merkintä ja laajentaa käyttö klinisiin tarkoituksiin (Seiskari 2023). Tulosten luotettavuus riippuu oikeasta näytteen otosta, säilytyksestä, kuljetuksesta ja tutkimuksen suorituksesta. Novaplex™ Dermatophyte Assay hyödyntää Seegenen MuDT™-teknologiaa, joka mahdollistaa monien Ct-arvojen mittaamisen yhdessä fluoresenssikanavassa ilman sulamiskäyräanalyysia RT-PCR-laitteessa. Menetelmässä käytetään sisäistä kontrollia (IC) koko prosessin arvioimiseen näytteenotosta nukleinihappoeristykseen kuin

myös tunnistamaan PCR- inhibitio. Pidennysreaktiotuotteen käyttäytymistä kontaminanttina ehkäisee Uracil-DNA glycosylase (UDG)-dUTP. (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 3, 5.)

Tässä tutkimuksessa nukleiinihapon eristys pintasierinäytteestä tehtiin laboratoriossa olevalla Seegenen STARlet IVD-laitteella. Näytepakkaus sisältää reagenssit 100 PCR-reaktioon ja se tulee säilyttää $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Ylimääräistä sulattamista ja uudelleen jäädyttämistä tulee välttää, koska se voi vähentää testin herkkyyttä. (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 6.) Näytepakkauksen sisältämät reagenssit on lueteltu taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Dermatofyytti-PCR-kitin sisältämät reagenssit (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 6, muokattu).

Reagenssi	Sisältö
Primer	MuDT Oligo Mix (amplifikaatio- ja detektioreagenssi)
Enzyme	DNA-polymeraasi Uracil-DNA glycosylase (UDG) Puskuri (sisältää dNTP:t)
Buffer	Reaaliaikaisen PCR:n puskuri (sisältää BSA ja glyserolia)
Control +	Positiivinen kontrolli (sisältää kohdekloonit ja IC)
Control IC	Sisäinen kontrolli
Water	RNAasi-vapaa vesi

PCR-reaktion monistus ja tulosten analysointi tapahtui Bio-Rad:n CFX96™ -laitteella. Näytemäärä PCR-tutkimuksessa on 20 μl . Käytetyt fluoroforit ovat FAM, HEX, Cal Red 610 ja Quasar 670. PCR-reaktion vaiheet, syklit, lämpötilat ja kesto on kuvattu taulukossa 6. Fluoresenssi mitataan vaiheissa 7 ja 8 lämpötilojen ollessa 60°C ja 72°C . (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 12-13.)

TAULUKKO 6. PCR-reaktion vaiheet (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 12, muokattu).

Vaihe	Syklien määrä	Lämpötila	Kesto
1	1	95°C	15 min
2	5	95°C	10 s
3		60°C	15 s
4		72°C	10 s
5	paluu sykliin 2, 4 kertaa		
6	40	95°C	10 s
7		60°C	15 s
8		72°C	10 s
9	paluu sykliin 6, 39 kertaa		

Tulosten hyväksymisessä huomioidaan positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Taulukossa 7 on kuvattu kriteerit, joiden tulee täyttyä, jotta tulokset voidaan hyväksyä. Mikäli näin ei ole, tulee PCR-reaktio uusiksi. Taulukosta nähdään myös, mitä fluoroforia kunkin analyysin tunnistamiseen käytetään. (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 20, 31.)

TAULUKKO 7. PCR-reaktion kontrollien hyväksyminen (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 20, muokattu).

Kontrolli	Tulos							automaattinen tulkinta
	FAM (C _t)		HEX (C _t)		Cal Red 610 (C _t)		Quasar 670 (C _t)	
	CA	TMC	Msp	TT	EF	TRC	IC	
DMTP positiivinen kontrolli	≤ 35	≤ 35	≤ 35	≤ 35	≤ 35	≤ 35	≤ 35	positiivinen kontrolli (+)
negatiivinen kontrolli	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	negatiivinen kontrolli (-)

Kontrollien ollessa hyväksytyjä, analyysien tulkinta tapahtuu taulukon 8 mukaan. Kun C_t-arvo on vähintään 35 tai sen yli, tunnistaa menetelmä analyysin ja sisäisen kontrollin. (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 31.)

TAULUKKO 8. PCR-tulosten tulkinta (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 31, muokattu).

Analyytti	C _t -arvo	Tulos
kohde	≤ 35	havaittu (+)
	>35 tai N/A	ei havaittu (-)
IC	≤ 35	havaittu (+)
	>35 tai N/A	ei havaittu (-)

Positiivisen kohdepatogeenin havaitseminen ei edellytä positiivisen sisäisen kontrollin havaitsemista Quasar 670 kanavassa. Heikko tai negatiivinen sisäinen kontrolli johtuu riittämättömästä näytteestä, käsittelystä tai PCR-inhibiittorista. Suuri konsentraatio kohdeanalyyttiä voi johtaa sisäisen kontrollin inhibitioon. Tällöin näyte tulee laimentaa suolaliuokseen ja uusia testi eristyksestä alkaen. (Novaplex™ Dermatophyte Assay n.d., 32, 35.)

PCR-ajo käynnistettiin iltapäivällä, kun kyseisellä laitteella tehtävät laboratorion potilasnäytteet oli tutkittu. Tästä syystä tulokset PCR-tutkimuksesta valmistuivat vasta työajan päätyttyä. Tässä työssä menetelmiin kuluneen ajan vertailua varten PCR-tuloksen valmistumispäivämäärä on se, kun tulokset olivat valmiina, vaikka todellisuudessa ne olisi vastattu potilaalle vasta seuraavana päivänä.

6.4 Tutkimusaineiston analysointi

Tutkimuksesta saatu aineisto kerättiin Microsoft Office Excel -taulukkoon, josta se siirrettiin IBM SPSS Statistics Data Editor -ohjelmaan tilastollista analysointia varten. SPSS-ohjelmassa aineisto koodattiin analysoinnin mahdollistamiseksi. Näytelaatu ja eri menetelmillä saadut potilasnäytteiden tulokset muutettiin numeraalisiksi arvoiksi, joita analysoitiin tilastollisesti. Tutkimukseen kuluneen ajan vertailua varten päivämäärät muutettiin kokonaisiksi vuorokausiksi näytteenotto-päivämäärän ollessa 0-ajankohta.

Aineistosta laskettiin frekvenssit eri ryhmien vertailua varten ja dermatofyytti-PCR-tutkimuksen herkkyuden ja tarkkuuden selvittämiseksi. Lisäksi käytettiin ristiintaulukointia selventämään eri näytelaatujen tulosten vaihtelua. Tutkimukseen kuluneen ajan tilastollista merkittävyyttä tutkittiin one sample t-testin avulla.

Diagnostisen testin herkkyyttä ja tarkkuutta arvioidaan vertaamalla sitä niin sanottuun kultaiseen standardiin (Uhari 2014, 29), joka tässä tutkimuksessa on sieniviljely. Herkkyyttä ja tarkkuutta on arvioitu tässä tutkimuksessa myös vertaamalla PCR-tutkimusta sekä viljelyn että värjäyksen tuloksiin yhteensä. Diagnostisen testin herkkyys eli sensitiivisyys on testillä oikein sairaksi diagnosoitujen potilaiden osuus kaikista sairaista. Oikein terveiksi diagnosoitujen osuus kaikista terveistä kuvaa puolestaan testin spesifisyyttä eli tarkkuutta. Nämä tunnusluvut eivät ole riippuvaisia sairauden yleisyydestä, koska tunnusluvut lasketaan vain sairaiden tai terveiden joukossa. Tästä syystä ne ovat yleistettävissä eri potilasaineistoihin. (Uhari 2014, 29-30.)

Diagnostisen testin tunnuslukujen laskeminen tapahtuu taulukkoon 9 kuvatun nelikentän avulla. Tässä tutkimuksessa PCR-tutkimukselle laskettiin sen herkkyys ja tarkkuus. Dermatofyytti-PCR-tutkimuksen herkkyys laskettiin kaavalla $a/(a+c)$ ja tarkkuus $d/(b+d)$.

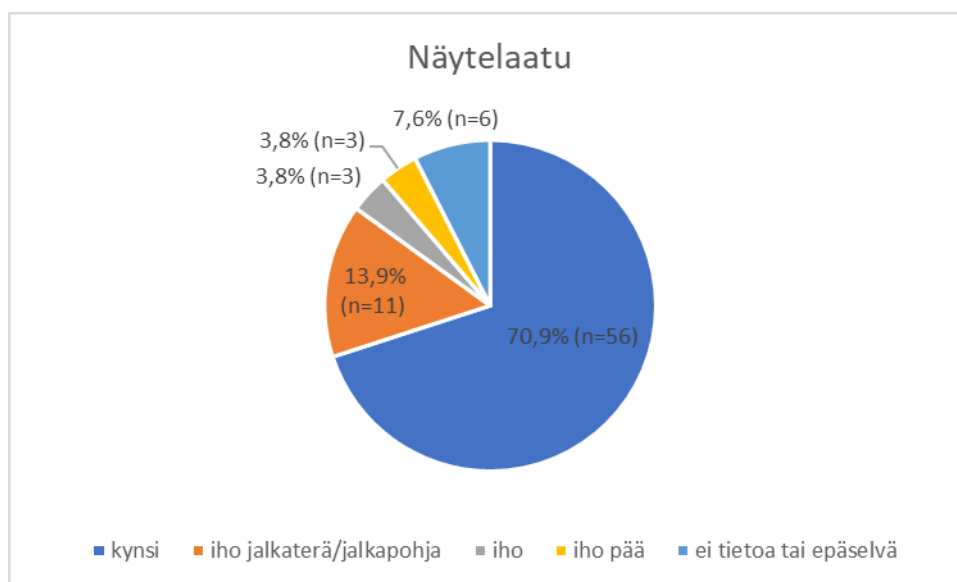
TAULUKKO 9. Diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävä nelikenttä (Uhari 2012, 30, muokattu).

	Viljely positiivinen	Viljely negatiivinen
PCR-positiivinen	oikea positiivinen (a)	väärä positiivinen (b)
PCR-negatiivinen	väärä negatiivinen (c)	oikea negatiivinen (d)

7 TULOKSET

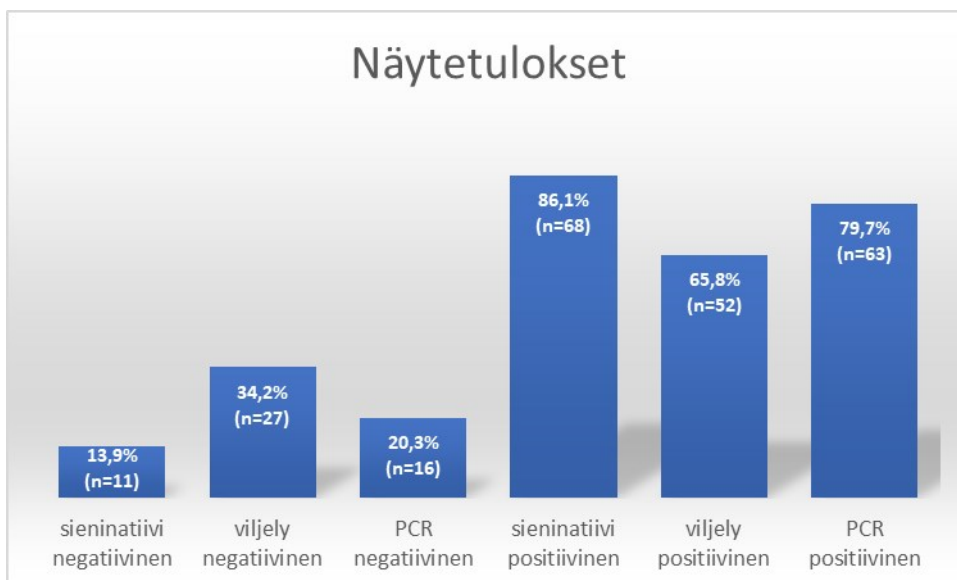
7.1 PCR-tutkimuksen herkkyys ja tarkkuus pintasieridiagnostiikassa

Potilasnäytteitä tässä tutkimuksessa oli 79. Näistä näytteistä 70,9% (n=56) oli kynsinäytteitä. Ihonäytteet tutkimuksessa jaettiin kolmeen osioon pitäen sisälleen jalkaterän ja -pohjan ihonäytteet, muut ihonäytteet ja pään alueen ihonäytteet. Viimeksi mainituissa näytteissä oli ihon lisäksi hiusta. Puutteellisilla näytteenottotiedoilla laboratorioon saapui 7,6 prosenttia näytteistä (n=6). Myös nämä näytteet tutkittiin normaalisti. Eri näytelaatujen osuus aineistossa esitetään kuviossa 1.



