



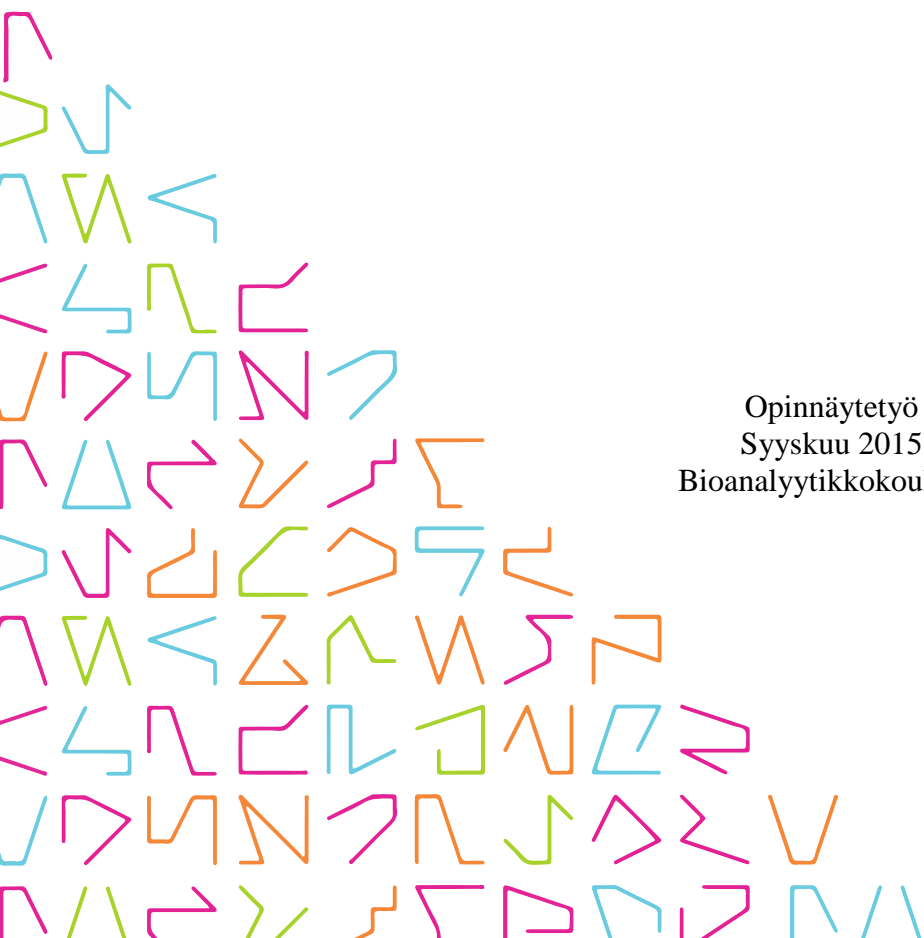
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KVANTITATIIVISEN PCR-MENETELMÄN VALIDOINTI *mecC* MRSA -KANNALLE

Silja Tuominen

Hanna-Kaisa Vinkanharju

Opinnäytetyö
Syyskuu 2015
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus
12BIO

SILJA TUOMINEN & HANNA-KAISA VINKANHARJU:
Kvantitatiivisen PCR -menetelmän validointi *mecC* MRSA -kannalle

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Elokuu 2015

Bakteerien nopea evoluutio tuo haasteita lääketieteelle, josta hyvänä esimerkkinä on metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA). Sen erotusdiagnoosi on tärkeää potilaan hoidon kannalta, vaikka MRSA:n aiheuttamat infektiot ovat suurilta osin samanlaiset vaikeustasoltaan ja taudinkuvaltaan kuin herkän *S. aureuksen* aiheuttamat infektiot. Mikrobilääkeresistenttiyden takia MRSA:ta varten tulee olla sensitiivinen ja spesifinen analyysimenetelmä, jotta sen aiheuttamat infektiot saadaan hoidettua nopeasti ja tehokkaasti oikean hoitovasteen antavalla mikrobilääkkeellä. MRSA:n variantti *mecC*-kanta (*mecC* MRSA) tuo potentiaalisen aukkokohdan tähän MRSA diagnostiikkaan, joka tulee sulkea pois menetelmien validoinnilla. Tällöin varmistutaan, että myös *mecC* MRSA tunnistetaan oikein MRSA:ksi.

Opinnäytetyön toimeksiantajana oli Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian ja molekyylibiologian yksikkö. Työn tarkoituksena oli testata *mecC*-PCR -menetelmän spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä. Tavoitteenamme oli tuottaa tuloksia osana *mecC*-PCR -menetelmän validointia. Opinnäytetyön teoriaosuudessa käsitelimme *S. aureusta*, *mecA* ja *mecC* MRSA:ta sekä reaaliaikaista polymeerasiketjureaktioita.

Kokeellisessa osuudessa analysoimme 17 eri bakteerikantaa kolmella eri PCR-ohjelmalla. Optimoimme PCR-ohjelmaa muokkaamalla kiinnittymis- ja pidennysaikoja sekä syklien lukumäärää. Parhaan tuloksen antoi PCR-ohjelma 2, jonka spesifisyys oli 84,6 %, positiivinen ennustearvo 50 % ja negatiivinen ennustearvo 100 %. Menetelmän sensitiivisyyttä määritettyämme laimennussarjan avulla voimme todeta, että analyysimenetelmä antaa positiivisen tuloksen reaktioseoksen sisältäessä bakteeria 375 pmy (pesäkkeen muodostava yksikkö). Reaktioseoksen sisältäessä 75 pmy:tä *mecC* MRSA:ta, tulos oli negatiivinen.

ABSTRACT

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

SILJA TUOMINEN & HANNA-KAISA VINKANHARJU:
Validation of Quantitative PCR Method for *mecC* MRSA Strain

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 9 pages
August 2015

The purpose of this study was to test the specificity and sensitivity of *mecC* PCR method. The study was conducted in co-operation with Fimlab Laboratories Ltd, Department of Clinical Microbiology and Molecular Biology. The objective of this study was provide results that Fimlab Laboratories Ltd can utilise as part of validation of *mecC* PCR method.

The data were collected using the 17 different bacterial strains which were further analysed using three different PCR programmes. We optimised PCR programme by adjusting the annealing and extension times, as well as the number of cycles.

The results reveal that the PCR programme 2 was the most specific. Its specificity was 84,6 %, the positive predictive value was 50 % and the negative predictive value was 100 %. The sensitivity analysis revealed that when the reaction mix include 375 cfu (colony forming unit) bacteria, the analysis method gave a positive result by means of the PCR programme 2. When the reaction mix include 75 cfu *mecC* MRSA the result was negative.

Key words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, *mecC*, polymerase chain reaction

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	6
2.1	Stafylokokit ja <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> aiheuttamat infektiot ja niiden hoito.....	7
2.3	Patogeenisyys.....	7
2.4	MRSA	9
2.5	<i>mecC</i> MRSA	12
2.6	<i>Staphylococcus aureus</i> -kantojen diagnostiikka.....	14
3	POLYMERAASIKETJUREAKTIO	17
3.1	PCR:n periaate	17
3.2	Kvantitatiivinen PCR.....	18
3.3	LightCycler® 2.0 -analysointilaitteen toimintaperiaate	18
4	TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE.....	22
5	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	23
6	KOKEELLISEN OSUUDEN TOTEUTUS	25
6.1	Opinnäytetyöprosessi.....	25
6.2	DNA:n eristys	25
6.3	Ajojen valmistelu.....	26
6.4	Ajot	27
7	TULOKSET	30
7.1	Menetelmän spesifisyys	30
7.2	Menetelmän herkkyys.....	33
7.3	Tulosten yhteenvedo	34
8	POHDINTA.....	36
	LÄHTEET.....	39
	LIITTEET	42
	Liite 1. Laimennosohje.....	42
	Liite 2. PCR-ajot.....	43
	Liite 3. Tulokuvat	46

1 JOHDANTO

Bakteerit tuovat haasteita lääketieteelle nopean evoluutionsa vuoksi, josta hyvänä esimerkkinä on metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), joka on kehittänyt käytännössä katsoen kaikkia kliinisessä käytössä olevia mikrobilääkeryhmiä kohtaan lääkeresistenttityden (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010). Viime vuosina MRSA:n esiintyminen on lisääntynyt monissa maissa nopeasti. Suomessa vuonna 1995 MRSA-löydöksiä oli 89 ja vuonna 2013 löydöksiä oli jo 1289 eli löydösten määrä on noin 15-kertaistunut 18 vuoden aikana (Jaakola ym. 2014, 30.)

Kliinikon näkökulmasta MRSA on ongelmallinen, sillä se aiheuttaa infektiio- ja tartuntaepidemioita sairaaloissa. Tavallisimmin tartunta leviää potilaasta toiseen henkilökunnan käsien välityksellä, joten tartunnan leviämisen ennaltaehkäisyä tulisi noudattaa hyvää käsihygieniää ja sairastuneiden kosketuseristystä. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) Bakteerien leviämisen ehkäisy ja hoito aiheuttavat yhteiskunnalle lisäkustannuksia (WHO 2015).

Opinnäytetyömme on osa Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratorion kvantitatiivisen PCR -menetelmän validointia metisilliinille resistentin *Staphylococcus aureus* -bakteerin *mecC*-varianttikannalle. Tämä kanta on löydetty vuonna 2011 ja se on antanut väärän negatiivisen tuloksen *mecA*-tunnistusmenetelmällä (Paterson, Harrison & Holmes 2014, 42–44). Standardissa ISO 15189 Lääketieteelliset laboratoriot - Eri-tyisvaatimukset laadulle ja pätevyydelle on määritelty, että laboratorion tulee käyttää vain validoituja menetelmiä. Validoinnin tarkoituksena on taata, että menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset ja menetelmä sopii käyttötarkoitukseensa. (Izquierdo Álvarez & Bernabeu Andreu 2011, 209–211.)

Työmme tarkoituksena on määrittää *mecC*-PCR -menetelmän spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä. Tavoitteenamme on tuottaa tuloksia osana *mecC*-PCR -menetelmän validointia. Työssämme käytämme 17 bakteerikantaa, joiden avulla pyrimme säätämään PCR-ajo-ohjelmaa optimaaliseksi, jolloin *mecC*-kannan tunnistaminen on spesifistä. Menetelmän sensitiivisyyttä määritämme *mecC*-kantaa sisältävällä laimennossarjalla. Työelämäohjaajana toimii sairaalamikrobiologi Jari Hirvonen.

2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

2.1 Stafylokokit ja *Staphylococcus aureus*

Stafylokokit kuuluvat *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* -ryhmään, joka muodostuu grampositiivisista bakteereista (Huovinen ym. 2003, 98; Versalovic ym. 2011, 308), joilla on DNA:ssa vähän guaniini (G) ja sytosiini (C) emäspareja. Stafylokokit ovat grampositiivisia, liikkumattomia bakteereja, joilla ei ole itiötuotantoa. Pallomaiset bakteerisolut ovat halkaisijaltaan 0.5–1.5 µm ja esiintyvät yksittäin, pareittain, neljän ryhmässä tai lyhyinä ketjuina, jotka luonteenomaisesti jakaantuvat useampaan tasoon ja sen tähden muodostavat epätasaisia ryhmiä. Vaikkakin yleensä stafylokokki on katalaasiposiitiivinen myös katalaasinegatiivista lajeja on tavattu. Suurin osa stafylokokeista ovat oksidaasinegatiivisia lukuunottamatta esimerkiksi *S. lentus* ja *S. sciuri*. (Versalovic ym. 2011, 308.)

Bakteerien aineenvaihdunta tapahtuu hengityksen ja käymisen avulla. Soluseinä rakentuu peptidoglykaanista ja teikkohapoista (Versalovic ym. 2011, 308). Teikkohapot koostuvat glyserolifosfaatti- tai ribitolifostaattirakenteisista polymeereistä, joissa on sivuhaaroina sokereita tai D-aminohappoja. Sivuhaarat aikaansaavat eri bakteerien teikkohappojen antigeenisen spesifisyyden. Teikkohapot ovat happamia molekyylejä, jotka sitovat kationeja ja vaikuttavat solun ionitasapainoon. Solun pinnan happamuuden ansiosta bakteeri pystyy pitämään muun muassa fagosyytit loitolla. Peptidoglykaania pilkkovien entsyymien aktiviteettia säätelevät lipoteikkohapot. (Huovinen ym. 2003, 62.) Stafylokokit ovat herkkiä lysostafiineille. (Versalovic ym. 2011, 308.)

S. aureus on bakteeri, joka aiheuttaa laajalti sairauksia ihmisissä, pienistä ihoinfektioista ankarampiin tauteihin, kuten bakteremia (bakteereita verenkierrassa), endokardiitti (sydämen sisäkalvon tulehdus) sekä pneumonia (keuhkokuume) (García-Álvares ym. 2011, 595). Valtaosa ihmisistä kantaa *S. aureusta* ajoittain nenässä tai nenänielussa ja iholla. Bakteeri leviää kosketus- tai aerosolitartuntana. Terve iho ja limakalvo suojaavat elimistöä infektioilta, mutta tartuntareitin ansiosta *S. aureus* voi päästä leviämään ihon syvempiin kerroksiin ja aiheuttaa infektion. (Hedman ym. 2010, 83.)

2.2 *Staphylococcus aureuksen* aiheuttamat infektiot ja niiden hoito

S. aureuksen aiheuttamat infektiot voidaan jakaa kahteen ryhmään joko märkiviin tai toksiinivälitteisiin infektioihin. Märkivien ryhmään sisältyy ihoinfektiot, jotka ovat hyvin yleisiä ja joihin kuuluvat muun muassa märkärupi, karvatupen tulehdus eli follikuliitti ja synnytyksen jälkeinen rintatulehdus. Tähän ryhmään kuuluvat myös bakteremia, endokardiitti, osteomyeliitti eli luutulehdus, leikkaushaavainfektiot ja keuhkokuume. Puolestaan toksiinivälitteisten infektioiden ryhmään kuuluvat ruokamyrkytys, toksinen shokkioireyhtymä sekä rakkulainen ja hilseilevä ihottuma eli SSS-oireyhtymä (scalded skin syndrome). (Levinson 2014, 112–114.)

Epäiltäessä potilaan sairastavan *S. aureuksen* aiheuttamaa infektiota kliinisen taudinkuvan perusteella, tulisi avohoito aloittaa ensimmäisen polven kefalosporiinilla, kun taas sairaalahoito aloitetaan esimerkiksi stafylokokkipenisilliinillä. Mikäli potilas on allerginen penisilliinille, annetaan hänelle vakavissa infektioissa suoneen toisen polven kefalosporiinia tai vaihtoehtoisesti vankomysiiniä, joka ei vastaa kuitenkaan teholtaan β -laktaamiryhmän antibiootteja. Paikallishoito on yleensä riittävä pinnallisissa ihoinfektioiden, jolloin voidaan käyttää esimerkiksi mupirosiinia tai fusidiinihappoa sisältävää antimikrobivoidetta. (Hedman ym. 2010, 91–92.)

2.3 Patogeenisyys

S. aureuksella on lukuisia virulenssitekijöitä mukaan lukien enterotoksiinit, sytolyttiset toksiinit ja solukomponentit, kuten proteiini A. Näistä virulenssitekijöistä huolimatta luonnollinen vastustuskyky *S. aureusta* vastaan on melko korkea ja se luetaankin opportunistiksi patogeeniksi. (Mahon, Lehman & Manuselis 2014, 316.) Opportunistisena mikrobina isäntäelimistön vastustuskyvyn heikentyessä *S. aureus* muuttuu taudinaiheuttajaksi, joka se ei ole normaalisti. Isäntäelimistön puolustuskyvyttömyys voi johtua esimerkiksi immuunikadosta, vaikeasta kudonsvauriosta, kuten leikkaushaavat, tai vanhuudesta. (Terveyskirjasto 2015a.)

Staphylococcus aureus -kannoilla on kliinisesti kolme tärkeintä eksotoksiinia, jotka ovat enterotoksiini, eksfoliativiset toksiinit ja enterotoksiini F eli TSST-1 (toxic shock syndrome toxin). Enterotoksiinit aiheuttavat ruokamyrkytyksiä, joihin kuuluu huomattavaa

oksentelua ja vetistä ripulia. Enterotoksiinit ovat erittäin lämmönkestäviä ja sen takia ne eivät inaktivoidu kuumentamalla. Ne ovat myös resistenttejä mahahapoille sekä mahassa ja ohutsuolessa oleville entsyymeille. (Levinson 2014, 112; Hedman ym. 2010, 85–86.) Enterotoksiineja on yhdeksän immunologisesti erilaista tyyppiä A–E ja G–J. *Staphylococcus aureus* -kannoista 30–60 % tuottaa näitä enterotoksiineja. Nämä enterotoksiinit ovat TSST-1 kanssa superantigeneja, joilla on kyky vuorovaikuttaa monien T-solujen kanssa aktivoituneen aggressiivisen ja ylireagoivan immuunivasteen. (Mahon ym. 2014, 317.)

S. aureus tuottaa TSST-1:tä paikallisesti vaginassa, nenässä tai muualla infektoidussa paikassa. TSST-1 aiheuttaa toksisen shokin henkilöille, joilla ei ole vasta-aineita TSST-1:tä vastaan. Riskiryhmässä ovat etenkin menstruovat naiset, jotka käyttävät tamponeja, sekä henkilöt, joilla on haavainfektio. Mikäli toksiini siirtyy verenkiertoon, aiheuttaa se siellä toksemian, mutta itse *S. aureus* ei tyypillisesti kasva veriviljelyssä. TSST-1 superantigeenina vapauttaa suuren määrän interleukiini 1 ja 2 sekä TNF:ää (tumor necrosis factor), jotka aiheuttavat toksisen shokki-oireyhtymän. Noin 5–25 % *S. aureus* -kannoista omaa TSST-geenin. (Levinson 2014, 112; Hedman ym. 2010, 86.)

Eksofoliatiiviset eli epidermolyyttiset toksiinit vaikuttavat solujen välisiin liitoksiin, desmosomeihin, aiheuttaen epidermoksen irtoamisen granulaatiokerroksesta. Nämä toksiinit aiheuttavat hilseilevän ja rakkulaisen ihottuman (SSS-oireyhtymä) pienille lapsille. (Levinson 2014, 112.)

S. aureus tuottaa ekstrasellulaarisia proteiineja, jotka vaikuttavat punasoluihin ja leukosyytteihin. Nämä hemolysiinit ja leukokiniinit ovat sytolyttisiä toksiineja, joiden ominaisuudet eroavat aiemmin esitellyistä toksiineista. *S. aureus* tuottaa neljää hemolysiiniä, joita ovat alfa, beeta, gamma ja delta. α -hemolysiini, punasolujen hajotuksen lisäksi, voi vahingoittaa verihiutaleita ja makrofageja sekä aiheuttaa vakavia kudolvaurioita. β -hemolysiini vaikuttaa sfingomyeliiniin punasolujen solukalvoissa ja sitä kutsutaankin ”hot-cold” lysiiniksi, sillä se vaihtaa hemolysointiaktiiviteettiään ensin inkuboidessa +37 °C ja tätä seuranneessa altistuksessa kylmälle +4 °C. δ -hemolysiiniä löydetään myös suuresta osasta *S. aureus* -kantoja, mutta sitä pidetään vähemmän toksisena soluille, kuin α - ja β -hemolysiinejä. Puolestaan γ -hemolysiiniä löydetään usein vain Panton-Valentine leukokiniinin (PVL) yhteydestä. PVL on eksotoksiini, joka on tappava liuskatumaisille leukosyyteille. Sen on osoitettu edistävän organismin invasiivisuutta

vaimentamalla fagosytoosia ja olevan yhteydessä vakaviin ihoinfektioihin sekä nekroottiseen keuhkokuumeeseen. Vaikka tätä eksotoksiinia tuottaa vain suhteellisen harvat *S. aureus* -kannat, se usein liittyy avohoidon stafylokokki-infektioihin. (Mahon ym. 2014, 317.)

Stafylokokit tuottavat myös muutamia entsyymejä, kuten koagulaasia, proteaasia, hyaluronidaasia ja lipaasia. Stafylokoagulaasia tuottaa pääasiassa *S. aureus*. Vaikka koagulaasin rooli patogeneisyydessä on epävarma, sitä on pidetty virulenssin merkinä. Monet *S. aureus* -kannat tuottavat myös hyaluronidaasia, joka hydrolysoi hyaluronihappoa. Hyaluronihappoa on soluväliaineessa, joka puolestaan muodostaa sidekudoksen. Hajottaessa hyaluronihappoa hyaluronidaasi mahdollistaa samalla bakteerien leviämisen infektion aikana sidekudoksen rakenteen vaurioituessa. Proteaasi ja lipaasi kykenevät tuhoamaan kudosta hyaluronidaasin tavoin ja näin ne voivat johtaa infektion leviämisen viereisiin kudoksiin. (Mahon ym. 2014, 317.)

Proteiini A on yksi solukomponentti, joka on tunnistettu *S. aureuksen* soluseinästä. Proteiini A:n merkittävin rooli *S. aureuksen* aiheuttamissa infektioissa lienee sen kyky sitoa immunoglobuliini G:n Fc-osaa. Immunoglobuliini G:n (IgG) sitominen voi tässä tapauksessa estää fagosytoosin ja IgG:n suojaavan vaikutuksen. (Mahon ym. 2014, 317.)

2.4 MRSA

Suomessa suurin osa, noin 80 %, *S. aureus* -kannoista on resistenttejä penisilliinille (Hedman ym. 2010, 89). Resistenttiys johtuu bakteerien kyvystä tuottaa β -laktamaasia, joka hajottaa β -laktaamirenkaan monista penisilliineistä hajottaen lääkkeen rakennetta ja tehden siitä näin tehottoman (Mahon ym. 2014, 324). Penisillinaasia kestävät penisilliinit eli ns. stafylokokkipenisilliinit, esimerkiksi kloksasilliinit ja dikloksasilliinit, ovat tehokkaita tällaisia kantoja vastaan. Nykyään on kuitenkin *S. aureus* -kantoja, jotka ovat resistenttejä myös näille stafylokokkipenisilliineille. Näitä kantoja kutsutaan metisilliiniresistenteiksi *Staphylococcus aureuksiksi* (MRSA) ja ne ovat resistenttejä aina myös β -laktaamiantibioteille. (Hedman ym. 2010, 89–90.)

MRSA-kantojen resistenttiys perustuu bakteerin kromosomissa olevaan *mecA*-geeniin, joka sijaitsee geenikasetissa nimeltä *SCCmec*. *MecA*-geenin avulla soluseinään muodos-

tuu muuntunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia (PBP2, PBP2a). Normaalisti β -laktaami sitoutuu PBP:hen, joka on välttämätön bakteerin soluseinän biosynteesissä. β -laktaamin sitoutuminen estää peptidoglykaanien ristsidosten muodostumisen johtaen bakteerisolun hajoamiseen. Muuntunut penisilliiniä sitova proteiini ei sido oksasilliinia tehden lääkkeestä tehottoman. Tällöin MRSA-kannoilla soluseinän biosynteesit jatkuvat huolimatta läsnäolevasta estävästä määrästä β -laktaamiantibioottia. (Mahon ym. 2014, 325; Paterson ym. 2014, 42.) MRSA-kannat ovat usein moniresistenttejä, jolloin ne ovat resistenttejä beetalaktaamien lisäksi ainakin kolmelle muulle mikrobilääkkeelle, kuten esimerkiksi kefalosporiineille ja karbapeneemeille (Leinonen 2012 ; Hedman ym. 2010, 90). Kaikkiin MRSA-kantoihin tiedetään vielä tehoavan glykopeptidiantibiootit. Tosin joistain ulkomaisista sairaaloista on löytynyt MRSA-kantoja, joiden herkkyys glykopeptidiantibiootteja kohtaan on heikentynyt. (Hedman ym. 2010, 90.)