KUVIO 1. Eri näytelaatujen osuus aineistossa.

Värjäyspositiivisia näytteitä oli 86,1% (n=68). PCR-tutkimuksessa positiivisia näytteitä oli 79,7% (n=63) ja viljelypositiivisia oli 65,8% (n=52). Näytetulokset prosentteina ja lukumäärinä Calcofluor-värjäyksessä, sieniviljelyssä ja PCR-tutkimuksessa esitetään kuviossa 2.



KUVIO 2. Näytetulokset prosentteina ja lukumäärinä.

Kynsinäytteistä positiivisen värjäystuloksen sai 94,6% (n=53) ja ihonäytteistä 61,1% (n=11). Viljelyssä positiivisia kynsinäytteitä oli 64,3% (n=36) ja ihonäytteitä 72,2% (n=13). PCR oli positiivinen 85,7% (n=48) kynsinäytteistä ja 50,0% (n=9) ihonäytteistä. Positiivisten näytteiden osuus ja lukumäärät näytelaaduittain esitetään taulukossa 10.

TAULUKKO 10. Positiivisten näytteiden osuus ja lukumäärät näytelaaduittain.

Tutkimus Näytelaatu	Sieninatiivi pos	Viljely pos	PCR pos	Tutkittuja näyt- teitä kpl
Kynsi	94,6% (n=53)	64,3% (n=36)	85,7% (n=48)	56
Kaikki ihonäytteet	58,8% (n=10)	76,5% (n=13)	52,9% (n=9)	17
Iho jalkaterä/- pohja	72,7% (n=8)	90,9% (n=10)	63,6% (n=7)	11
Iho	66,7% (n=2)	66,7% (n=2)	66,7% (n=2)	3
Iho pää	0	33,3% (n=1)	0	3
Ei tietoa	83,3% (n=5)	50,0% (n=3)	100% (n=6)	6
Yhteensä	86,1% (n=68)	65,8% (n=52)	79,7% (n=63)	79

Näytteitä, joissa sekä viljely että PCR-tutkimus olivat positiivisia, oli 44. Molemmassa tutkimuksessa negatiivisia näytteitä oli kahdeksan. Pelkästään PCR-tutkimuksessa positiivisia näytteitä oli 19 ja pelkässä viljelyssä positiivisia kahdeksan. Yksi viljelyssä negatiiviseksi jäänyt PCR-tutkimuksessa positiivinen näyte oli vastattu neljän viikon kohdalla negatiivisena, eikä sitä ollut kasvatettu työohjeen mukaisesti ylimääräistä viikkoa. Viljely- ja PCR-tuloksia esitetään diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävässä nelikentässä taulukossa 11, jonka mukaan laskettiin PCR-tutkimuksen herkkyys ja tarkkuus. Kun dermatofyytti-PCR-tutkimusta verrataan sieniviljelyyn, oli PCR-tutkimuksen herkkyys 84,6% ja tarkkuus 29,6%.

TAULUKKO 11. PCR-tutkimuksessa ja viljelyssä positiivisten ja negatiivisten näytteiden lukumäärät.

	Viljely positiivinen	Viljely negatiivinen
PCR-positiivinen	44 oikeaa positiivista	19 väärää positiivista
PCR-negatiivinen	8 väärää negatiivista	8 oikeaa negatiivista

Näytteitä, joissa värjäys, viljely ja PCR olivat positiivisia, oli 42. Kaikissa tutkimuksissa negatiivisia näytteitä oli viisi. Näytteitä, joissa joko viljely ja/tai värjäys oli positiivinen ja PCR-tutkimus positiivinen, oli 61. PCR-tutkimuksessa positiivisista näytteistä kaksi oli sekä värjäyksessä että viljelyssä negatiivisia ja värjäyksessä ja/tai viljelyssä positiivisista näytteistä 11 oli PCR-tutkimuksessa negatiivisia. PCR-tutkimuksen herkkyys oli 84,7% ja tarkkuus 71,4%, kun PCR-tutkimusta verrattiin sekä sieniviljelyyn että -värjäykseen. Diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävä nelikenttä, jossa PCR-tutkimusta verrataan sekä viljelyyn että värjäykseen, esitetään taulukossa 12.

TAULUKKO 12. PCR-tutkimuksessa, värjäyksessä ja viljelyssä positiivisten ja negatiivisten näytteiden lukumäärät.

	Viljely ja/tai värjäys positiivinen	Viljely ja värjäys negatiivinen
PCR-positiivinen	61 oikeaa positiivista	2 väärää positiivista
PCR-negatiivinen	11 väärää negatiivista	5 oikeaa negatiivista

PCR-tutkimuksen herkkyys kynsinäytteille oli 91,7% ja tarkkuus 25%, kun tutkimusta verrattiin sieniviljelyyn. Diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävä nelikenttä, jossa PCR-tutkimusta verrataan kynsinäytteiden osalta sieniviljelyyn, esitetään taulukossa 13.

TAULUKKO 13. PCR-tutkimuksessa ja viljelyssä positiivisten ja negatiivisten kynsinäytteiden lukumäärät.

Kynsi	Viljely positiivinen	Viljely negatiivinen
PCR-positiivinen	33 oikeaa positiivista	15 väärää positiivista
PCR-negatiivinen	3 väärää negatiivista	5 oikeaa negatiivista

Verrattaessa PCR-tutkimusta sekä sieniviljelyyn että värjäykseen, oli tutkimuksen herkkyys kynsinäytteille 88,7% ja tarkkuus 66,7%. Diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävä nelikenttä, jossa PCR-tutkimukseen verrataan sekä sieniviljelyä että värjäystä, esitetään taulukossa 14.

TAULUKKO 14. PCR-tutkimuksessa, värjäyksessä ja viljelyssä positiivisten ja negatiivisten kynsinäytteiden lukumäärät.

Kynsi	Viljely ja/tai värjäys positiivinen	Viljely ja värjäys negatiivinen
PCR-positiivinen	47 oikeaa positiivista	1 väärää positiivista
PCR-negatiivinen	6 väärää negatiivista	2 oikeaa negatiivista

Ihonäytteiden osalta PCR-tutkimuksen herkkyys oli 61,5% ja tarkkuus 75%, kun tutkimusta verrattiin sieniviljelyyn. Diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävä nelikenttä, jossa PCR-tutkimusta verrataan ihonäytteiden osalta sieniviljelyyn, esitetään taulukossa 15.

TAULUKKO 15. PCR-tutkimuksessa ja viljelyssä positiivisten ja negatiivisten ihonäytteiden lukumäärät.

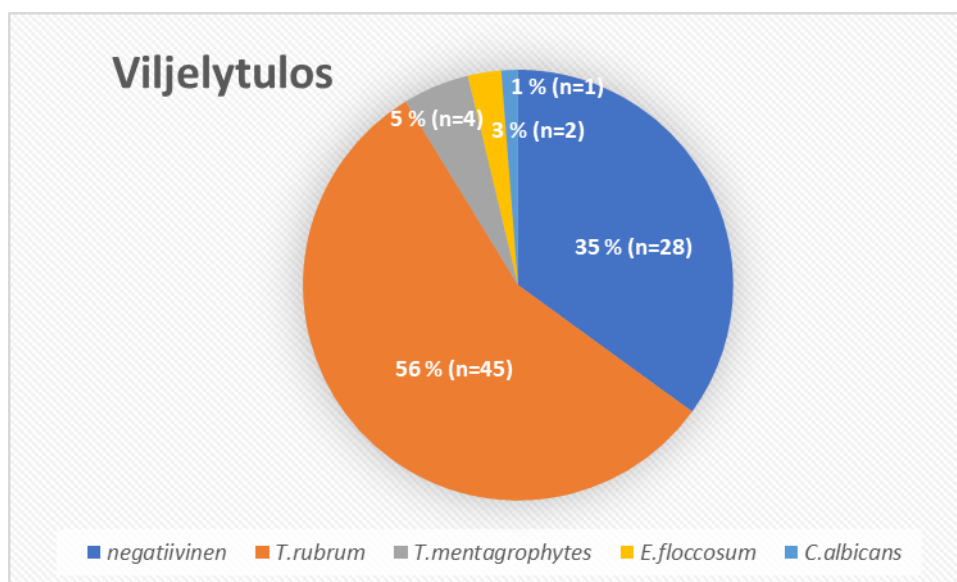
Iho	Viljely positiivinen	Viljely negatiivinen
PCR-positiivinen	8 oikeaa positiivista	1 väärää positiivista
PCR-negatiivinen	5 väärää negatiivista	3 oikeaa negatiivista

Verrattaessa PCR-tutkimusta sekä sieniviljelyyn että värjäykseen, oli tutkimuksen herkkyys 61,5% ja tarkkuus 75% ihonäytteille. Diagnostisen testin tunnuslukujen laskemiseen käytettävä nelikenttä, jossa PCR-tutkimusta verrataan sieniviljelyyn ja värjäykseen, esitetään taulukossa 16.

TAULUKKO 16. PCR-tutkimuksessa, värjäyksessä ja viljelyssä positiivisten ja negatiivisten ihonäytteiden lukumäärät.

Iho	Viljely ja/tai värjäys positiivinen	Viljely ja värjäys negatiivinen
PCR-positiivinen	8 oikeaa positiivista	1 väärää positiivista
PCR-negatiivinen	5 väärää negatiivista	3 oikeaa negatiivista

Viljelyssä 56,3% (n=45) näytteistä antoi positiivisen tuloksen *T.rubrumin* osalta. *T.mentagrophytes* oli positiivinen 5% (n=4) näytteistä ja muita viljelylöydöksiä olivat *E.floccosum* ja *C.albicans*. Viljelylöydösten osuudet esitetään kuviossa 3. Viljelyssä ja PCR-tutkimuksessa positiivisten näytteiden tulokset erosivat toisistaan kahden näytteen osalta. Molemmissa PCR-tutkimus oli positiivinen sekä *T.rubrum complex* että *T.mentagrophytes complex* osalta. Toisesta viljelystä oli vastattu *T.rubrum* ja toisesta *T.mentagrophytes*.



KUVIO 3. Viljelylöydösten osuudet prosentteina.

Tutkituista 13 sienikantanäytteestä kaksi oli PCR-tutkimuksessa negatiivisia. Kahden näytteen osalta PCR- ja viljelyvastaukset erosivat toisistaan. Yhdeksän

näytteistä sai PCR-tuloksen, joka vastasi sienikannan nimeä. Pakastettujen kontrollikantojen tulokset esitetään taulukossa 17.