Viime vuosina MRSA-kantojen lisääntyminen on ollut monissa maissa erittäin nopeaa. MRSA:n osuus kaikista *S. aureus* -eristyksistä on vaihdellut yleisimmin 5 % ja 30 % välillä yhdysvaltalaisissa sairaaloissa, mutta joissain sairaaloissa luku on ollut jopa 70 %. Myös Suomessa uusien MRSA-tapausten määrä on huomattavasti lisääntynyt aiempaan verrattuna, vaikka Pohjoismaiden MRSA-tilanne kuuluukin maailman parhaisiin. (Hedman ym. 2010, 90.)

Taudinaiheuttajina MRSA-kannat eivät ole selvästi vaarallisempia kuin herkät *S. aureus*-*ukset*, vaan infektiot ovatkin suurelta osin samanlaisia vaikeusasteeltaan ja taudinkuvaltaan. MRSA aiheuttaa sairaalasyntyisiä luu- ja leikkaushaavainfektioita sekä septisiä yleisinfektioita. Oman haasteensa kuitenkin tuo MRSA:n mikrobilääkeresistenssi, joka vaikeuttaa infektioiden hoitoa. Lisäksi MRSA on ongelmallinen siitä syystä, että se saattaa levitä nopeasti ja aiheuttaa infekti- ja tartuntaepidemioita sairaalassa. Tartunnan saanut henkilö voi pysyä kantajana vuosikautia ja olla näin sairaalahoidon aikana muiden potilaiden jatkuvana tartunnanlähteenä, sillä bakteerin pitkäaikaiskantajuuden poisto onnistuu harvoin. Puolestaan henkilökunta voi kolonisoitua MRSA-positiivisia potilaita hoitaessaan. (Hedman ym. 2010, 90.) Tällöin MRSA asettuu lisääntymään osaksi normaaliflooraa, mutta ei aiheuta tautia (Terveyskirjasto 2015b).

MRSA:ta voi löytyä myös avohoidossa potilaalta otetusta kliinisestä viljelynäytteestä. Tällöin kyseessä voi olla avohoitosyntyinen MRSA-tartunta, mikäli potilas ei ole ollut sairaalahoidossa tai töissä sairaalassa, ulkomailta tai hänellä ei ole ollut kontakteja

MRSA:n kantajiin. Tyypillisesti avohoidon MRSA-infektiot ovat pehmytkudos- ja ihoinfektioita kuten märkärupi ja paiseet. Avohoidon MRSA-kannat (community-associated MRSA, CA-MRSA) ovat perimältään ja mikrobilääkeherkkyydeltään erilaisia verrattuna sairaalaperäisiin MRSA-kantoihin (hospital-associated MRSA, HA-MRSA). Yleensä avohoidon MRSA-kannat eivät ole moniresistenttejä. Nämä avohoidon MRSA-kannat ovat vastustuskykyisiä β -laktaamiryhmän antibiooteille, mutta monet muut bakteerilääkkeet ovat usein tehokkaita näille kannoille. Nämä MRSA-kannat voivat toisaalta olla poikkeuksellisenkin invasiivisia, sillä eri maista on raportoitu vakavia ja jopa kuolemaan johtaneita avohoidossa alkaneita MRSA-infektioita. (Mahon ym. 2014, 324; Hedman ym. 2010, 90–91.)

Vaikka *S. aureus*, mukaan lukien MRSA, on ihmisen merkittävä patogeeni, se voi kolonisoida ja infektoida laajan määrän isäntälajeja, kuten karjaa, villieläimiä ja lemmikkieläimiä. Infektiot saavat aikaan merkittäviä taloudellisia vaikutuksia aiheuttaessaan esimerkiksi utaretulehduksia lypsykarjalle, raajarikkoisuutta siipikarjalle sekä vakavia ja kuolemaan johtavia infektioita tarhatuille kaneille. Eläinten MRSA-tartunnat eivät kuitenkaan ole tärkeitä ainoastaan eläinten hyvinvoinnin tai taloudellisen näkökulman takia, vaan ne voivat toimia myös lähteenä zoonoottisille infektioille ihmisillä. Etenkin multilokaalinen sekvenssi, tyyppiä (CC) 398, on runsas sikojen ja muun karjan keskuudessa Manner-Euroopassa. Infektiot ihmisillä, jotka ovat näiden eläinten kanssa läheisissä tekemisissä, on johtanut epidemiologisesti kolmannen tyyppisen MRSA-muodon havaitsemiseen, eläinperäinen MRSA (livestock-associated MRSA, LA-MRSA). (Paterson ym. 2014, 42.)

MRSA:n havaitseminen ja diagnosointi on tärkeää kliinisessä mikrobiologiassa, sillä ne antavat tietoa sekä yksittäisen potilaan sopivasta hoidosta että MRSA:n seurannasta. Kultaisena standardina MRSA:n varmentamisessa käytetään joko polymeraasiketjureaktiota (PCR) *mecA*-geenin tunnistamiseksi tai vasta-aineita PBP2a:n tunnistamiseksi liuska-agglutinaatiotestillä. Ratkaisevan tärkeää näiden menetelmien luotettavuudelle on se, että *mecA* ja PBP2a ovat hyvin säilyneet MRSA-isolaattien keskuudessa. (Paterson ym. 2014, 42.) Tartuntatautilain mukaan MRSA on Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) kliinisen mikrobiologian laboratorion tartuntatautirekisteriin ilmoitettava löydös. Lisäksi löydetty MRSA-kanta tulisi lähettää jatkotyyppityksiin THL:n sairaalainfektiolaboratorioon. (Hedman ym. 2010, 91.)

MRSA-infektioiden hoidossa noudatetaan samoja periaatteita kuin hoidettaessa herkkeen *Staphylococcus aureus* -kantojen aiheuttamia infektioita lukuun ottamatta mikrobilääkevalintoja. Eniten näyttöä vakavien MRSA-infektioiden hoidossa on vankomysiinin ja teikoplaniinin tehosta. Muita MRSA:han tehoavia suoneen annettavia mikrobilääkkeitä ovat linetsolidi, tigesykliini ja daptomysiini. Vakavan MRSA-infektion hoito aloitetaan tavallisimmin joko teikoplaniinilla tai vankomysiinillä. MRSA on vaihtelevasti herkkä muille stafylokokki-infektioissa käytetyille mikrobilääkkeille kuten rifampisii-nille, fluorokinoloneille ja klindamysiinille, joita voidaan käyttää joissain erikoistapauk-sissa lievempien MRSA-infektioiden hoitoon herkkuysmääritysten perusteella. Mikäli hoitovaste ei ole suotuisa, mikrobilääke on vaihdettava sellaiseen, jolla tiedetään olevan MRSA-tehoa. (Hedman ym. 2010, 94.)

2.5 *mecC* MRSA

Vuonna 2007 epidemiologinen tutkimus nautaeläimen utaretulehduksesta, joka oli il-miasultaan MRSA:n aiheuttama (resistentti oksasilliinille ja kefoksitiinille), johti *S. au-reus* -isolaatin, LGA251, eristämiseen tankkimaitonäytteestä Lounais-Englannissa. Varmistustutkimuksissa *mecA*-geeniä ja PBP2a:a vastaan tulokset olivat toistettavasti negatiivisia. Genomi LGA251 sekvensoitiin Wellcome Trust Sanger Instituutissa. Sek-vensointi paljasti, että kyseisellä kannalla oli uudenlainen *mecA*-homologi, *mecA*_{LGA251}, joka oli vain noin 69 % identtinen DNA-tasoltaan tavanomaiseen *mecA*-geeniin verrat-tuna ja geenin koodaama proteiini oli aminohappotasoltaan noin 63 % identtinen tavan-omaisen PBP2a kanssa. Nämä tulokset selittivät kannan resistenttiyden, mutta myös sen, miksi *mecA*-geenin PCR-tulos oli negatiivinen ja samoin PBP2a liuska-agglutinaatiotesti. (Paterson ym. 2014, 42–43.)

Takautuvat tutkimukset eristyskokoelmista Englannissa ja Ranskassa tunnistivat 65 iso-laattia lisää positiiviseksi *mecA*_{LGA251}-isolaateiksi, jotka olivat peräisin lypsykarjan li-säksi myös ihmisistä. Vaikka tämä *mecA*_{LGA251} löydettiin äskettäin, se on saattanut aihe-uttaa ihmisille infektioita jo yli 35 vuoden ajan. *MecA*_{LGA251} uudelleennimettiin vuonna 2012 *mecC*:ksi. (Paterson ym. 2014, 43.)

Tanskassa *mecC*:n esiintyvyys kaikista MRSA-tapauksista oli 1,9 % vuonna 2010 ja sen esiintyvyys nousi 2,8 %:iin vuonna 2011. Toisaalta Saksassa löytyi ainoastaan kaksi

mecC-isolaattia 3 207 isolaatin joukosta, jolloin esiintyvyys oli 0,06 %. Saksassa ei huomattu esiintyvyydessä muutoksia vuosina 2004–2005 ja 2010–2011. Puolestaan Englannissa *mecC* MRSA:n esiintyvyys oli 0,45 % vuonna 2010, jolloin löydettiin yhdeksän *mecC*-tapausta kaikista kerätyistä MRSA-isolaateista. Tällä hetkellä *mecC* MRSA näyttää olevan harvinainen ihmisillä, mutta mielenkiintoista maantieteellistä vaihtelevuutta esiintyvyydessä on havaittavissa. Tanskassa esiintyvyyden viimeaikainen nousu korostaakin *mecC*:n tarkkailun tarvetta. (Paterson ym. 2014, 44–45.) Suomessa *mecC* MRSA -tapauksia on löytynyt yhteensä noin 10 kappaletta (Hirvonen 2015). Vuonna 2013 *mecC* MRSA -tapauksia oli kolme kappaletta kaikista THL:een ilmoitetuista MRSA-tapauksista, joita oli 1289 kappaletta (Jaakola ym. 2013, 28).

Vaikka *mecC* MRSA:n alkuperä ei ole vielä selvinnyt, on olemassa hyvät todisteet, että kontaktit eläinten kanssa synnyttävät zoonoosin riskin ja *mecC* MRSA voi siirtyä eri lajien välillä. Tästä syystä *mecC* MRSA:ta voidaan pitää eläinperäisenä MRSA:na eli LA-MRSA:na. Esimerkiksi Tanskassa suurin osa isolaateista tuli maaseutualueilta ja epidemiologisessa seurannassa olleista 22 potilaasta löytyi neljä tapausta, jossa tiedettiin eläinkontaktin tapahtuneen. (Paterson ym. 2014, 45.)

MecC MRSA:n aiheuttamat infektiot ihmisillä ovat pääasiassa iho- ja pehmytkudosinfektioita, mutta se voi aiheuttaa myös vakavia luuinfektioita, avohoidon keuhkokuumeita sekä kuolemaan johtavia bakteremioita. *MecC* MRSA aiheuttaa tauteja myös eläinlajeilla, kuten utaretulehduksia lypsykarjalla. *MecC* MRSA:lla on samanlainen sukulaisuus tavanomaisen MRSA:n kanssa. Tästä johtuen ilmenee, että myös *mecC* MRSA -kannat ovat erittäin monipuolisia patogeenejä, jotka voivat aiheuttaa moninaisia infektiota eri isäntälajeissa, kuten *mecA* MRSA:kin. Nämä huomiot ovat yhtäpitäviä jatkotutkimustulosten kanssa, joissa paljastui, että *mecC* MRSA -isolaatit koodaavat muutamia tiedettyjä tai luultuja *S. aureuksen* virulenssitekijöitä, kuten muutamia superantigenejä ja toksiineita. (Paterson ym. 2014, 46.)