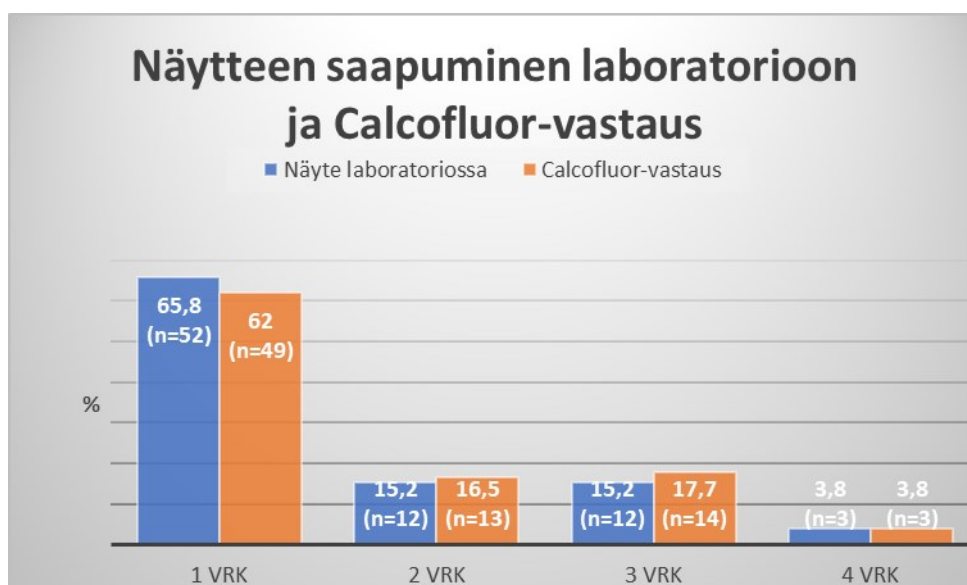
TAULUKKO 17. Sienikontrollikantojen PCR-tulokset

Näyte	PCR-tulos	Sienikanta	Huomioitavaa
1	TMC/TT	<i>T. tonsurans</i>	
2	TMC	<i>E. floccosum</i>	tulos ristiriitainen
3	TMC	<i>M. canis</i>	tulos ristiriitainen
4	TMC	<i>M. mentagrophytes</i>	
5	TMC	<i>T. verrucosum</i>	
6	TRC	<i>T. rubrum</i>	
7	TMC/TT	<i>T. tonsurans</i>	
8	TMC	<i>T. interdigitale</i>	
9	TMC	<i>T. erinacei</i>	
10	TMC/TT	<i>T. equinum</i>	
11	TMC/TT	<i>T. tonsurans</i>	
12	-	<i>M. persicolor</i>	
13	-	<i>M. gypseum</i>	

7.2 PCR-tutkimukseen kulunut aika viljelyyn verrattuna

Värijäys-, PCR-, ja viljelytulokseen kulunut aika vuorokausissa näytteenottopäivämäärästä alkaen näytekohtaisesti esitetään liitteessä 3.

Potilasnäytteet saapuivat laboratorioon keskimäärin 1,6 vuorokauden kuluessa näytteenotosta ja Calcofluor-vastaus näytteille saatiin pääosin saman vuorokauden aikana näytteen saapumisesta laboratorioon. Vuorokauden kuluessa näytteenotosta laboratorioon saapui 65,8% (n=52) näytteistä ja Calcofluor-värijäys tehtiin 62%:lle (n=49). Näytteistä 96,2% (n=76) oli saapunut laboratorioon kolmen vuorokauden kuluessa näytteenotosta. Kuviossa 4 esitetään näytteiden saapuminen laboratorioon ja Calcofluor-vastauksen ajankohta.



KUVIO 4. Näytteen saapumiseen laboratorioon ja Calcofluor-vastaukseen kulunut aika vuorokausissa prosentteina.

PCR-tulos saatiin 5-16 vuorokauden kuluttua näytteenotosta. Viljelyyn kulunut aika vaihteli 6-43 vuorokauden välillä, kun huomioitiin sekä positiiviset että negatiiviset viljelyvastaukset. Pelkkien positiivisen viljelyvastauksen saamiseen kulunut aika vaihteli 6-34 vuorokauden välillä. Kaikki viljelynegatiiviset näytteet saivat vastauksen PCR-tutkimuksesta viljelyä nopeammin (n=27). Viljelypositiivisista näytteistä vastaus saatiin PCR-tutkimuksella viljelyä nopeammin 37 näytteestä. Viljely oli PCR-tutkimusta nopeampi 15 näytteen osalta. PCR-tutkimukseen ja viljelyyn kulunut aika vuorokausissa esitetään taulukossa 18. Nopeimmin maljakasvusta tunnistettiin *C.albicans*, mutta jo seitsemän vuorokauden kuluttua näytteenotosta pystyttiin yhdestä maljaviljelystä tunnistamaan *T.rubrum*.

TAULUKKO 18. PCR- ja viljelyvastaukseen kulunut aika vuorokausissa.

	Minimi	Maksimi	Keskiarvo
PCR-tulos	5	16	10,0
Viljelytulos	6	43	23,2
Viljelytulos pelkät positiiviset	6	34	16,6

Viljelymenetelmän ollessa PCR-tutkimusta nopeampi, viljelyvastaus yhdeksästä näytteestä saatiin vuorokautta aikaisemmin kuin PCR-tulos. Viiden näytteen

osalta ero tutkimusvastauksilla oli kaksi vuorokautta. *C.albicans* oli vastattavissa yhdestä viljelynäytteestä kahdeksan vuorokautta aiemmin kuin PCR-tuloksen perusteella olisi vastattu.

Ero PCR-tutkimukseen ja viljelyyn kuluneessa ajassa oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p = <,001$) sekä kaikkien näytteiden että viljelyssä positiivisiksi todettujen näytteiden osalta siten, että PCR-tutkimus oli menetelmänä viljelyä nopeampi.

8 POHDINTA

8.1 Tulosten tarkastelu

8.1.1 PCR-tutkimuksen herkkyys ja tarkkuus pintasienidiagnostiikassa

Dermatofyytti-PCR-tutkimusten arviointi on haastavaa, koska sopivaa kultaista standardia, johon menetelmää verrattaisiin, ei ole. Viljely- ja värjäysmenetelmän heikko herkkyys aiheuttaa siihen verrattaessa PCR-tutkimuksen tulokseksi matalan tarkkuuden ja positiivisen ennustearvon. (van Herk ym. 2023, 3.) Tässä tutkimuksessa dermatofyytti-PCR-tutkimuksen tarkkuus oli matala ollen 29,6%, kun tutkimusta verrattiin pelkkään viljelyyn. Tässä opinnäytetyössä menetelmän tarkkuus on todennäköisesti todellisuutta heikompi, koska näyttemateriaalin painottuminen Calcofluor-positiivisiin näytteisiin soveltuu huonosti menetelmän tarkkuuden arviointiin. Menetelmän tarkkuutta tulee arvioida isommalla otoksella viljelyn ja värjäyksen suhteen negatiivisilla näytteillä. (Seiskari 2023.)

Kun vertaillaan eri tehtyjä tutkimuksia dermatofyytti-PCR-tutkimuksen osalta, voidaan huomata, että monet tekijät vaikuttavat saatuihin tuloksiin. Tulokset ovat riippuvaisia muun muassa käytetystä PCR-tutkimuksesta, DNA:n eristysmenetelmästä ja siitä, mihin menetelmään PCR-tutkimusta verrataan. (Motamedi ym. 2017, 695.) van Herk ym. (2023, 3) vertasivat omassa tutkimuksessaan Seegenen Novaplex™ Dermatophyte Assay -tutkimusta toiseen RT-PCR-menetelmään ja tuloksena oli vähintään 94,3% herkkyys ja 94,1% tarkkuus. Kabtani ym. (2021, 5) vertasivat omassa tutkimuksessaan PCR-tutkimuksia viljelyyn ja värjäykseen. In-House PCR-tutkimuksen herkkyys oli 89% ja tarkkuus 82%, kun taas kaupallisen PCR-tutkimuksen herkkyys oli 65-77% ja tarkkuus 95%. Tässä tutkimuksessa potilasnäytteille suoritettiin Calcofluor-värjäys, sieniviljely ja PCR-tutkimus työohjeiden mukaisesti. Calcofluor-värjäyksessä positiivisia näytteitä oli yli 86%. Myös PCR-tutkimuksessa positiivisten osuus on suuri ollen 79,7%. Viljelyssä positiivisia näytteitä oli 65,8%. PCR-tutkimuksen herkkyys on tässä tutkimuksessa 84,7%, kun dermatofyytti-PCR-tutkimusta verrattiin viljelyyn ja värjäykseen. PCR-tutkimuksen tarkkuus oli 71,4%.

PCR-tutkimus on herkin kynsinäytteille, joka voi johtua näytteen suuremmasta DNA-määrästä muihin näytelaatuihin verrattuna (Álvarez-Mosquera ym. 2018, 781; Kabtani ym. 2021, 11). Motamedin ym. (2017, 692) tutkimuksessa PCR-tutkimuksen herkkyys oli parempi puolestaan iho- kuin kynsinäytteillä. Syynä voi olla se, että DNA:n eristäminen ihonäytteestä on helpompaa tai näytteessä on enemmän sienielementtejä (Motamedi ym. 2017, 695). Tässä tutkimuksessa PCR-tutkimus oli kynsinäytteille herkempi kuin ihonäytteille, vaikkakin kunnollista vertailua ei voida luotettavasti suorittaa, koska muiden kuin kynsinäytteiden määrät olivat tässä tutkimuksessa pienet. Parempi tarkkuus tässä tutkimuksessa saatiin iho- kuin kynsinäytteille.

Viljelypositiiviset näytteet, jotka olivat PCR-negatiivisia, voivat selittyä näytteen epähomogeenisuudella (Lin ym. 2021, 4). Tässä tutkimuksessa näitä näytteitä oli 8. Viljelynegatiiviset, mutta PCR-positiiviset näytteet voivat olla oikeita positiivisia näytteitä, sillä PCR tunnistaa myös kuolleesta tai kasvukyvyyttömästä sienestä peräisin olevan DNA:n, mutta jota ei saada kasvamaan viljelyssä. Näitä näytteitä oli tässä tutkimuksessa 19. PCR-positiivisen ja värjäyksessä negatiivisen näytteen taustalla voi olla joko väärä positiivinen PCR-tulos tai väärä negatiivinen värjäystulos. Tällöin riittämätön tai huonosti käsitelty värjäysnäyte tai osaamattomuus ja kiire värjäysten katsomisessa voi aiheuttaa väärän negatiivisen värjäystuloksen. (Motamedi, Lari, Pakshir & Zomorodian 2019, 85.)

Viljelynegatiivisten, mutta PCR-positiivisten taustalla voi olla, että PCR-käsittely saa kynnen keratiinista irti DNA:n, mutta sieni ei kasva viljelyssä. Myös aiempi sienilääke voi aiheuttaa sen, että sieni ei kasva viljelyssä. Positiivinen PCR-tulos ei kerro sienien elinkyvystä eli löydöksen kliiniseen merkitykseen vaikuttaa myös esimerkiksi potilaan taustatiedot. (Koo ym. 2019.) PCR on hyödyllinen potilailla, jotka ovat jo saaneet sienilääkettä, mutta sitä ei voi käyttää hoidon tehon arviointiin (Hayette ym. 2019, 282). Tässä tutkimuksessa ei selvitetty potilaan saamaa aiempaa sienilääkitystä, sillä kyseisiä tietoja on harvoin merkitty näytetietoihin. Mikäli PCR-tutkimuksesta saadaan vastaukseksi kaksi eri löydöstä ja viljelystä vain yksi, voi se johtua näytteen epätasaisuudesta tai siitä, että vallitsevampi dermatofyytti peittää toisen lajin viljelyssä (Famarzi ym. 2021, 6). Tässä tutkimuksessa kahdesta näytteestä PCR-tutkimus antoi vastaukseksi kaksi eri dermatofyyttiä, mutta viljelystä vastattiin vain yksi löydös.

Viljelyssä 56,3% (n=45) näytteistä antoi positiivisen tuloksen *Trichophyton rubrum* osalta. *Trichophyton mentagrophytes* oli positiivinen 5% (n=4) näytteistä. Useassa tutkimuksessa, joita tässä opinnäytetyössä käytetään, yleisemmin diagnosoitu sienilaji oli *Trichophyton rubrum* (Hafirassou 2017, 643; Watanabe & Ishida 2017, 284; Shimoyama ym. 2019, 677; Pospischil ym. 2022, 4; Trovato ym. 2022, 541). Motamedin ym. (2017, 694) tutkimuksessa yleisimmin tunnistettu sienilaji oli *Trichophyton interdigitale* (n=69) ja toiseksi yleisin *Trichophyton rubrum* (n= 28).

Seegenen Novaplex™ Dermatophyte Assay on tarkoitettu hius-, kynsi- ja ihonäytteille. Tässä opinnäytetyössä PCR-tutkimus tehtiin 13 sienikontrollikanta-näytteelle pesäkekasvusta, jotta verifiointiin saatiin mukaan mahdollisimman monta eri dermatofyytilajia. Kaksi näytteistä oli PCR-tutkimuksessa oikein negatiivisia, sillä kyseiset sienilajit eivät kuulu tunnistettavien sienilajien joukkoon. PCR-tunnisti *Trichophyton tonsurans* kannat oikein antaen vastaukseksi TM/TT (*Trichophyton mentagrophytes/ Trichophyton tonsurans*). Kahden näytteen osalta PCR-tulos oli ristiriitainen kontrollikannan kanssa. Virheellisen PCR-tuloksen sijaan syy voi olla myös virheellisessä alkuperäisessä näytteen tunnistamisessa, koska kyseiset näytteet ovat laaduntarkkailunäytteitä vuosilta 1996 ja 1998, jolloin käytettävät tunnistusmenetelmät olivat nykyistä rajallisemmat. Maljakasvusta tehtiin pelkästään PCR-tutkimus, eikä tunnistusta varmistettu nykyisin käytettävillä menetelmillä.

8.1.2 PCR-tutkimukseen kulunut aika viljelyyn verrattuna

Tutkimustuloksia PCR:n nopeudesta sienidiagnostiikassa ei tähän työhön löytynyt. Álvarez-Mosquera ym. (2018, 781) kuitenkin toteavat, että PCR-tutkimuksen etuna voidaan pitää menetelmän nopeutta, joka voi tehostaa potilaiden hoitoa ja sitä kautta vähentää kustannuksia. Nopeampi diagnostiikka myös vähentää ylimääräisten sienilääkkeiden käyttöä (van Herk ym. 2023, 3). Viljelyyn ja PCR-tutkimukseen kuluneen ajan vertailu ei ole ongelmantona. Tutkimusten suorittaminen käytännössä eroaa toisistaan, kun viljely tehdään näytteen saapuessa laboratorioon ja PCR-tutkimus silloin, kun riittävä määrä näytteitä on saatu kerättyä

tutkimuksen suorittamiseen. Tässä kohtaa syntyy viivettä PCR-tutkimuksen vastaukseen, jos edellinen PCR-tutkimus on juuri suoritettu näytteen saapuessa laboratorioon.

Toisaalta vertailua haastaa myös se, että negatiivisen viljelyvastauksen antaminen edellyttää kasvatusajan päättymistä, kun taas PCR-tutkimuksesta positiivinen ja negatiivinen vastaus on saatavissa samassa ajassa. Mikäli värjäystulos on positiivinen, kasvatetaan negatiivista viljelynäytettä vielä yksi lisäviikko. Viljelynäytteitä luetaan Saboroud-maljan osalta kahdesti viikossa ja DTM-malja kerran viikossa. Se, mikä tulkitaan positiiviseksi, on maljoja lukevasta laboratoriohoitajasta riippuvaista. Näyte voi olla positiivinen jo aiemmin, mutta jatkotutkimusten tekeminen edellyttää riittävää kasvua, joten maljaa saatetaan kasvattaa pidempään ennen positiivisen vastauksen antamista. Alustavia positiivisia vastauksia ei yleensä anneta, vaan näytteelle annetaan lopullinen tunnistus sen valmistuttua.

Tässä opinnäytetyössä viljelyvastauksen saamiseen kulunut aika kuvaa hyvin sitä, miten kauan näytevastauksiin keskimäärin tällä hetkellä menee, koska viljelynäytteiden osalta menettelyjä ei ole muutettu. PCR-tutkimukseen kulunut aika on tässä tutkimuksessa viitteellinen. Todellinen aika on selvitettävissä, mikäli menetelmä otetaan käyttöön ja PCR-tutkimuksen osalta tehdään päätös suorittaa tutkimus esimerkiksi kerran viikossa. PCR-tuloksen valmistuminen ja vastaaminen eivät välttämättä tapahdu samana päivänä, joten myös tämä vaikuttaa todelliseen vastausajankohtaan. Tässä tutkimuksessa PCR-tulos tulkittiin valmiiksi, kun se oli PCR-laitteella valmis huolimatta siitä, että vastausta ei olisi sinä päivänä enää potilastietojärjestelmään kirjattu. Laboratorion työn kulkua optimoimalla, voidaan PCR-diagnostiikan viiveitä lyhentää entisestään ja saavuttaa vielä tässä tutkimuksessa todettuja vasteaikoja nopeammat läpimenoajat. Viljelytutkimuksessa sitä vastoin viive johtuu organismien hitaasta kasvusta, joten sitä ei voida merkittävästi nopeuttaa. (Seiskari 2023.)

Tässä opinnäytetyössä PCR-tutkimus oli viljelymenetelmää nopeampi sekä positiivisissa että negatiivisissa näytteissä. Nopeampi tulos viljelymenetelmällä PCR-tutkimukseen verrattuna saatiin 15 potilasnäytteestä, kokonaismäärän ollessa 79 näytettä. Vastauksiin kulunut ero tällöin oli yhdestä kahteen vuorokautta

lukuun ottamatta yhden näytteen *C.albicans* -löydöstä, joka viljelyllä saatiin kahdeksan vuorokautta PCR-tutkimusta aiemmin. Hiivat kasvavat nopeasti, joten mikäli maljoja luetaan viljelyä seuraavina päivänä, on positiivinen tulos saatavissa viljelyllä nopeasti.

8.2 Luotettavuus

Laadukkaassa tutkimuksessa tutkijan tulee jatkuvasti tarkastaa sekä asioita että omaa toimintaansa. Tutkimusprosessi kokonaisuutena ja tutkimuksen rakenne vaikuttavat laatuun yksittäisten asioiden sijaan. Tutkimusprosessissa olennaista on kuuluminen tutkijayhteisöön ja sitä kautta palautteen saaminen ja työn edistäminen. (Ronkainen ym. 2011, 139.) Opinnäytetyöprosessin aikana tekstiä on muokattu saadun palautteen avulla ja asiantuntijoiden apua on käytetty esimerkiksi vaikeaksi todetun PCR-prosessin selventämiseksi opinnäytetyön tekijälle. Tilastollisen analyysin tekoa varten opinnäytetyön tekijä suoritti Kvantitatiiviset tutkimusmenetelmät, vaikuttavuustutkimus -kurssin ja sai apua analyysiin kurssin opettajalta.

Validiteetti eli pätevyys on sitä, kuinka hyvin tutkimus onnistuu kuvaamaan tutkittavana olevaa ilmiötä (Ronkainen ym. 2011, 130; Vilka 2021, 193). Sisäinen validiteetti on tutkimuksen johdonmukaisuutta ja sisäistä logiikkaa ja ulkoinen validiteetti sitä, kuinka hyvin tutkimustulokset voidaan siirtää toiseen ympäristöön (Ronkainen ym. 2011, 130). Validiteetissa olennaista on, että tutkimus tutkii sitä, mitä on kerrottu tutkittavan, tutkimuksen käsitteet kuvaavat ilmiötä ja ovat aineistoon perustuvia, tieto on tuotettu pätevällä tavalla ja se pätee tutkimuskohteeseen. Validiteetti voidaan käsittää yleisempänä terminä, jolla kuvataan laatua ja tällöin sillä tarkoitetaan tiedon tuottamista pätevällä tavalla eli käytetyt ratkaisut ja käytännöt pystytään perustelemaan yleisillä tieteen kriteereillä tai tutkimuksen edustaman menetelmän mukaisesti. Pätevyyttä on myös se, että tutkimus on pätevää tutkimuksen kohteena olevan ilmiön kuvaajana ja tutkijan käsitteet, tulkinat ja havainnot vastaavat yhteisön vastaavia. (Ronkainen ym. 2011, 131.) Validiteettia tulee tarkastella jo tutkimusta suunniteltaessa, jolloin määritellään tarkasti käsitteet, perusjoukko ja muuttujat sekä aineiston kerääminen (Vilka 2021,

193). Opinnäytetyösuunnitelma tehtiin huolellisesti ja siinä pyrittiin mahdollisimman tarkasti määrittelemään, kuinka ja millainen aineisto tullaan keräämään. Otokokoa tässä työssä määritteli käytettävän näytepakkauksen koko.

Reliabiliteetilla kuvataan tutkimuksen luotettavuutta eli mittauksen yhdenmu-
kaista suorittamista ja mittarin kykyä toimia tarkasti (Ronkainen ym. 2011, 131;
Vilka 2021, 194). Mittaamiseen liittyy aina virheitä. Satunnaisvirheeseen tutkija
ei voi vaikuttaa, koska sillä kuvataan yksittäisten mittaustulosten epätarkkuutta.
Riittävän isossa otoksessa satunnaisvirheet kumoavat toisensa. Systemaatti-
sessa virheessä koko aineisto vääristyy samaan suuntaan. Reliabiliteetti voidaan
nähdä yleisenä toimintatapojen luotettavuutena eli, että aineistonkeruu on huo-
lellista, toimintatavat johdonmukaisia ja tutkimus on laadittu ja suoritettu huolelli-
sesti. (Ronkainen ym. 2011, 131-133.)

Viljely- ja värjäystuloksia on vastannut useampi sienilaboratorion työntekijä. Kai-
killa on työtehtävään tarvittava perehdytys ja työ suoritetaan työohjeita noudat-
taen. Sienilaboratorion toiminta on FINAS-akkreditoitu. Tuloksia viljelyn ja vär-
jäyksen osalta voidaan siis pitää luotettavina. PCR-näytteiden esikäsittelyn ja
eristykseen ja varsinaiseen PCR-reaktioon liittyvät käsin tehtävät osiot on suorit-
tanut opinnäytetyöntekijä ohjeistuksen mukaisesti huolellisuutta noudattaen yh-
teistyössä menetelmäasiantuntijan kanssa. Myös PCR-tuloksia voidaan siis pitää
luotettavina siten, että näytteiden käsittely ei ole vaikuttanut saatuihin tuloksiin.
Otetusta pintasieninäytteestä valitaan kaksi-kolme palaa ihoa, hiusta tai kynttä
PCR-reaktioon. Tässä kohtaa on mahdollista, että näytteeksi valikoituu palat,
joissa sientä ei ole ja infektio jää tunnistamatta. Pintasieriviljelyyn käytetään koko
näyte lukuun ottamatta pientä määrää, joka käytetään värjäykseen.