Tutkittaessa *mecC*:n koodaaman PBP2a:n toimintaa ja roolia resistenssissä β -laktaamia vastaan, merkillepantavaa oli ominaisuuksien erot *mecA*:n ja *mecC*:n koodittamien proteiinien välillä. Esimerkiksi PBP2a_{mecC}-proteiini satoi β -laktaamia, mutta sillä oli myös korkeampi affiniteetti eli taipumus kiinnittyä oksasilliiniin kuin kefoksitiiniin, kun taas PBP2a_{mecA} osoitti vähemmän tällaista valintaa. Vaikka *mecA*:n ja *mecC*:n koodittamilla PBP2a:lla on selviä biokemiallisia eroja, antaa *mecC* silti resistenttiyden metisilliiniä

vastaan, jolloin tällaiset kannat tulisi tunnistaa oikein MRSA:ksi diagnostisissa laboratorioissa. (Paterson ym. 2014, 42–44.)

MecC luo potentiaalisen aukkokohtan diagnosointiin, josta kliinisten mikrobiologian laboratorioiden tulisi olla tietoisia ja joka vaatii tutkimusmenetelmien validoinnin. Tällöin varmistutaan, että *mecC* MRSA tunnistetaan oikein MRSA:ksi. Validointi tulisi tehdä, vaikka vain varmistettaisiin, että nykyiset menetelmät ovat riittävät. (Paterson ym. 2014, 44.)

2.6 *Staphylococcus aureus* -kantojen diagnostiikka

Bakteeriviljelynäyte voidaan ottaa mistä tahansa ihmiskehon osasta ja näytteen mukana tulee olla aina lähete, josta selviää viljelyn kannalta tarpeelliset pyytäjän, potilaan ja näytteen tiedot (Koskela 2015, 54). Yleisin moniresistenttien bakteerien seulontatutkimus on MRSA-viljely, joka kuuluu lähes kaikkien mikrobiologian laboratorioiden tutkimusvalikoimaan (Rantakokko-Jalava 2013, 162). Bakteeriviljelyä varten tulee ottaa näytteenottotikuilla näytteet molemmista sieraimista, nielurisoista ja takanielusta. Lisäksi näytteet otetaan infektioporteista esimerkiksi kroonisista haavoista, drenien juurista tai ihottumasta. (Fimlab Laboratoriot Oy 2013.) MRSA-sivelynäyte voidaan rikastaa nestemäisessä elatusaineessa ennen maljalle viljelyä, joka parantaa herkkyyttä, mutta saattaa hidastaa tulosten saamista (Rantakokko-Jalava 2013, 162).

Primääriviljely tapahtuu rutiinisti veriagarille (lampaan veri). Tyypillisesti *S. aureus* -pesäkkeen väri vaihtelee kermaisen keltaisesta oranssiin, pesäkkeen muoto on pyöreä ja hieman koholla. Pesäke on hemolysoiva. (Versalovic ym. 2011, 316.) Myös kromogeeniset MRSA-maljat ovat yleisesti käytössä mikrobiologian laboratorioissa. Maljat sisältävät kefoksitiini-antibioottia, jota MRSA sietää kasvaen värillisinä pesäkkeinä. (Rantakokko-Jalava 2013, 162.) Kasvun väri johtuu maljalla olevasta väriyhdisteestä, jota *S. aureus* -kannat pystyvät pilkkomaan (Hirvonen 2015). *Staphylococcus aureus* voidaan erottaa muista stafylokokeista myös DNAasi maljalla. Menetelmä perustuu *S. aureuksen* kykyyn hajottaa DNA:ta deoksiribonukleasilla, jolloin metyylinvihreällä värjätty ehjä DNA hajoaa väriä vapauttaen. Tämä näkyy agarin kirkastumisena *S. aureus* -pesäkkeiden ympärillä. (Esko 1995, 25.) Diagnostiikassa voidaan käyttää myös muita viljelymaljoja. Bakteeriviljelyssä huomioitavaa on *S. aureuksen* pienipesäkkeiset ns.

SCV-variantit (small colony variants), joita on vaikea havaita bakteeriviljelymaljalla. (Hedman ym. 2010, 83.) Maljalta olevista pesäkkeistä tehdään jatkotutkimuksia, joilla varmistetaan lajintunnistus ja resistenssiominaisuus (Rantakokko-Jalava 2013, 162).

Staphylococcus aureus on grampositiivinen kokki, jolloin mikroskooppisesti tarkasteltuna ne näyttävät pallomaisilta ja ovat väriltään sinivioletteja. Viljelymaljalta otetaan bakteeripesäkkeitä, jotka levitetään objektilasille ja näyte kiinnitetään lasille kuumentamalla. Gram-värjäyksessä ensimmäisenä väriaineena käytetään kristalliviolettiä, jota seuraa jodikiinnitys. Seuraavaksi tehdään vesihuuhdeltu ja lisätään alkoholi, jonka tehtävänä on värin poisto. Lasi huuhdellaan jälleen vedellä ja lisätään safraniinia vastaväriksi. Bakteerisolun värjäytyy joko sinivioletiksi (grampositiivinen) tai punaiseksi (gramnegatiivinen) soluseinän perusrakenteesta riippuen. (Smith & Hussey 2013; Esko 1995, 29.)

Grampositiivisille kokeille tehdään katalaasikoe, joka perustuu mikrobin tuottamaan katalaasientsyymiin toimintaan. Kokeessa katalaasipositiivinen mikrobi pilkkoo vetyperoksidin vedeksi ja kaasumaiseksi hapeksi, joka näkyy selvänä kuplimisena. Stafylokokit ovat katalaasipositiivisia, jolloin ne voidaan erottaa tällä testillä muun muassa streptokokeista ja enterokokeista. (Esko 1995, 35.)

Staphylococcus aureus tunnistetaan koagulaasireaktion avulla muista stafylokokkiryhmän bakteereista. Testissä bakteerin pinnalla oleva rakenne, soluun sidottu koagulaasi, saa aikaan plasman hyytymisen muuttamalla fibrinogeenin fibriiniksi. Tätä ominaisuutta pidetään tärkeänä merkinä *S. aureus*-kantoista. On olemassa myös *S. aureus*-kantoja, joilla ei ole tällaista ominaisuutta. (Mahon ym. 2014, 321–324.)

Stafylokokkilajeja voidaan tunnistaa API-testien avulla. API-testiliuskassa on taskuja, jotka sisältävät reagensseja, joiden avulla määritetään bakteerin entsyymiaktiivisuutta tai kykyä hyödyntää sokereita joko rakennusaineena tai käymisreaktioissa. Inkubaation aikana metabolian seurauksena syntyy joko spontaanisti tai reagenssilisäyksen jälkeen silminnähtäviä värimuutoksia. Nämä reaktiotaskujen värimuutokset pisteytetään ja summataan, jolloin saadaan tunnistusnumerosarja, jolla voidaan hakea bakteerin nimi tietokannasta. (Global Health Laboratories 2013, 1; Kloos & Wolfshohl 1982, 509.)

Suomessa mikrobiologian laboratoriot ovat ottaneet ensisijaiseksi bakteerien lajimääritysmenetelmäksi MALDI-TOF MS -teknologian. Se on massaspektrometrinen mittaus-tekniikka, jossa tutkittavat molekyylit ionisoidaan ja erotellaan toisistaan niiden massa/varaus-suhteen perusteella lentoaika-analyssaattorissa. Bakteerikannalle luodaan laitteen ohjelmiston avulla proteiiniprofiili, jota verrataan tietokannassa oleviin referenssi-profiileihin. Lajimääritys perustuu riittävään samankaltaisuuden tietokannassa olevan profiilin ja tutkittavan mikrobin proteiiniprofiilin välillä. Menetelmän käytössä tulee ottaa huomioon maljalla näkyvä kasvusto, muut mahdolliset tunnistuskriteerit ja potilaan taustatiedot. (Kärpänoja 2014, 143, 145.)

MRSA voidaan tunnistaa herkstä *S. aureuksesta* agglutinaatiotestillä (esimerkiksi MRSA-screen) tunnistamalla *mecA*-geenin koodaama muuntunut soluseinäproteiini. Pesäkkeen tulee olla kasvanut kefoksitiinin tai oksasilliinin vaikutuksen alaisena, jolloin tulos on luotettava, vaikkakin joskus hankalasti tulkittava. Kasvanut kanta voidaan alustavasti vastata MRSA:na positiivisen agglutinaatiotuloksen perusteella. (Rantakokko-Jalava 2013, 162.) MRSA:n erotusdiagnostiikassa käytetään myös antibioottiherkkyyshmääritystä. Lääkeherkkyydeltään poikkeavien kantojen osoittamiseen on käytettävissä erilaisia menetelmiä, joille yhteistä on mitata bakteerin kykyä lisääntyä lääkkeen läsnäollessa. Jokainen laboratorio määrittää itse valikoiman, joita testataan tietyille bakteeriryhmille. (Nissinen 2009, 1, 4.) Esimerkiksi Fimlab Laboratoriot Oy käyttää stafylokokkien herkkyysmäärityksessä erytromysiiniä, penisilliiniä, klindamysiiniä, tetrasykliiniä, levofloksasiiniä, sulfatrimetopriimia, rifampisiiniä, tobramysiiniä, fusidiinihappoa, oksasilliiniä ja kefoksitiiniä. Mikäli kannan herkkyys on oksasilliinille alentunut ja/tai kanta kasvaa kefoksitiinimaljalla, tehdään kannalle *mecA* ja *S. aureus* -lajille spesifinen geenimääritys PCR-menetelmällä. *MecA*-geenimäärityksen jäädessä negatiiviseksi tulee tehdä jatkona *mecC*-geenin määritys. (Hirvonen 2015.)

MRSA voidaan tietyin rajoituksin todeta molekylaarisesti myös suoraan sivelynäytteestä MRSA-PCR:llä. Periaatteena on tunnistaa liitoskohta, jossa *mecA*-geenin sisältävä liikkuva geenikasetti SCCmec yhtyy *S. aureuksen* genomiin. Usein liitoskohdan lisäksi osoitetaan *mecA*-geeni sekä joku *S. aureuksen* lajitunnistuksen varmistava geeni. Nämä kolme tekijää varmistavat, että *mecA* ja *S. aureus* -signaali tulevat samasta bakteerista. Menetelmän heikkoutena on liitoskohdan toteaminen. SCCmec-kasetteja tunnetaan useita eri tyyppisiä ja sekvenssivaihtelua esiintyy, jolloin testi ei tunnista kaikkien MRSA-kantojen liitoskohtaa. (Rantakokko-Jalava 2013, 162.)

3 POLYMERAASIKETJUREAKTIO

3.1 PCR:n periaate

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on menetelmä, jolla voidaan monistaa tiettyä DNA-jaksoa. Ennen DNA:n analysointia se tulee eristää tutkittavasta kohteesta. Olennaista PCR-menetelmissä on, että DNA saadaan vapautettua solun sisältä. Täten kaikkiin PCR-menetelmiin ei tarvitse tehdä DNA:n eristystä ja puhdistusta, vaan niihin riittää, että DNA saadaan vapautumaan solun sisältä. (Suominen & Ollikka 2003, 61–63.) Huomioitavaa on, että monistettava DNA-jakso ei tarvitse erikseen eristää muun DNA-massan joukosta (Campbell & Farrell 2012, 377).

Monistusprosessi alkaa lämpötilan nostolla, jolloin kaksijuosteisen DNA:n kaksoiskierre aukeaa (denaturaatiovaihe). Tämän jälkeen alukkeet pariutuvat DNA-juosteiden kanssa (kiinnittymisvaihe) lämpötilan laskun myötä. Alukkeet ovat lyhyitä, pituudeltaan alle 10 kb (kilobase=1000 emäsparia), yksijuosteisia DNA-pätkiä, jotka ovat komplementaarisia valitun DNA-jakson päiden kanssa. Alukkeita on reaktiossa mukana kahdenlaisia ja niitä on reaktioon nähden ylimäärä. Alukkeiden avulla monistettava DNA-jakso rajataan, jolloin vain haluttu DNA-jakso monistuu alukkeiden välisellä alueella. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan, jolloin DNA-polymeraasientsyymi alkaa rakentaa uusia juosteita mallina toimivien juosteiden rinnalle 5'-3'-suunnassa (ekstensiovaihe). (Campbell & Farrell 2012, 377; Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010, 153–154.) Tämä ensimmäinen kierros kaksinkertaistaa halutun DNA-jakson määrän ja esimerkiksi tunnin päästä, noin 25-40 replikaatio- eli kopiointisyklin jälkeen, monistettavan DNA-jakson kopiomäärä on jo miljoonasta 100 miljoonaan kappaletta (Campbell & Farrell 2012, 377).

Tärkein vaihe PCR-menetelmän käytössä on alukkeiden suunnittelu. Alukkeiden täytyy olla riittävän pitkiä, jotta ne ovat riittävän spesifisiä monistettavan DNA-jakson kanssa, mutta ei liian pitkiä kalliin hinnan vuoksi. Normaalisti alukkeen pituus on 18-30 kb. Lisäksi alukkeilla tulee olla optimaaliset sitoutumisominaisuudet, kuten sytosiini- (C) ja guaniiniemästen (G) oikea määrä, jotka mahdollistavat alukkeiden sitoutumisen DNA-jaksoon ennen koko DNA:n uudelleen kiertymistä kaksoiskierteiseksi. Huomioitavaa on, että kahden eri alukkeen tulee sisältää saman määrän sytosiini- ja guaniiniemästä,

jotta niillä olisi sama sulamislämpötila. Alukkeiden sekvenssin tulisi olla sellainen, että ne eivät johda toissijaisten rakenteiden rajaamiseen DNA-juosteessa alukkeiden välillä eikä pariutumista tapahdu kahden erilaisen alukkeen välillä. Mikäli kopioitavaa DNA-jaksoa ei ole, alukkeet pariutuvat toistensa kanssa eli syntyy kahdenlaisia alukepareja, joissa samanlaiset alukkeet pariutuvat keskenään. (Campbell & Farrell 2012, 377–378.)

3.2 Kvantitatiivinen PCR

Yksi PCR-menetelmän sovelluksista on kvantitatiivinen PCR (qPCR). Menetelmässä PCR-reaktio tuottaa aikapiste-dataa (time-point data), jota voidaan hyödyntää määrittäessä kuinka paljon kyseistä DNA-jaksoa oli alun perin esimerkiksi solussa. Polymeerasiketjureaktio ajaa samanaikaisesti monia eri näytteitä, jotka sisältävät erilaisia kiinnostuksenkohteina olevia DNA-näytteitä. Syklimäärän noustessa saavutetaan raja-arvo, jolloin DNA-määrä voidaan mitata. Jotta syntyvän tuotteen määrää voidaan mitata reaaliaikaisesti, käytetään fluoresoivaa merkkiainetta, joka sitoutuu valmistuvaan kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen. Mitä enemmän näytteessä on monistettavaa DNA-jaksoa, sitä aiemmin ajon aikana tuloksia voidaan havaita. Tulokset näkyvät erivärisinä suorina tietokoneen piirtämässä kuvaajassa. (Campbell & Farrell 2012, 379–380.) Menetelmä nopeuttaa monistusprosessia ja DNA-ristikontaminaatoriski pienenee, sillä lopputuotetta ei tarvitse käsitellä. (Suominen ym. 2010, 166–168.) Ajamalla tunnettuja DNA-näytteitä saadaan muodostettua standardisuora, jota käytetään tuntemattoman näytteen DNA-määrän määrittämiseksi. Standardisuoraan merkataan aika, jossa tuntematon näyte saavutti ennalta määritetyn arvon. Vertailemalla näin tuntemattoman näytteen tulosta standardisuoran kanssa saadaan määritettyä näytteen DNA-määrä. (Campbell & Farrell 2012, 379–380.)

3.3 LightCycler® 2.0 -analysointilaitteen toimintaperiaate

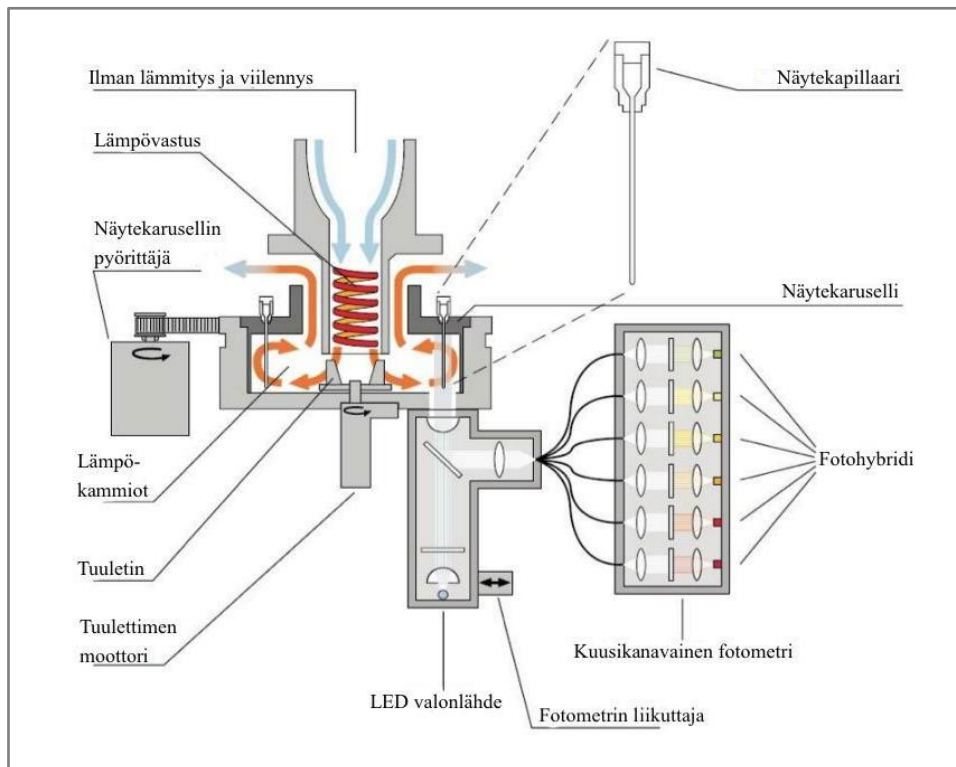
LightCycler® 2.0 on Roche'n suunnittelema laite (kuva 1), joka perustuu polymeerasiketjureaktioon. Laite havaitsee ja määrittää kohdenukleiinihapon reaaliaikaisesti fluoresenssia mittaamalla, jolloin nukleiinihappojen monistumista pystytään seuraamaan reaaliaikaisesti jo ajon aikana. LightCycler® 2.0 -laite on in vitro -diagnostinen sovellus ja sitä voidaan käyttää muun muassa oikeuslääketieteessä, ruoka-aineiden ana-

lyyseyssä sekä muissa laboratorioanalyysissä, joissa vaaditaan PCR-sovellusta ja sulamiskäyräanalyysijä. (Roche Diagnostics 2005, 10–11.) Sulamiskäyräanalyysin avulla voidaan tunnistaa mutaatioita ja tyyppittää valmistuneita tuotteita (Roche Diagnostics 2005, 23).



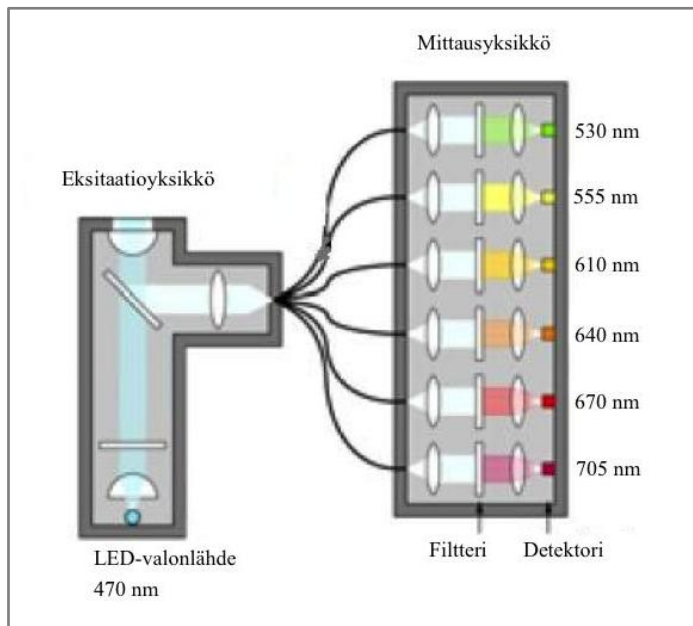
KUVA 1. LightCycler[®] 2.0 -analysaattori (Kuva: Hanna-Kaisa Vinkanharju 2015)

Analysaattori käyttää nopeatempoisten lämpötilavaihteluiden aikaansaamiseksi ilmaa lämpöblokkien sijaan. Laite käyttää ympäröivää ilmaa, jonka se lämmittää lämpökämmillä (kuva 2). Tuuletin sijaitsee lämpökammiossa varmistaen tehokkaan ilman kierron ja tasaisen lämpötilan syklin aikana. Lämpökammion lämpötilaa lisätään nostamalla lämpökämmiin jännitettä. Lämmitysvaiheessa tuuletin pyörii hitaalla nopeudella, kun taas viilennysvaiheessa tuuletin pyörii nopeampaa viilentäen kapillaarit ja lämpökammion tehokkaasti. Laite pyörittää näytekarusellia lämpökammiossa asettaen näytekapillaarin fotometrin luettavaksi. (Roche Diagnostics 2005, 36.)



KUVA 2. LightCycler® 2.0 -laitteen rakenne (Roche Diagnostics 2005, 36, muokattu)

Analysaattorin fotometri koostuu kahdesta yksiköstä eksitaatio- eli viritysyksiköstä ja mittausyksiköstä. Viritysyksikössä on sininen LED-valonlähde, jonka aallonpituus on 470 nm. Sininen LED toimii energianlähteenä näytteiden fluorokromin eksitaatiossa eli virittymisessä. Emittoitunut fluoresenssivalo heijastetaan takaisin fotometrille peilien avulla. Valonjohdin jakaa fluoresenssivalon kuudelle kanavalle aallonpituuden mukaan 530 nm, 555 nm, 610 nm, 640 nm, 670 nm ja 705 nm. Fotohybridien (kuva 3) signaalit lähetetään LightCyclerille sarjaliitintää pitkin, josta piirtyy tuloskäyrät. (Roche Diagnostics 2005, 38.)



KUVA 3. LightCycler[®] 2.0 -laitteen fotometrinen yksikkö (Roche Diagnostics 2005, 38, muokattu)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

Työmme tavoitteena on tuottaa tuloksia osana *mecC*-PCR -menetelmän validointia. Tietojen pohjalta Fimlab Laboratoriot Oy pystyy jatkamaan kehitystyötä, jotta laboratorio saa toimivan diagnostisen menetelmän *mecC* MRSA -kannan osoittamiseen.

Tarkoituksena on opinnäytetyössä selvittää *mecC*-PCR -menetelmän sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä. Kokeellisessa osuudessa selvitämme, mikä on pienin bakteerin DNA-määrä mitä menetelmä monistaa sensitiivisesti. Lähtölaimennoksena on 0.5 McFarlandia, josta teemme 1:10 lisälaimennoksia. Menetelmän spesifisyyttä tutkimme 17 tunnetulla bakteerikannalla. Menetelmän tulisi monistaa vain *mecC*-kannan DNA-sekvenssiä. Bakteerikannat ovat joko kantakokoelman kontrollikantoja (ATCC-kantoja) tai potilasnäytteistä eristettyjä tunnettuja kantoja. Tutkimusta varten otetaan mukaan metisilliinille herkkä *S. aureus* (MSSA-kanta), metisilliinille resistentti *S. aureus* (MRSA-kantoja, joilla on joko *mecA*- tai *mecC*-geeni) sekä joitakin muita bakteerilajeja.