Tutkimuksen kokonaisluotettavuus on silloin hyvä, kun tutkimuksessa käytetty
otos edustaa perusjoukkoa ja mittauksen satunnaisuutta on vähän (Vilka 2021,
193). Tässä tutkimuksessa on tutkittu, kuinka dermatofyytti-PCR-tutkimus sovel-
tuu pintasieridiagnostiikkaan. Suunnitteluvaiheessa on pyritty huomioimaan, että
mahdollisimman erilaisia näytteitä tulisi tutkituksi. Validiteettiä heikentää kuiten-
kin se, että valitut näytteet ovat painottuneet Calcofluor-positiivisiin näytteisiin.
Tässä on toimittu verifiointin ehdoilla, mikä kohdistuu nimenomaan positiivisiin

näytteisiin. Otos tässä tutkimuksessa ei tältä osin kuvaa täysin perusjoukkoa eli kaikkia pintasieninäytteitä.

PCR-tutkimuksen herkkyyttä ja tarkkuutta on arvioitu koko tutkitusta näytemäärästä, mikä lisää luotettavuutta. Näytelaatukohtaista vertailua ei voida tämän tutkimuksen perusteella luotettavasti kuitenkaan tehdä, koska näytteistä suurin osa oli kynsinäytteitä muiden näytelaatujen jäädessä vähäisiksi. Myös ilman kunnollisia näytetietoja tulleita näytteitä oli useita. Näytelaatukohtaiset tulokset tässä tutkimuksessa ovat suuntaa antavia.

Tutkimuksiin kuluneen ajan vertailua varten kaikki ajat näytteenosta alkaen muutettiin vuorokausiksi laskemisen helpottamiseksi ja aikojen laskemisessa tehtävien virheiden ehkäisemiseksi. Tämä vaikuttaa tuloksen luotettavuuteen sitä heikentäen. Tutkimuksiin kuluneen ajan vertailu ei tässä opinnäytetyössä ollut täysin luotettavaa myöskään johtuen tutkimusten erilaisesta luonteesta ja käytännön järjestelyistä laboratoriotyöskentelyssä. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin saada suuntaa antava viite siitä, että PCR-tutkimus on viljelyä nopeampi etenkin viljelynegatiivisten näytteiden osalta.

Opinnäytetyö on tehty huolellisuutta ja tarkkuutta noudattaen. Näytteiden käsittely on suoritettu työohjeiden mukaisesti laadukasta laboratoriotyötappaa noudattaen. Yksi viljelynäytteistä on vastattu viikkoa liian aikaisin, joten negatiivinen vastaus tämän näytteen osalta ei ole luotettava. PCR-tutkimuksessa yhden näytteen pipetointi epäonnistui, eikä näytteelle voitu tehdä PCR-tutkimusta. Tätä näytettä ei huomioitu tuloksia laskettaessa. Kaksi PCR-näytettä sai clot-huomautuksen, joka todennäköisesti johtui riittämättömästä näytemäärästä. Toinen näistä näytteistä sai siitä huolimatta positiivisen PCR-vastauksen, joka voidaan tulkita luotettavaksi, sillä myös viljelyvastaus oli positiivinen.

8.3 Etiikka

Tässä työssä noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan TENK:n (2023) ohjeen mukaan "[h]yvä tieteellinen käytäntö koostuu

menettelytavoista, joilla huolehditaan hyvän tieteellisen käytännön toteutumisesta tieteellisen toiminnan koko elinkaaren ajan.” Peruseriaatteita ovat luotettavuus, rehellisyys, muiden työn arvostaminen ja vastuunotto. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 11.)

Tutkimusetiikkaa on noudatettu koko opinnäytetyöprosessin ajan ja etenkin aineiston käytössä on huomioitu, että tutkimustulokset vastaavat aineistoa, analyysi on huolellista ja aineistoa kunnioittavaa, tehdyt valinnat ovat perusteltuja ja tekstissä nähtävissä (Ronkainen ym. 2011, 142). Aineiston kerääminen ja analysointi on kuvattu työssä, kuten ne on suoritettu. Tulosten analysointi on tehty huolellisesti ja tarkastaen tilasto-ohjelmaan syötetyt tiedot oikeiden tulosten varmistamiseksi. Aiempiin tutkimuksiin on tutustuttu ja verrattu niissä saatuja tuloksia tässä työssä saatuihin tuloksiin. Näiden pohjalta on tehty johtopäätöksiä aiempaan tutkimukseen pohjautuen.

Käytetyt tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmät on valittu niin, että ne täyttävät tieteellisen tutkimuksen kriteerit. Tutkimusta tehneiden työtä on arvostettu ja käytettyihin lähteisiin on viitattu asianmukaisesti. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 12.) Tiedonhakua on kuvattu liitteessä 1. Käytetyt lähteet ovat mahdollisimman uusia ja täyttävät tieteellisen tekstin kriteerit. Lähteet on merkitty Tampereen ammattikorkeakoulun ohjeistuksen mukaisesti. Oikea lähteiden merkitseminen on tarkistettu valmiista tekstistä. Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio -kappaleessa käytettyihin kuviin on kysytty sähköpostitse lupa Geeniteknikka-teoksen tekijöiltä ja kuvittajalta.

Ennen opinnäytetyöprosessin aloittamista on laadittu sopimus työn tekemisestä (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 13). Suunnitelmassa on kuvattu aineiston keruu, otos sekä alustava suunnitelma työn toteuttamisesta. Suunnitelmavaiheessa selvitettiin, että potilasnäytteiden käyttöä varten ei tarvita lupaa, koska erillisiä näytteitä ei tarvinnut ottaa. PCR-tutkimus suoritettiin potilasnäytteestä varsinaisen sieniviljelyn ja värjäyksen suorittamisen jälkeen. Tutkimuksessa ei käsitelty potilaiden henkilötietoja, vaan näytteet käsiteltiin laboratoriokohtaisella juoksevalla numeroinnilla. Potilaat saivat vastauksen normaalikäytännön mukaisesti, eikä tutkimus viivästyttänyt potilasvastauksia. Opinnäytetyön valmistuttua

kerätty aineisto poistetaan tekijän tiedostoista, mutta se on Fimlab mikrobiologian laboratorion käytettävissä.

8.4 Johtopäätökset

Dermatofyytti-PCR parantaa saatujen tulosten perusteella pintasieninäytteiden diagnostiikkaa. Tutkimus on viljelyyn verrattuna herkempi ja tarkempi. PCR-tutkimus myös nopeuttaa diagnostiikkaa saatujen tulosten perusteella. Tämän tutkimuksen perusteella dermatofyytti-PCR-tutkimus soveltuu pintasienidiagnostiikkaan Fimlab mikrobiologian sienilaboratoriossa siten, että menetelmää voidaan käyttää viljelyn rinnalla dermatofyyttien osoituksessa, mutta viljelyn korvaaminen dermatofyyttien diagnostiikassa edellyttää menetelmän tarkkuuden tarkempaa arviointia (Seiskari 2023).

Opinnäytetyötä tehdessä kävi ilmi, että näytemäärä esikäsittelyn jälkeen oli liian pieni PCR-tutkimusta varten. Tässä työssä yksi näyte ei saanut PCR-vastausta pipetoinnin epäonnistuttua. Tästä syystä esikäsittelyä on syytä muuttaa ennen varsinaisen PCR-tutkimuksen käyttöönottoa. Jotta menetelmä voitaisiin ottaa kliiniseen käyttöön, on verifiointia jatkettava oikean esikäsittelyn selvittämiseksi.

Pintasienidiagnostiikan parantamiselle ja nopeuttamiselle on asiakkaista lähtenyt tarve. Kun PCR-menetelmä saadaan kliiniseen käyttöön, olisi mielenkiintoista selvittää asiakaskokemuksia ja -tyytyväisyyttä uuden menetelmän tuomista hyödyistä pintasienidiagnostiikassa. Laboratorion toiminnan kannalta voisi selvittää, kuinka PCR-tutkimuksen käyttöönotto muuttaa sienilaboratorion toimintaan ja mahdollistaako se esimerkiksi suurempien näytemäärien käsittelyn kuin viljelymenetelmä.

LÄHTEET

Aho-Laukkanen, E. & Mikkola, I. 2021. Sieninäytteenotto ja lähettäminen laboratorioon. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Viitattu 24.1.2023. <https://www.kaypahoito.fi/nix02881>

Álvarz-Mosquera, I., Hernáez, S., Sánchez, J., Suárez, M.D. & Cisterna, R. 2018. Diagnosis of Superficial Mycoses by a Rapid and Effective PCR Method from Samples of Scales, Nails and Hair. *Mycopathologia* 183 (5), 777-783. Viitattu 22.12.2022. <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0290-5>

Bühlmann. 2022. Now Available: Seegene Dermatophyte Assay. Viitattu 25.9.2022. <https://www.buhlmannlabs.ch/now-available-seegene-dermatophyte-assay/>

Falotico, J.M. & Lipner, S.R. 2022. Updated Perspectives on the Diagnosis and Management of Onychomycosis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* 15, 1933-1957. Viitattu 23.1.2023. <https://doi.org/10.2147/CCID.S362635>

Faramarzi, S., Motamedi, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Aboutalebian, S., Ansari, S., Didehdar, M., Bahadoran, M. & Mirhendi, H. 2021. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for rapid identification of the common pathogenic dermatophytes: *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, and *Epidermophyton floccosum*. *Current Medical Mycology* 7 (2), 1-7. Viitattu 19.11.2022. <https://doi.org/10.18502/cmm.7.2.7030>

Fimlab n.d. Fimlab Laboratoriot Oy yritys. Verkkosivu. Viitattu 21.10.2022. <https://fimlab.fi/yritys>

Gupta, A.K., Hall, D.C., Cooper, E.A. & Ghannoum, M.A. 2022. Diagnosing Onychomycosis: What's New? *Journal of Fungi* 8 (5), 464. Viitattu 24.1.2023. <https://doi.org/10.3390/jof8050464>

Gräser, Y. & Saunte, L.D.M. 2020. A Hundred Years of Diagnosing Superficial Fungal Infections: Where Do We Come From, Where Are We Now and Where Would We Like To Go? *Acta dermato-venereologica* 100 (9), 216-224. Viitattu 24.1.2023. <https://doi.org/10.2340/00015555-3467>

Hafirassou, A.Z., Valero, C., Gasseem, N., Mihoubi, I. & Buitrago, M.J. 2017. Usefulness of techniques based on real time PCR for the identification of onychomycosis-causing species. *Mycoses* 60 (10), 638-644. Viitattu 9.1.2023. <https://doi.org/10.1111/myc.12629>

Hayette, M-P., Seidel, L., Adjetey, C., Darfouf, R., Wéry, M., Boreux, R., Sacheli, R., Melin, P. & Arrese, J. 2019. Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails. *Medical Mycology* 57, 277-283. Viitattu 23.4.2023. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy020>

Heikkilä, H., Richardson, R. & Richardson, M. 2020a. Silsasienet eli dermatofyytit. Teoksessa Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S. Vapalahti, O. & Vuopio, J.

(toim.) Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 1.3.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/opk04495>

Heikkilä, H., Richardson, R. & Richardson, M. 2020b. Silsasieni-infektiot ja taudinkuva. Teoksessa Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S. Vapalahti, O. & Vuopio, J. (toim.) Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 1.3.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/opk04495>

Heikkilä, H., Richardson, R. & Richardson, M. 2020c. Silsasienten laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S. Vapalahti, O. & Vuopio, J. (toim.) Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 1.3.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/opk04495>

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. E-kirja. Helsinki: Edita. Viitattu 15.9.2022. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.ellibslibrary.com/book/978-951-37-6495-1>

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Hägg, M. (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Viitattu 1.12.2022. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>

Ihoinfektiot. 2021. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecim ja Suomen Ihotautilääkäriyhdistys ry:n asettama työryhmä. 2021. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Viitattu 13.9.2022. www.kaypahoito.fi

Kabtani, J., Diongue, K., Dione, J-N., Delmas, A., L'Ollivier, C., Amoureux, M-C., Ndiaye, D. & Ranque, S. 2021. Real-Time PCR Assay for Detection of Dermatophytes: Comparison between an In-House Method and a Commercial Kit for the Diagnosis of Dermatophytoses in Patients from Dagar, Senegal. *Journal of Fungi* 7 (11), 949. Viitattu 25.1.2023. <https://doi.org/10.3390/jof7110949>

Koo, S.H., Teoh, Y.L., Koh, W.L., Ochi, H., Tan, S.K., Sim, D.M.F., Jiang, B., Tan, A.L., Tan, T.Y. & Lim, S.P.R. 2019. Development and validation of a real-time multiplex PCR assay for the detection of dermatophytes and *Fusarium* spp. *Journal of Medical Microbiology* 68 (11), 1641-1648. Viitattu 9.1.2023. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001082>

Kuusela, P., Richardson, R. & Richardson, M. 2020. Sienet ja niiden merkitys taudinaiheuttajina. Teoksessa Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S. Vapalahti, O. & Vuopio, J. (toim.) Mikrobiologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 1.3.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppiportti.fi/op/opk04495>

Kuypers, J. & Jerome, K.R. 2017. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 55 (6), 1621-1628. Viitattu 31.1.2023. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>

Kärki, S. 2021. Validointi/verifiointiraportin täyttöohje. Fimlab Laboratoriot Oy. Yleinen ohje. Työn tekijän hallussa. Viitattu 22.11.2022.

- Kärki, S. 2022. Toimintakäsikirja. Fimlab Laboratoriot Oy. Yleinen ohje. Työn tekijän hallussa. Viitattu 22.11.2022.
- Lee, Y.-J., Kim, D., Lee, K. & Chun, J.Y. 2014. Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. *Nature. Scientific reports* 4 (1), 7439-7439. Viitattu 22.3.2023. <https://doi.org/10.1038/srep07439>
- Lee, M.A., Leslie, D.L. & Squirrel, D.J. 2019. Internal And Other Controls for Real-time PCR Validation. Teoksessa Behlke, A., Berghof-Jager, K. & Brown, T. (toim.) *Polymerase chain reaction: theory and technology*. Poole: Caister Academic Press. E-kirja. Vaatii käyttöoikeuden. Viitattu 24.3.2023. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/detail.action?docID=5897834>
- Lee, M.A., Squirrel, D.J., Leslie, D.L. & Brown, T. 2013. Homogeneous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR. Teoksessa Saunders, N.A. & Lee, M.A. (toim.) *Real-Time PCR – Advanced Technologies and Applications*. Poole: Caister Academic Press. E-kirja. Viitattu 27.1.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/reader.action?docID=5897808>
- Lin, B.B., Pattle, N., Kelley, P. & Jaksic, A.S. 2021. Multiplex RT-PCR provides improved diagnosis of skin and nail dermatophyte infections compared to microscopy and culture: a laboratory study and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 101 (3), 115413. Viitattu 9.1.2023. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115413>
- Marcos-Tejedor, F., Mota, M., Iglesias-Sánchez, M.J., Mayordomo, R. & Gonçalves, T. 2021. Identification of Fungi Involved in Onychomycosis in Patients of a Spanish Rural Area. *Journal of Fungi* 7 (8), 623. Viitattu 9.1.2023. <https://doi.org/10.3390/jof7080623>
- Motamedi, M., Lari, M.S., Pakshir, K. & Zomorodian, K. 2019. Comparing real-time PCR and Calcofluor-white with conventional methods for rapid detection of dermatophytes: Across-sectional study. *Journal of Microbiological Methods* 161 (2019), 84-86. Viitattu 10.6.2023. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.04.014>
- Motamedi, M., Mirhendi, H., Zomorodian, K., Khodadadi, H., Kharazi, M., Ghasemi, Z., Shidfar, M.R. & Makimura, K. 2017. Clinical evaluation of β -tubulin real-time PCR for rapid diagnosis of dermatophytosis, a comparison with mycological methods. *Mycoses* 60 (10), 692-696. Viitattu 25.1.2023. <https://doi.org/10.1111/myc.12648>
- Nevala, M. 2023a. Dermatofyyttien tunnistus. Fimlab Laboratoriot Oy. Työohje.
- Nevala, M. 2023b. Sieni, viljely (pintasieniviljely). Fimlab Laboratoriot Oy. Työohje.
- Nevala, M. 2023c. Sieni, värjäys. Fimlab Laboratoriot Oy. Työohje.
- Novaplex™ Dermatophyte Assay. n.d. Seegene.
- Peltola, M. menetelmäasiantuntija. 2022. Henkilökohtainen tiedonanto. 21.10.2022. Fimlab Laboratoriot Oy.

Petrucelli, M.F., de Abreu, M.H., Cantelli, B.A.M., Segura, G.G., Nishimura, F.G., Bitencourt, T.A., Marins, M. & Fachin, A.L. 2020. Epidemiology and Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses. *Journal of Fungi* 6 (4), 310. Viitattu 24.1.2023. <https://doi.org/10.3390/jof6040310>

Pihet, M. & Le Govic, Y. 2017. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia* 182 (1-2), 169-180. Viitattu 24.1.2023. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0071-y>

Pospischil, I., Reinhardt, C., Bontems, O., Salamin, K., Fratti, M., Blanchard, G., Chang, Y-T., Wagner, H., Hermann, P., Monod, M., Hoetzenecker, W. & Guenova, E. 2022. Identification of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Agents in Onychomycosis by PCR and DNA Sequencing—A Retrospective Comparison of Diagnostic Tools. *Journal of Fungi* 8 (10), 1019. Viitattu 12.6.2023. <https://doi.org/10.3390/jof8101019>

Rodríguez-Lázaro, D. & Hernández, M. 2019. Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction. Teoksessa Behlke, A., Berghof-Jager, K. & Brown, T. (toim.) *Polymerase chain reaction: theory and technology*. Poole: Caister Academic Press. E-kirja. Vaatii käyttöoikeuden. Viitattu 22.3.2023. <https://ebook-central.proquest.com/lib/tampere/detail.action?docID=5897834>

Ronkainen, S., Pehkonen, L., Lindblom-Ylänne, S. & Paavilainen, E. 2011. *Tutkimuksen voimasanat*. Helsinki: WSOY.

Salgado, C & Hussain, W. 2019. The Extraction and Purification of Nucleic Acids for Analysis by PCR. Teoksessa Behlke, A., Berghof-Jager, K. & Brown, T. (toim.) *Polymerase chain reaction: theory and technology*. Poole: Caister Academic Press. E-kirja. Vaatii käyttöoikeuden. Viitattu 24.3.2023. <https://ebook-central.proquest.com/lib/tampere/detail.action?docID=5897834>

Seiskari, T. erikoisalajohtaja, ylilääkäri. 2022a. Henkilökohtainen tiedonanto. 21.10.2022. Fimlab Laboratoriot Oy.

Seiskari, T. erikoisalajohtaja, ylilääkäri. 2022b. Henkilökohtainen tiedonanto. 7.12.2022. Fimlab Laboratoriot Oy.

Seiskari, T. erikoisalajohtaja, ylilääkäri. 2023. Henkilökohtainen tiedonanto. 30.10.2023. Fimlab Laboratoriot Oy.

SFS-EN ISO 15189, 2013. *Lääketieteelliset laboratoriot*. Erityisvaatimukset laadulle ja pätevyydelle. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.

Sherman, S., Goshen, M., Treigerman, O., Ben-Zion, K., Carp, M-J., Maisler, N., Ehrenreich, I.B., Kimchi, A., Lifshitz, S., Smollan, G., Davidovici, B., David, M., Hodak, E. & Segal, R. 2018. Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples - A multicentre study. *Mycoses* 61 (2), 119-126. Viitattu 9.1.2023. <https://doi.org/10.1111/myc.12713>

Shimoyama, H., Satoh, K., Makimura, K. & Sei, Y. 2019. Epidemiological survey of onychomycosis pathogens in Japan by real-time PCR. *Medical Mycology* 57 (6), 675-680. Viitattu 10.1.2023. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy096>

Sieni, viljely (pintasieniviljely, sisältää värjäyksen). 2021. Näytteenotto-ohje. Fimlab Laboratoriot Oy. Viitattu 12.8.2023. <https://fimlab.fi/tutkimus/6843>

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2013. *Geenitekniikka. 2. korjattu painos*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Trovato, L., Domina, M., Calvo, M., De Pasquale, R., Scalia, G. & Oliveri, S. 2022. Use of real time multiplex PCR for the diagnosis of dermatophytes onychomycosis in patients with empirical antifungal treatments. *Journal of Infection and Public Health* 15 (5), 539-544. Viitattu 9.1.2023. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.03.019>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Pdf-dokumentti. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisuja 2/2023. 1. painos. Helsinki: Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Viitattu 16.10.2023. https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf

Uhari, M. 2014. *Biostatistiikan taskutieto. 3. uudistettu painos*. Helsinki: Duodecim.

Validointi ja verifiointi. 2022. Labquality. Verkkosivu. Viitattu 1.12.2022. https://www.labquality.fi/sote-ammattilaisille/laadukas_vieritutkimus/validointi_verifiointi/

van Herk, A., Houwen, C., den Reijer, M., Noordanus-van Beek, M., Niehuis, M.-J., van Lisdonk, N., Mertens, K. & Thai, K.T.D. 2023. Rapid detection of dermatophytes using the Seegene Novaplex™ dermatophyte assay. *Mycoses* 2023, 1-5. Viitattu 26.4.2023. <https://doi.org/10.1111/myc.13586>

Vilkka, H. 2021. *Tutki ja kehitä. 5. päivitetty painos*. Jyväskylä: PS-kustannus.