Tutkimuskysymykset ovat

1. Miten spesifisesti *mecC*-PCR -menetelmä tunnistaa *mecC*-kannan muiden bakteerikantojen joukosta?
2. Miten menetelmän sensitiivisyys vaihtelee *mecC*-kannan bakteerien DNA:n määrään suhteutettuna?

5 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Työmme on kokeellinen tutkimus. Kokeelliselle tutkimukselle tyypillistä on tutkia ilmiössä vaikuttavien muuttujien syy-seuraus-suhdetta, jolloin koetellaan yhtä tai useampaa koeryhmää yhdessä tai useammassa koetilanteessa ja verrataan tuloksia yhteen tai useampaan kontrolliryhmän tuloksiin, jotka eivät ole olleet koetilanteessa. Tyypillisessä koetilanteessa tarkastellaan yhden muuttujan vaikutusta pitäen muut muuttujat vakiona seuraten vaikutusta tuloksiin. (Virtuaaliammattikorkeakoulu 2007.)

Tarkoituksena kokeellisessa tutkimuksessa on tutkia mittaustulosten varianssia ja varianssiin vaikuttavia tekijöitä. Kokeellisen tutkimuksen yhteydessä laaditaan koesuunnitelma. Suunnitelmassa huomioidaan kaikki ei-kokeelliset muuttujat, joille suunnitellaan niiden kontrollimenettely. Suunnitelma laaditaan, jotta saadaan sellainen otos, joka edustaa tarkoitettua populaatioita sekä määritellään koetoimenpiteet. Huomiota on kiinnitettävä myös mittausvälineiden validiteettiin, jolloin valitaan oikeat mittavälineet sekä kalibroidaan ne. Tarvittaessa voidaan suorittaa esitutkimus, jossa testataan tutkimussuunnitelmaa ja/tai mittavälineiden luotettavuutta. (Virtuaaliammattikorkeakoulu 2007.) Työssämme muuttujina ovat eri bakteerikannat ja PCR-ohjelmat.

Validiteettia mitataan spesifisyyden ja sensitiivisyyden avulla, jotka voidaan laskea käyttämällä nelikenttätaulukkoa (taulukko 1). A-soluun tulevat ne, jotka menetelmä on oikein diagnosoinut sairaudeksi eli oikeat positiiviset. B-soluun tulevat ne, jotka menetelmä on antanut positiiviseksi, vaikka sairautta ei ole eli väärät positiiviset. C-soluun tulevat ne joilla on sairaus, mutta menetelmä antaa negatiivisen vastauksen eli väärät negatiiviset. D-soluun tulevat puolestaan ne, jotka menetelmä vastaa negatiiviseksi ja joilla ei ole sairautta eli oikeat negatiiviset. (Parikh ym. 2008, 45–50.)

TAULUKKO 1. Spesifisyyden ja sensitiivisyyden määrittämisessä käytettävä taulukko (Parikh ym. 2008, muokattu)

	Sairaat/oikea positiivinen	Terveet/oikeat negatiiviset
Positiivinen	a	b
Negatiivinen	c	d

Sensitiivisyys kuvaa menetelmän herkkyyttä luokitella oikein henkilö sairaaksi, kun sairaus on henkilöllä olemassa. Sensitiivisyys ilmoitetaan prosenttilukuna ja se lasketaan siten, että oikeiden positiivisten lukumäärä jaetaan oikeiden positiivisten ja väärin negatiivisten tulosten lukumäärien summalla. Sensitiivisyys kuvaakin todennäköisyyttä, jolla menetelmä antaa positiivisen tuloksen, kun sairaus on olemassa. (Parikh ym. 2008, 45–50.)

Spesifisyys puolestaan kuvaa menetelmän kykyä luokitella oikein henkilö terveeksi ja se ilmoitetaan myös prosenttilukuna. Spesifisyys lasketaan jakamalla oikeiden negatiivisten lukumäärä oikeiden negatiivisten ja väärin positiivisten lukumäärien summalla. Spesifisyys kuvaa todennäköisyyttä, jolla menetelmä antaa negatiivisen tuloksen sairauden puuttuessa. Sensitiivisyys ja spesifisyys ovat käänteisesti verrannollisia toisiinsa eli sensitiivisyyden kasvaessa spesifisyys laskee ja toisin päin. (Parikh ym. 2008, 45–50.)

Kun halutaan tietää kuinka uusi testi toimii, käytetään sen arvioimisessa ennustearvoja. Positiivinen ennustearvo kertoo sen prosenttiosuuden potilaista joille testi antaa positiivisen tuloksen ja heillä on kyseinen sairaus eli millä todennäköisyydellä menetelmällä saatu positiivinen tulos merkitsee sairautta. Positiivinen ennustearvo saadaan laskennallisesti siten, että oikeiden positiivisten lukumäärä jaetaan oikeiden positiivisten ja väärin positiivisten lukumäärien summalla. (Parikh ym. 2008, 45–50.)

Negatiivisen ennustearvon avulla saadaan prosenttiosuus potilaista jotka saavat testistä negatiivisen tuloksen eikä heillä ole sairautta. Negatiivinen ennustearvo kuvaakin todennäköisyys jolla negatiivinen tulos poissulkee kyseisen sairauden. Negatiivinen ennustearvo lasketaan jakamalla oikeiden negatiivisten lukumäärä oikeiden negatiivisten ja väärin negatiivisten lukumäärien summalla. (Parikh ym. 2008, 45–50.)

6 KOKEELLISEN OSUUDEN TOTEUTUS

6.1 Opinnäytetyöprosessi

Opinnäytetyön aihe saatiin syksyllä 2014 Fimlab Laboratoriot Oy:n sairaalamikrobiologi Jari Hirvoselta. Opinnäytetyösuunnitelma laadittiin loka-marraskuussa 2014 ja suunnitelma sekä lupa hyväksyttiin 28.11.2014. Opinnäytetyön lähdemateriaalin kerääminen ja teoriaosuuden kirjoittaminen alkoi lokakuulla 2014 ja jatkui syyskuulle 2015 asti.

Kokeellisen osuuden suunnittelu aloitettiin marraskuussa 2014 tapaamisella sairaalamikrobiologi Jari Hirvosen kanssa. Tapaamisessa kartoitimme tilaajan suunnitelmia opinnäytetyöstä, saimme lähdemateriaalia aiheeseen perehtymistä varten sekä sovimme käytännönjärjestelyistä kokeellista osuutta varten. Kävimme tutustumassa joulukuussa Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian/molekyylibiologian laboratorion tiloihin ja tarvikkeisiin, joita käytimme kokeellisessa osuudessamme ja sovimme tarkemmin päivien aikatauluista laboratorion kanssa. Sairaalamikrobiologi Hirvonen suunnitteli työtämme varten *mecC*-PCR DNA -ohjeen ja *mecC*-PCR -laimennossarjasuunnitelman. Kokeellisen osuuden suoritimme 15.–19.12.2014.

6.2 DNA:n eristys

Kokeellinen osuus aloitettiin eristämällä bakteerien DNA:ta kantakokoelmakontrollikannoista (ATCC-kantoja), joita käytettiin *mecC* MRSA:n spesifisyyden tutkinnassa. Eppendorf-putkeen laitettiin 150 µl *Staphylococcus* Lysis Buffer -liuosta. Poimittiin elatusainealustalta viisi isohkoa pesäkettä ja siirrostettiin ne liuokseen. Näytesuspensiota sekoitettiin Vortex-laitteella ja kuumennettiin ne 10 minuuttia +95 °C:ssa. Lämpö ja *Staphylococcus* Lysis Buffer -liuos hajotti bakteerien rakennetta ja DNA vapautui ympäröivään liuokseen. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin pöytäsentrifugilla 5 minuuttia 13 000 rpm, jotta solun muut osat, lukuun ottamatta solun DNA:ta, painuvat pelletiksi putken pohjalle. DNA:ta sisältävää supernatanttia pipetoitiin 80 µl puhtaaseen Eppendorf-putkeen. Eristykset tehtiin 17 bakteerista, näytteet numeroitiin, listattiin (taulukko 2) ja laitettiin säilytykseen jääkaappiin (4 °C). Negatiivisena eristyskontrollina käytettiin 50 µl *Staphylococcus* Lysis Bufferia.

TAULUKKO 2. Kokeellisessa osuudessa käytetyt bakteerit

1.	<i>mecC</i> MRSA	10.	<i>Enterococcus faecium</i>
2.	<i>mecA</i> MRSA	11.	<i>Proteus mirabilis</i>
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	12.	<i>Streptococcus agalactiae</i>
4.	<i>Escherichia coli</i>	13.	<i>Micrococcus luteus</i>
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15.	<i>Bacillus cereus</i>
7.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	16.	<i>Candida albicans</i>
8.	<i>Enterococcus faecalis</i>	17.	ESBL (extended spectrum beta-lactamases)
9.	<i>Streptococcus salivarius</i>	(18.	Negatiivinen eristyskontrolli)

Seuraavaksi eristettiin laimennossarjaa varten *mecC* MRSA:n bakteerikasvustoa elatusalustalta 1 ml fysiologiseen keittosuolaliuokseen siten, että liuoksesta tuli silmämääräisesti 0.5 McFarlandin vahvuista. Tällöin lähtösuspensio (1.) oli $1,5 \times 10^8$ pmy/ml. Pesäkkeen muodostama yksikkö, eli pmy, tarkoittaa yhdestä solusta, soluryhmästä tai itiöstä jakautumalla muodostunutta solujen erillistä ryhmittymää kiinteällä alustalla (Tieteen termipankki 2015). Lähtösuspensiota jatkolaimennettiin laimennosohjeen (liite 1) mukaisesti. Määrityksessä käytettävien lopullisten suspensioiden vahvuudet olivat suspensio A $1,5 \times 10^3$ pmy/ml, suspensio B $7,5 \times 10^3$ pmy/ml, suspensio C $1,5 \times 10^4$ pmy/ml ja suspensio D $7,5 \times 10^4$ pmy/ml. Lisäksi kolmannelta ja neljännestä laimennoksesta tehtiin viljelyt 10 µl:n viljelysilvillä verimaljoille laimennosten bakteerimäärän tarkistamiseksi.

6.3 Ajojen valmistelu

Ajoja varten tehtiin reaktioseoksen LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I -ohjeen mukaisesti. Reaktioseokseen tuli 9 µl PCR-vettä, 4 µl Master Mix 5x conc. -liuosta, 1 µl molempia alukkeita (*mecLGA251FP* 10 µM ja *mecLGA251RP* 10 µM) sekä 5 µl näytettä. Reaktioseoksen lopputilavuudeksi tuli näin 20 µl. Käyttöseokset tehtiin erikseen jokaista ajoa varten kertomalla reaktioseokseen tulevien liuosten määrät näytteiden määrällä. Master Mix 5x conc. -liuoksessa oli lisättyä tarvittava entsyymiin. Lasiset LightCycler® -kapillaarit (kuva 4), joiden tilavuus on 20 µl, asetettiin näyttekaruselliin. Kapillaareihin pipetoitiin käyttöseosta 15 µl ja näytettä 5 µl. Negatiiviseen

kontrolliin käytettiin PCR-vettä 5 µl. Kapillaarit korkitettiin sitä mukaan, kun näyte pipetoitiin kapillaariin.



KUVA 4. LightCycler[®] -kapillaari (Kuva: Hanna-Kaisa Vinkanharju 2015)

Näytteet sentrifugoitiin LC Carousel Centrifuge 2.0 -laitteella, joka on suunniteltu LightCycler[®] näytekarusellille. Näyte sentrifugoitiin kapillaarin alaosaan, josta fotometri pystyy lukemaan näytteen. Sentrifugoinnin aikana käynnistettiin LightCycler[®] 2.0 Instrument -analysointilaitteen ja tietokonekäyttöjärjestelmän, LightCycler[®] Software. Analysointilaitteella suoritettiin ensin toimintatarkistuksia, jonka jälkeen valittiin PCR-ohjelma (taulukko 3) ja näytekaruselli asetettiin laitteeseen. Ajoista kirjattiin järjestelmään ja ajo käynnistettiin. Ajoja tehtiin seitsemän, joissa kaikissa toimittiin samalla tavalla.

6.4 Ajot

Ensimmäisessä ja toisessa ajossa näytteinä olivat bakteerit (liite 2; taulukko 8 ja 9) luokan ottamatta *mecA* MRSA:ta, sillä lasikapillaari hajosi pipetoitaessa näytettä. Näissä ajoissa käytettiin PCR-ohjelmaa 1. (taulukko 3). Ohjelman 1. ja 2. kohdissa tapahtuu denaturaatio, kohta 3. on kiinnittymisvaihe ja kohta 4. ekstensiovaihe. Ensimmäisissä ajoissa oli 30 sykliä. Kaikissa ajoissa käytettiin aina positiivisena kontrollina *mecC* MRSA:ta, sekä negatiivisena kontrollina PCR-vettä. Staphylococcus Lysis Bufferia ajettiin liuoksen puhtauden tarkistamiseksi. Lisäksi jokainen PCR-ajo sisältää positiivi-

sen ja negatiivisen kontrollin, jolloin voidaan tarkkailla mittavälineiden luotettavuutta, työskentelytapoja sekä laitteen toimivuutta.

TAULUKKO 3. PCR-ohjelmat LightCycler® 2.0

PCR-ohjelma 1.	PCR-ohjelma 2.	PCR-ohjelma 3.
1. 95 °C, 10 minuuttia	1. 95 °C, 10 minuuttia	1. 95 °C, 10 minuuttia
2. 95 °C, 10 sekuntia	2. 95 °C, 10 sekuntia	2. 95 °C, 10 sekuntia
3. 58 °C, 10 sekuntia	3. 58 °C, 5 sekuntia	3. 58 °C, 4 sekuntia
4. 72 °C, 60 sekuntia	4. 72 °C, 55 sekuntia	4. 72 °C, 46 sekuntia
5. kohdat 2-4 → 30 sykliä	5. kohdat 2-4 → 30 sykliä	5. kohdat 2-4 → 40 sykliä
6. 95 °C (sidossavaus)	6. 95 °C (sidossavaus)	6. 95 °C (sidossavaus)
7. 65 °C, 1 minuutti	7. 65 °C, 1 minuutti	7. 65 °C, 1 minuutti
8. 95 °C (sulatus), 0.1 °C/s	8. 95 °C (sulatus), 0.1 °C/s	8. 95 °C (sulatus), 0.1 °C/s
9. 40 °C, 30 sekuntia	9. 40 °C, 30 sekuntia	9. 40 °C, 30 sekuntia
AJOT: 1-2	AJOT: 3-6	AJOT: 7

Ajossa kolme (liite 2; taulukko 10) ajettiin uudelleen ne näytteet, josta saatiin ensimmäisestä ja toisesta ajosta positiivisen tai epävarman tuloksen. Myös tähän ajoon yritettiin saada *mecA* MRSA:n, mutta lasikapillaari rikkoutui näytekarusellia poistettaessa sentrifuugista, joten sitä ei saatu kolmanteen ajoon. PCR-ohjelma 1:stä muokattiin lyhentämällä kiinnittymisvaihetta 10 sekunnista 5 sekuntiin ja ekstensiovaihetta 60 sekunnista 55 sekuntiin (PCR-ohjelma 2.; taulukko 3). Näillä muutoksilla yritettiin vähentää epäspesifistä monistumista. Työssä ei käsitellä neljättä ajoa laimennossarjan suunnittelussa tapahtuneen laskuvirheen vuoksi.

Viidennessä ajossa (liite 2; taulukko 11) käsiteltiin kahta potilasnäytettä, jotka olivat mahdollisia *mecC* MRSA positiivisia. Tähän ajoon saatiin myös *mecA* MRSA:n. *Staphylococcus* Lysis Bufferi kontrolloitiin uudelleen. Kuudennessa ajossa (liite 2; taulukko 12) ajettiin laimennokset, jossa selvitettiin PCR-ohjelman herkkyyttä. Näissä ajoissa käytettiin PCR-ohjelmaa 2. (taulukko 3).

Seitsemännessä ajossa (liite 2; taulukko 13) ajettiin uudelleen epävarmat tulokset ajoista kolme ja viisi. PCR-ohjelma 1. muutettiin lyhentämällä kiinnittymisvaihetta 4 sekuntiin

ja ekstensiovaihetta 46 sekuntiin sekä syklejä lisättiin kolmestakymmenestä neljäänkymmeneen (PCR-ohjelma 3.; taulukko 3). Aikojen lyhentäminen vähentää edelleen epäspesifistä monistumista ja syklien suuremmalla määrällä monistustuotetta tulee enemmän, jolloin positiivinen signaali vahvistuu.

7 TULOKSET

7.1 Menetelmän spesifisyys

Ensimmäisen ajon näytteistä saimme kaksi positiivista ja kaksi epävarmaa tulosta muiden ollessa negatiivisia (liite 3; kuva 5). Positiivisina näytteinä oli positiivinen kontrolli (*mecC* MRSA) ja *Proteus mirabilis*. Epävarmoina tuloksina oli *Escherichia coli* ja *Enterococcus faecium*. Kuvan 5 (liite 3) sykli, fluoresenssi -kuvaajasta näemme, että positiivinen kontrolli on lähtenyt monistumaan 13. syklin jälkeen ja fluoresenssin määrä kasvaa jyrkästi. *Proteus mirabilis* -näytteessä alkaa muodostumaan monistustuotetta 26. syklin jälkeen ja fluoresenssin määrä nousee riittävän jyrkästi, jolloin analysaattori antaa positiivisen tuloksen. Epävarmat tulokset johtuvat monistustuotteen myöhäisestä syntymisestä 27. syklin jälkeen. Monistustuotteen määrä on niin vähäinen, että analysaattori ei pysty varmuudella tulkitsemaan tuloksia positiivisiksi. Muut näytteet ovat negatiivisia, koska monistustuotetta ei syntynyt. Kuvasta 6 (liite 3) näemme sulamiskäyrä-kuvaajasta, että positiivinen kontrollin arvo nousee ja huippu sijoittuu *mecC* MRSA:lle ominaiselle alueelle 76–77 °C. *Proteus mirabiliksen* sulamiskäyrän huippu sijoittuu 74,80 °C. *P. mirabiliksesta* tiedetään, että sillä ei pitäisi olla *mecC*-geeniä. Lisäksi positiivisena kontrollina käytetty *mecC* MRSA antaa tietynlaisen sulamiskäyrän. Näiden perusteella voimme olettaa, että *Proteus mirabiliksen* monistuminen on epäspesifistä. Staphylococcus Lysis Buffer -liuos oli negatiivinen, jolloin kontaminaatiota ei ole tapahtunut ja liuos on käyttökelpoinen

Toisessa ajossa kontrollit olivat halutunlaisia eli *mecC* MRSA:ta sisältävä näyte oli positiivinen ja PCR-vettä sisältänyt näyte oli negatiivinen. Positiivisen tuloksen antoivat *Streptococcus agalactiae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* ja ESBL. Negatiivisia tuloksia olivat *Staphylococcus epidermidis* ja *Candida albicans*. Sykli, fluoresenssi -kuvaajasta (liite 3, kuva 7) nähdään, että positiivinen kontrolli lähtee monistumaan 11. syklin jälkeen. *Micrococcus luteus* -näytteessä fluoresenssia on havaittavissa, mutta sen määrä pysyy matalana koko ajon ajan. *Streptococcus agalactiae* ja ESBL -näytteissä alkaa syntyä monistustuotetta syklin 25. jälkeen. *Bacillus cereus* -näytteessä fluoresenssin määrä alkaa nousta hieman 28. syklin jälkeen. Sulamiskäyrästä (liite 3, kuva 8) nähdään, että ainut oikea positiivinen on positiivinen kontrolli, jonka huippu on 76,20 °C.

Muiden näytteiden sulamiskäyrien huiput sijoittuvat noin 75 °C. ESBL -näytteellä on kaksi huippua, jotka sijoittuvat 72,28 °C ja 83,05 °C.

Ensimmäisessä ja toisessa ajossa näytteitä oli yhteensä 20 kappaletta, joista epävarmoja tuloksia oli kaksi. Epävarmat tulokset käsittelemme väärinä positiivisina. Ajot sisälsivät kaksi oikeaa positiivista näytettä (positiiviset kontrollit) ja 18 oikeaa negatiivista näytettä (taulukko 4). Menetelmä tunnisti kaksi positiivista ja 11 negatiivista näytettä. Lisäksi väärää positiivisia tuloksia saatiin seitsemän kappaletta. Laskimme PCR-ohjelma 1:llä saatujen tulosten perusteella spesifisyyden, negatiivisen ja positiivisen ennustearvon (kuvio 1). Spesifisyys on 61,1 %, negatiivinen ennustearvo on 100 % ja positiivinen ennustearvo on 22,2 %.

TAULUKKO 4. PCR-ohjelma 1:llä saadut tulokset

	OIKEA POSITIIVINEN	OIKEA NEGATIIVINEN
POSITIIVINEN	2	7
NEGATIIVINEN	0	11

Spesifisyys: $11/(11+7) \times 100 \% = 61,1 \%$

Negatiivinen ennustearvo: $11/(11+0) \times 100 \% = 100 \%$

Positiivinen ennustearvo: $2/(2+7) \times 100 \% = 22,2 \%$

KUVIO 1. PCR-ohjelma 1:en spesifisyys, negatiivinen ja positiivinen ennustearvo

Kolmannessa ajossa poikkeava löydös on *Micrococcus luteus*, jonka tulos on epävarma. Sykli, fluoresenssi –kuvaajasta (liite 3, kuva 9) ilmenee, että fluoresenssin määrä alkaa nousta jälleen, mutta vasta 26. syklin jälkeen. Ensimmäisestä ja toisesta ajosta saadut positiiviset tulokset ovat kolmannessa ajossa negatiiviset. Tähän ovat vaikuttaneet kiinnittymis- ja ekstensiovaiheiden aikojen lyhentäminen. Aikojen lyhentyessä alukkeiden epäspesifinen kiinnittyminen vähenee ja monistamisessa tapahtuvien virheiden määrä vähenee, jolloin virheellistä positiivista fluoresenssisignaalia ei synny.

Viidennessä ajossa saatiin epävarma tulos potilasnäytteestä 2 (B64110). Sykli, fluoresenssi -kuvaajassa (liite 3, kuva 10) potilasnäyte 2 käyrä alkaa nousta syklin 28 jälkeen. Sulamiskäyrän huippu (liite3, kuva 11) kyseisellä näytteellä on 76,13 °C, joka on *mecC* MRSA:lle tyypillisellä lämpötila-alueella. Analysaattori on tulkinut potilasnäyte 2

epävarmaksi sille asetettujen raja-arvojen perusteella. Monistustuotteen vähyys kuitenkin todistaa, että näyte on negatiivinen. Kontrollit olivat odotetunlaisia ja *Staphylococcus Lysis Buffer* -liuos oli edelleen negatiivinen.

Kolmannessa ja viidennessä ajossa oli yhteensä 15 näytettä, joista positiivisia oli kaksi näytettä ja negatiivisia 13 näytettä. Menetelmä tunnisti positiiviseksi neljä näytettä, joista kaksi on vääriä positiivisia. Negatiiviseksi menetelmä tunnisti 11 näytettä (taulukko 5). PCR-ohjelma 2:lla saatujen tulosten perusteella spesifisyys on 84,6 %, negatiivinen ennustearvo on 100 % ja positiivinen ennustearvo on 50 % (kuvio 2).