Verrier, J. & Monod, M. 2017. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia* 182 (1-2), 193-202. Viitattu 24.1.2023. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0038-z>

Walser, M. & Bosshard, P.P. 2018. Development and evaluation of a pan-dermatophyte polymerase chain reaction with species-level identification using sloppy molecular beacon probes. *British journal of dermatology* 180 (6), 1489-1497. Viitattu 14.6.2023. <https://doi.org/10.1111/bjd.17512>

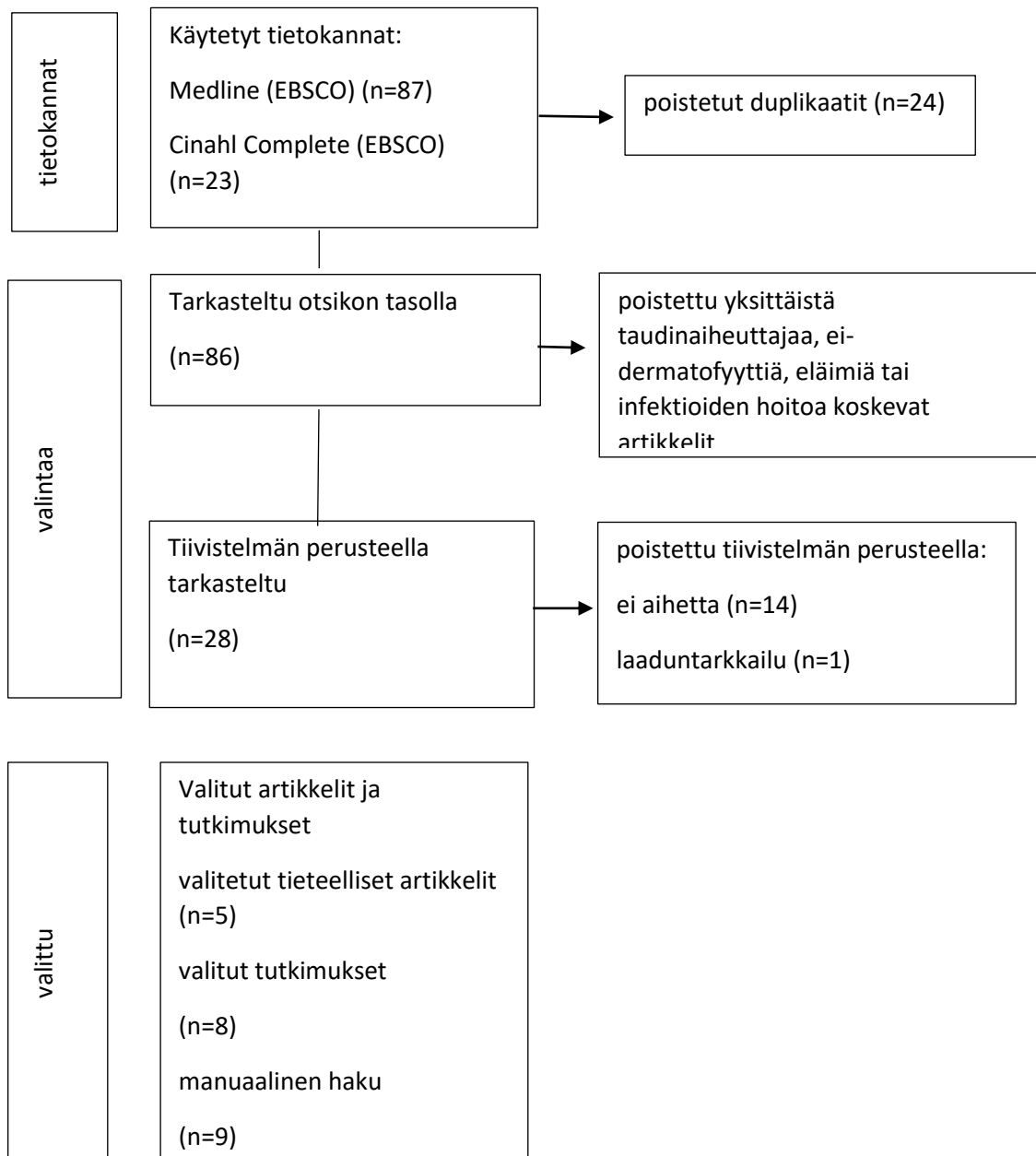
Watanebe, S. & Ishida, K. 2017. Molecular Diagnostic Techniques for Onychomycosis: Validity and Potential Application. *American Journal of Clinical Dermatology* 18 (2), 281-286. Viitattu 10.1.2023. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0248-7>

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M. & Neužil, P. 2020. PCR past, present and future. *BioTechniques* 69 (4), 317-325. Viitattu 22.3.2023. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

LIITTEET

Liite 1. Opinnäytetyön tiedonhaku

Käytetyt hakulausekkeet:
 dermatophyte* AND PCR
 onychom* AND PCR OR polymerase chain reaction
 rajattu: 2017-2022, full text, kieli englanti. Haku suoritettu 9/2022



Liite 2. Aikaisemmat dermatofyytti-PCR-tutkimukset

1 (5)

kirjoittaja ja maa	otsikko ja vuosi	näyttemateriaali, tehdyt tutkimukset	tulokset
Álvarez-Mosquera, I., Hernández, S., Sánchez, J., Suárez M.D. & Cisterna, R. Espanja	Diagnosis of Superficial Mycoses by a Rapid and Effective PCR Method from Samples of Scales, Nails and Hair 2018	626 hilse-, kynsi- ja hiusnäytettä tutkittiin viljelyllä, värjäyksellä ja itse kehitellyllä agarosigeelelektroforeesi-PCR:llä	PCR on tehokas ja nopea tunnistamaan pinnallisia sieniä. Tässä tutkimuksessa todettiin, että PCR vaatii riittävästi DNA:ta eli riittävän runsaita näytteitä. PPV 90,9%, NPV 94,6%. Näytteistä viljelyllä oli positiivisia 21% ja PCR:llä 22%.
Famarzi, S., Motamedi, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Aboutalebian, S., Ansari, S., Didehdar, M., Bahadoran, M. & Mirhendi, H. Iran	A simple multiplex polymerase chain reaction assay for rapid identification of the common pathogenic dermatophytes: <i>Trichophyton interdigitale</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> and <i>Epi-dermophyton floccosum</i> 2021	Tunnettuja sienikantoja (sekä dermatofyyttejä että homeita ja hiivoja) tutkittiin 101 kappaletta, potilasnäytteitä 155, joista 110 kappaleesta tehtiin mikroskopointi, viljely ja multiplex-PCR-tutkimus	Näytteistä positiivisia oli PCR-menetelmällä 68,1%, ja viljelyllä 55,4%, PCR tunnisti hyvin sienikannoista otsikossa mainitut dermatofyytit
Hafirassou, A.Z., Valero, C., Gassem, N., Mihoubi, I. & Buitrago, M.J. Algeria	Usefulness of techniques based on real time PCR for the identification of onychomycosis-causing species 2017	70 kynsinäytettä ja 15 kontrollinäytettä terveiltä potilailta tutkittiin viljelyllä, värjäyksellä ja PCR-tutkimuksella. Käytössä oli neljä erilaista RT-PCR-tutkimusta: sieni-PCR, dermatofyytti-PCR, hiiva-PCR ja <i>Aspergillus</i> -PCR. Kahdella ensimmäisenä mainituista tutkittiin kaikki 70 näytettä ja hiiva- sekä <i>Aspergillus</i> -PCR-tutkimuksella 25 näytettä.	Näytteistä 58% oli värjäyspositiivisia, ja 54 % viljelypositiivisia. Sieni-PCR-tutkimuksella positiivisia näytteitä oli 28% ja dermatofyytti-PCR-positiivisia 60 %. Sensitiivisyys viljelyyn verrattuna oli 90%. Yksi viljelypositiivinen näyte ei ollut positiivinen kummallakaan edellä mainituista PCR-tutkimuksista. Dermatofyytti-PCR on sensitiivinen ja spesifinen, mutta sillä on mahdollista tunnistaa vain dermatofyytit, eikä se erota dermatofyytilajeja toisistaan.

jatkuu

Hayette, M-P., Seidel, L., Adjete, C., Darfouf, R., Wéry, M., Boreux, R., Sacheli, R., Melin, P. & Arrese, J. Belgia	Clinical evaluation of the DermaGenius Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and <i>Candida albicans</i> in nails 2019	138 kynsinäytettä tutkittiin viljelyllä, histologisella tutkimuksella ja PCR-tutkimuksella, jonka tunnistuspaneelissa on <i>T.rubrum</i> , <i>T.men-tagrophytes</i> ja <i>C.al-bicans</i>	PCR-tutkimuksen sensitiivisyys oli 80% ja spesifisyys 74,4%. Paras yhdistelmä tutkimuksen mukaan on PCR-tutkimus yhdistettynä histologiseen tutkimukseen.
Kabtani, J., Diongue, K., Dione, J-N., Delmas, A., L'Ollivier C., Amoureux, M-C., Ndiaye, D. & Ranque, S. Senegal	Real-time PCR Assay for the Detection of Dermatophytes: Comparison between an In-House Method and a Commercial Kit for the Diagnosis of Dermatophytoses in Patients from Dakar, Senegal 2021	105 iho-, kynsi- ja hiushäytettä tutkittiin kahdella PCR-tutkimuksella ja verrattiin perinteiseen viljelyyn ja värjäykseen.	Positiivisia näytteitä viljelyllä oli 24,8%, In-House-PCR:lla 36,2% ja kaupallisella PCR-tutkimuksella 20%. In-House-PCR:n sensitiivisyys oli 88,9% ja kaupallisen PCR-tutkimuksen 65,4%. Iho- ja kynsinäytteissä kaupallisen PCR-tutkimuksen sensitiivisyys oli 77%. Ero johtuu siitä, että kaupallinen PCR-tutkimus ei sisällä hiushäytetäistä afrikkalaisväestöstä löytyvää <i>M.audoinii</i> -dermatofyyttiä.
Koo, S.H., Teoh, Y.L., Koh W.L., Ochi, H., Tan, S.K., Sim, D.M.F., Jiang, B., Tan, A.L., Tan, T.Y. & Lim, S.P.R. Singapore	Development and validation of a real-time multiplex PCR assay for the detection of dermatophytes and <i>Fusarium</i> spp. 2019	Tutkittiin 150 tunnettua sienikantaa sisältäen dermatofyytti- home- ja hii-vakantoja. Tämän lisäksi tutkittiin 204 kynsinäytettä potilailta, jotka eivät oleet saaneet sienilääkettä. Potilasnäytteille tehtiin viljely, värjäys ja kaksi eri PCR-tutkimusta.	Näytteistä 38,7% oli värjäyspositiivisia ja 61,3% viljelypositiivisia. Viljelypositiivisista näytteistä 19,6% löytyi dermatofyytti tai <i>Fusarium</i> spp. PCR-tutkimuksella positiivisia näytteitä oli 40,7%. Multiplex PCR on luotettava ja nopeampi pintasieni-infektioiden tunnistamisessa kuin viljelymenetelmä.
Lin, B.B., Pattle, N., Kelley, P. & Jaccic A.S. Itävalta	Multiplex RT-PCR provides improved diagnosis of skin and nail dermatophyte infections compared to microscopy and culture: a laboratory study and review of the literature 2021	Tutkimus tehtiin kolmessa osassa. Ensin tutkittiin tunnettuja bakteeri- ja sienikantoja 10 kappaletta molempia. Toiseksi tutkittiin viljelyllä ja värjäyksellä positiiviseksi tiedettyjä kynsi- ja ihonäytteitä 105 kappaletta. Kolmanneksi tutkittiin iho- ja kynsinäytteitä 195 kappaletta värjäyksellä, viljelyllä ja PCR-tutkimuksella.	Ensimmäisessä vaiheessa todettiin, että PCR-tutkimuksen spesifisyys on 100% tunnetuilla bakteeri- ja sienikannoilla. Toisessa vaiheessa sieniposiitivisten potilasnäytteiden sensitiivisyys PCR-tutkimuksella oli 90%. Kolmannessa vaiheessa värjäyspositiivisia näytteitä oli 18%, viljelypositiivisia oli 17% ja PCR-tutkimuksella positiivisia 47%. Kaikki viljelypositiiviset näytteet olivat positiivisia myös PCR-tutkimuksella. Kahdessa näytteessä identifikaatio oli eri näillä tutkimuksilla.

<p>Marcos-Tejedor, F., Mota, M., Iglesias-Sánchez, M.J., Mayordomo, R. & Gonçalves, T. Espanja</p>	<p>Identification of Fungi Involved in Onychomycosis in Patients of a Spanish Rural Area 2021</p>	<p>51 potilaan kynsi-näytteet, tutkittiin viljelyllä, värjäyksellä ja perinteisellä PCR-tutkimuksella sekä RT-PCR-tutkimuksella. PCR-tulokset saatiin agarosigeelelektroforeesilla.</p>	<p>76,5% näytteistä oli viljelypositiivisia ja näistä infektiosta 48,8% oli dermatofyytin aiheuttamia ja 25,6% hiivan aiheuttamia sekä 25,6% oli sekä hiivan että dermatofyytin aiheuttamia. 84,3% oli PCR-positiivisia (tavallinen ja RT-PCR yhteensä). Tutkimusten välillä ei ollut tilastollista merkittävyyttä. Ikäryhmällä yli 65-vuotiaat sieninfektion aiheuttaja oli dermatofyytti 18% tapauksista ja hiiva 82% tapauksista. PCR parantaa dermatofyyttien tunnistusta ja varsinkin nopeuttaa sitä.</p>
<p>Motamedi, M., Lari, M.S., Pakshir, K. & Zomorodian, K. Iran</p>	<p>Comparing real-time PCR and Calcofluor-white with conventional methods for rapid detection of dermatophytes: Across-sectional study 2019</p>	<p>Tutkimuksessa tehtiin viljely, värjäys ja PCR-tutkimus 307 iho-, kynsi ja hiusnäytteestä.</p>	<p>Näytteistä värjäyspositiivisia KOH-värjäyksessä oli 61,4% ja Calcofluor-white -värjäyksessä 61,1%. PCR-tutkimuksella positiivisia näytteitä oli 59,9%. Viljelypositiivisia oli 43,3%. Tutkimuksen perusteella Calcofluor-white-värjäys on hyvä vaihtoehto KOH-värjäykselle. Myös PCR-tutkimusta voidaan käyttää dermatofyyttien tunnistamiseen tämän tutkimuksen mukaan.</p>
<p>Motamedi, M., Mirhendi, H., Zomorodian, K., Khodadadi, H., Kharazi, M., Ghasemi, Z., Shidfar, M.R. & Makimura, K. Iran</p>	<p>Clinical evaluation of β-tubulin real-time PCR for rapid diagnosis of dermatophytosis, a comparison with mycological methods 2017</p>	<p>Tutkittiin 853 potilasnäytettä (iho, kynsi ja hius), joista kaikista tehtiin värjäys ja PCR. Edellä mainittujen lisäksi tehtiin viljely 499 näytteestä.</p>	<p>499 näytteestä, joista tehtiin värjäys, viljely ja PCR, värjäyspositiivisia oli 31,2%, viljelypositiivisia 25,6% ja PCR-positiivisia 41,0%. PCR-tutkimuksen sensitiivisyys oli 87,5%, spesifisyys 85%, positiivinen ennustearvo 66,5% ja negatiivinen ennustearvo 95,2%. PCR toimi paremmin iho- kuin kynsi-näytteillä, joten se ei täysin korvaa perinteistä diagnostiikkaa</p>
<p>Pospischil, I., Reinhard, C., Bontems, O., Salamin, K., Fratti, M., Blanchard, G., Chang, Y-T., Wagner, H., Hermann, P., Monod, M., Hoetzenecker, W. & Gue nova, E. Sveitsi/Itävalta/Espanja</p>	<p>Identification of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Agents in Onychomycosis by PCR and DNA Sequencing – A Retrospective Comparison of Diagnostic Tools 2022</p>	<p>16094 kynsinäytettä tutkittiin viljelyllä ja värjäyksellä. PCR tai sekvenointi suoritettiin kaikille näytteille, jotka olivat värjäyspositiivisia, mutta viljely oli negatiivinen tai kontaminoitunut. Myös positiivisille näytteille suoritettiin maljakasvun PCR tai sekvenointi.</p>	<p>Värjäyspositiivisia näytteitä oli 68,1% ja viljelypositiivisia 28,7%. Positiivisista viljelyistä 47,9% oli dermatofyyttejä. 1148 näytettä sekvenoitiin/tehtiin PCR. Näistä 99,7% oli värjäyspositiivisia, 21,8% viljelypositiivisia ja sekvenointi-/PCR-positiivisia 63,5%. PCR on hyvä varsinkin, jos perinteisillä menetelmillä ei saada diagnoosia.</p>

<p>Sherman, S., Goshen M., Treigerman, O., Ben-Zion, K., Carp, M.J., Maisler, N., Ehrenreich, I.B., Kimchi, A., Lifshitz, S., Smollan, G., Davidovici, B., David, M., Hodak, E. & Segal, R. Israel</p>	<p>Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples – A multicentre study 2018</p>	<p>Näytteitä tutkittiin useassa osassa. Näyte-erä 1: 223 iho-, hius- ja kynsinäytettä tutkittiin viljelyllä, värjäyksellä ja PCR-tutkimuksella. Näyte-erä 2: näytteitä oli 200 ja kolmannessa erässä 103. Tutkimuksessa kehitettiin RT-PCR-tutkimus pintasieni-näytteille.</p>	<p>Näyte-erä 1: 85% näytteistä antoi saman vastauksen viljelystä ja PCR-tutkimuksesta. 22 tapauksessa PCR antoi positiivisen tuloksen, jota viljelystä ei löytynyt. Näyte-erä 2: 59% PCR-positiivisia näytteitä. PCR tunnisti kaikki perinteisillä menetelmillä tehdyt löydökset ja tämän lisäksi PCR-positiivisia näytteitä oli 15%. Näyte-erä 3: 66% PCR-positiivisia näytteitä. PCR tunnisti kaikki perinteisillä menetelmillä tehdyt löydökset ja tämän lisäksi PCR positiivisia näytteitä oli 30%. PCR-tutkimuksen sensitiivisyys oli 92% ja spesifisyys 79%. RT-PCR oli merkittävästi parempi tunnistamaan dermatofyytit kuin perinteiset menetelmät.</p>
<p>Shimoyama, H., Satoh, K., Makimura, K. & Sei, Y. Japani</p>	<p>Epidemiological survey of onychomycosis pathogens in Japan by real-time PCR 2019</p>	<p>Tutkimuksessa tehtiin PCR-tutkimus 496 värjäyspositiiviselle kynsinäytteelle. Tämän lisäksi tutkittiin 20 negatiivista kontrollia eli värjäyksessä negatiiviseksi jäänyttä näytettä.</p>	<p>Värjäyspositiivisista näytteistä 96,2% oli PCR-tutkimuksessa positiivisia. Kaikki 20 negatiivista kontrollia olivat negatiivisia sekä värjäyksessä että PCR-tutkimuksessa. PCR-tutkimus tunnistaa tehokkaasti ja nopeasti useimmat sieninfektion aiheuttajat.</p>
<p>Trovato, L., Domina M., Calvo, M., De Pasquale, R., Scalia, G. & Oliveri, S. Englanti</p>	<p>Use of real time multiplex PCR for the diagnosis of dermatophytes onychomycosis in patients with empirical antifungal treatments 2022</p>	<p>Tutkittiin 109 kynsinäytettä sienilääkityiltä ja lääkitsemättömiä potilaita. Tehtiin viljely, värjäys ja PCR-tutkimus.</p>	<p>PCR-tutkimuksen sensitiivisyys oli 78,5%, spesifisyys 100%, positiivinen ennustearvo 100% ja negatiivinen ennustearvo 75,9%. Hoitamattomien potilaiden viljely oli positiivinen 73,7% näytteistä ja hoidettujen 40,7%. PCR on hyödyllinen etenkin potilailla, joita on sienilääkitty ilman kliinistä paranemista.</p>
<p>van Herk, A., Houwen, C., den Reijer, M., Noordanus-van Beek, M., Niehuis, M.-J., van Lisdonk, N., Mertens, K. & Thai, K.T.D. Hollanti</p>	<p>Rapid detection of dermatophytes using the Seegene Novaplex™ dermatophyte assay 2023</p>	<p>Tutkittiin 61 iho-, kynsi-, hius- ja viljelynäytettä. Vertailumenetelmä RT-PCR.</p>	<p>Spesifisyys 94.3-97.9% ja sensitiivisyys 94,1%. Tutkimuksen luotavuutta heikensi se, ettei tutkittu ei-dermatofyyttejä, positiivisten näytteiden määrä oli pieni ja lajikirjo suppea.</p>

5 (5)

Walser, M. & Boss-hard, P.P. Sveitsi	Development and evaluation of a pan-dermatophyte polymerase chain reaction with species-level identification using sloppy molecular beacon probes 2018	Tutkittiin 306 hius-, iso- ja kynsinäytettä viljelyllä, värjäyksellä ja PCR-tutkimuksella. Käytössä oli kahden putken PCR, jossa ensimmäisessä oli dermatofyyttispesifit alukkeet ja toisesta saatiin tarkempi lajimääritys.	PCR-tutkimuksen sensitiivisyys oli 96,9% ja spesifisyys 90,4%. Viljelyllä vastaavat luvut olivat 46,7% ja 98,7%. Näytteistä 46,4% oli värjäyspositiivisia, viljellyistä näytteistä dermatofyyttiposiitivisia oli 19,6%. PCR-tutkimuksessa 44,8% näytteistä oli dermatofyyttiposiitivisia. Myös muita sienilöydöksiä tehtiin sekä viljelyllä että PCR-tutkimuksella. PCR-tutkimus toimii hyvin dermatofyyttien tunnistamiseen ja on nopea.
Watanabe, S. & Ishida, K. Japani	Molecular Diagnostic Techniques for Onychomycosis: Validity and Potential Application 2017	Tutkimuksessa tehtiin viljely ja PCR-tutkimus 149 värjäyspositiiviselle kynsinäytteelle.	Näytteistä 95,3% oli PCR-positiivisia ja viljelypositiivisia 69,8%. Yhtään PCR-negatiivista näytettä ei ollut viljelyssä positiivista.

Liite 3. Värjäys-, PCR-, ja viljelytulokseen kulunut aika vuorokausissa näytteenotto-päivämäärästä alkaen näytekohtaisesti

näyte	värjäys	PCR	viljely
1	1	8	42
2	1	8	14
3	1	8	42
4	2	9	43
5	1	8	42
6	1	8	42
7	1	8	42
8	2	8	22
9	2	8	15
10	1	7	13
11	1	7	21
12	1	6	33
13	1	6	40
14	1	6	7
15	1	6	12
16	3	8	9
17	1	6	11
18	2	7	13
19	1	16	14
20	1	16	40
21	1	15	13
22	1	15	20
23	1	15	13
24	1	15	39
25	2	16	14
26	2	16	14
27	1	15	34
28	1	15	14
29	1	15	39
30	3	14	13
31	4	15	19
32	3	14	33
33	3	14	34
34	4	15	14
35	3	14	6
36	1	11	15
37	1	11	15
38	1	11	22
39	1	10	41
40	1	10	9

näyte	värjäys	PCR	viljely
41	1	8	11
42	1	8	8
43	1	8	27
44	3	7	11
45	3	7	26
46	3	7	11
47	1	14	40
48	1	14	13
49	1	14	13
50	1	14	22
51	1	14	21
52	1	13	20
53	2	14	21
54	1	13	12
55	2	14	27
56	1	13	39
57	1	13	12
58	1	13	39
59	1	13	12
60	1	8	28
61	1	8	34
62	1	8	21
63	3	8	34
64	2	7	33
65	2	7	33
66	3	8	34
67	2	7	40
68	2	7	14
69	1	6	32
70	1	6	13
71	1	6	8
72	2	7	14
73	1	6	13
74	1	6	13
75	4	6	39
76	3	5	38
77	3	5	18
78	3	5	31
79	3	5	19