TAULUKKO 5. PCR-ohjelma 2:lla saadut tulokset

	OIKEA POSITIIVINEN	OIKEA NEGATIIVINEN
POSITIIVINEN	2	2
NEGATIIVINEN	0	11

$$\text{Spesifisyys} = 11 / (11 + 2) \times 100 \% = 84,6 \%$$

$$\text{Negatiivinen ennustearvo} = 11 / (11 + 0) \times 100 \% = 100 \%$$

$$\text{Positiivinen ennustearvo} = 2 / (2 + 2) \times 100 \% = 50 \%$$

KUVIO 2. PCR-ohjelma 2:en spesifisyys, negatiivinen ja positiivinen ennustearvo

Seitsemänteen ajoon muokkasimme PCR-ohjelmaa siten, että syklien määrää lisättiin 40 sykliin, kiinnittymisvaihetta lyhensimme neljään sekuntiin ja ekstensiovaihetta lyhennettiin 46 sekuntiin. Kontrollit olivat hyväksyttäviä. Potilasnäyte 2 ja *Micrococcus luteus* olivat positiivisia. Kuvaajasta (liite 3, kuva 12) nähdään, että potilasnäyte 2:n käyrä alkaa nousta 30. syklin jälkeen ja *Micrococcus luteus* -näytteen käyrä alkaa nousta syklin 34 jälkeen. Aikojen lyhentäminen on vähentänyt epäspesifistä monistumista, mutta syklien lisääminen lisäsi sitä. Mikäli syklien määrä olisi pidetty 30, potilasnäyte 2 ja *Micrococcus luteus* -näyte olisivat olleet negatiiviset. PCR-ohjelmaan tehdyt muutokset eivät vaikuttaneet *mecC* MRSA -näytteen monistumiseen, sillä sen käyrä lähtee 13. syklin jälkeen nousuun kuten ensimmäisessä ajossa. Sulamiskäyrästä (liite 3, kuva 13) nähdään, että *mecC* MRSA -käyrän huippu on 76,35 °C, joka sijoittuu *mecC* MRSA:lle ominaiselle lämpötila-alueelle. Potilasnäyte 2 huippu sijoittuu 74,90 °C ja *Micrococcus*

luteus -näytteen sulamiskäyrän huippu on 75,71 °C, jolloin tulokset ovat väärää positiivisia.

Seitsemännessä ajossa oli mukana neljä näytettä, joista positiivisia oli yksi ja negatiivisia oli kolme. Menetelmä tunnisti väärää positiivisia kaksi, yhden oikean positiivisen sekä yhden oikean negatiivisen (taulukko 6). PCR-ohjelma 3:lla saatujen tulosten perusteella spesifisyys on 33,3 %, negatiivinen ennustearvo on 100 % ja positiivinen ennustearvo on 33,3 % (kuvio 3).

TAULUKKO 6. PCR-ohjelma 3:lla saadut tulokset

	OIKEA POSITIIVINEN	OIKEA NEGATIIVINEN
POSITIIVINEN	1	2
NEGATIIVINEN	0	1

Spesifisyys: $1/(1+2) \times 100 \% = 33,3 \%$

Negatiivinen ennustearvo = $1/(1+0) \times 100 \% = 100 \%$

Positiivinen ennustearvo = $1/(1+2) \times 100 \% = 33,3 \%$

KUVIO 3. PCR-ohjelma 3:en spesifisyys, negatiivinen ja positiivinen ennustearvo

7.2 Menetelmän sensitiivisyys

Kuudennessa ajossa määritimme menetelmän sensitiivisyyttä laimennossarjan avulla käyttäen PCR-ohjelmaa 2. Ainoan positiivisen tuloksen antoi näyte D, joka sisälsi bakteeria 375 pmy/reaktio. Sykli, fluoresenssi -kuvaajassa (liite 3, kuva 14) näyte D:n käyrä lähtee jyrkkään nousuun syklin 24 jälkeen ja syklin 30 kohdalla fluoresenssin määrä on 0,325. Negatiivisen kontrollin lisäksi negatiivisen tuloksen antoivat näytteet C (75 pmy/reaktio), B (37,5 pmy/reaktio) ja A (7,5 pmy/reaktio). Sykli, fluoresenssi -kuvaajasta (liite 3, kuva 16) nähdään, että näytteiden C, B ja A fluoresenssien määrät ovat nousseet 30. sykliin mennessä bakteerien määrään suhteutettuna loogisesti. Näytteen C fluoresenssi määrä on 0,060, näytteen B fluoresenssi määrä on -0,020 ja näytteen A fluoresenssi määrä on -0,035.

Tarkistimme *mecC* MRSA -viljelmät, joita kasvatettiin lämpökaapissa yön yli. Laskimme molemmista silmämääräisesti pesäkkeiden lukumäärät. Laimennoksesta 3. tehdystä viljelystä saimme tulokseksi 250 kappaletta, joka vastaa laskennallisesti saatua bakteerimäärää, joka on 150 pmy. Laimennoksesta 4. tehdystä viljelystä saimme tulokseksi 1100 pesäkettä, joka vastaa laskennallisesti arvioitua määrää 1500 pmy. Tulokset ovat saman suuntaisia ja hyväksyttäviä, sillä ensimmäinen laimennos on tehty silmämääräisesti 0.5 McFarlandin vahvuiseksi, eikä sitä ole mitattu millään muulla tavoin.

Sensitiivisyysmäärittelyn perusteella voimme todeta, että analyysimenetelmä tunnistaa *mecC* MRSA:n positiiviseksi reaktioseoksen sisältäessä bakteeria 375 pmy, tällöin alkuperäisessä näytteessä tulee olla bakteeria $7,5 \times 10^4$ pmy/ml. Reaktioseoksen sisältäessä *mecC* MRSA:ta 75 pmy tai vähemmän tulos on negatiivinen, jolloin menetelmän sensitiivisyys ei ole riittävä tunnistamaan *mecC* MRSA:ta positiiviseksi. Laskennallisesti (taulukko 7; kuvio 4) PCR-ohjelma 2:n sensitiivisyys on 25 %.

TAULUKKO 7. Ajo 6. herkkyysmäärittely

	OIKEA POSITIIVINEN	OIKEA NEGATIIVINEN
POSITIIVINEN	1	0
NEGATIIVINEN	3	1

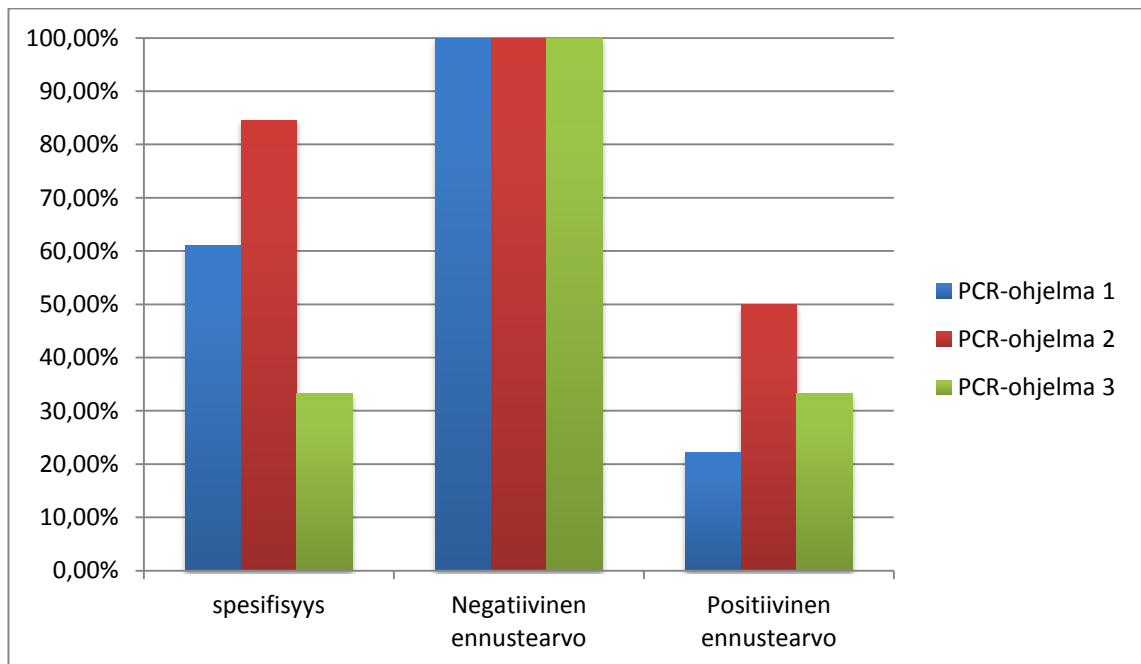
Sensitiivisyys: $1/(1+3) \times 100 \% = 25 \%$

KUVIO 4. Herkkyysmäärittelyn sensitiivisyys

7.3 Tulosten yhteenveto

Saatuja tuloksia vertaillen (kuvio 5) parhaan spesifisyyden antaa PCR-ohjelma 2, jonka spesifisyys on 84,6 %. Sen spesifisyys on 23,5 prosenttiyksikköä parempi kuin PCR-ohjelma 1:sen (61,1 %) ja 51,3 prosenttiyksikköä parempi verrattuna PCR-ohjelma 3:seen (33,3 %). Negatiivinen ennustearvo oli kaikissa PCR-ohjelmissa 100 % eli tämän menetelmän todennäköisyys, että negatiivinen tulos poissulkee *mecC* MRSA:n olemassaolon on erinomainen tulostemme perusteella. Parhaan positiivisen ennustearvon antaa PCR-ohjelma 2 arvolla 50 %. Verrattuna PCR-ohjelma 1:seen (22,2 %) ja PCR-ohjelma 3:seen (33,3 %), PCR-ohjelma 2:sen positiivinen ennustearvo on 27,8 prosenttiyksikköä

parempi ensin mainittuun ja 16,7 prosenttiyksikköä jälkimmäiseen verrattuna. Näiden vertailujen perusteella PCR-ohjelma 2 on paras näistä ajo-ohjelmista eli kiinnittymis- ja ekstensiovaiheiden aikojen lyhentäminen oli tehokas tapa lisätä spesifisyyttä ja parantaa positiivista ennustearvoa. Puolestaan syklien määrän pitäminen 30 syklissä oli sopiva, sillä syklimäärän nostaminen 40 sykliin vähensi spesifisyyttä. Sensitiivisyysmäärityksen perusteella analyysimenetelmä antaa positiivisen tuloksen reaktioseoksen sisältäessä bakteeria 375 pmy:tä. Reaktioseoksen sisältäessä 75 pmy:tä *mecC* MRSA:ta, tulos on negatiivinen.



KUVIO 5. Tulosten yhteenveto

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää *mecC*-PCR-menetelmän spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä. Tavoitteenamme oli tuottaa tuloksia osana *mecC*-PCR -menetelmän validointia. Menetelmän spesifisyyttä selvitimme 17 eri bakteerikannan avulla ja muuntelemalla PCR-ohjelman ominaisuuksia esimerkiksi lisäämällä syklien määrää.

Testasimme yhteensä kolmea erilaista PCR-ohjelmaa, joissa syklien määrät sekä kiinnittymis- ja ekstensiovaiheiden ajat vaihtelivat. Paras PCR-ohjelma näistä kolmesta oli PCR-ohjelma 2. Tämän ohjelman spesifisyydeksi saatiin 84,6 %, negatiiviseksi ennustearvoksi 100 % ja positiiviseksi ennustearvoksi 50 %. Näiden perusteella kyseinen PCR-ohjelma antaa 84,6 % todennäköisyydellä negatiivisen tuloksen *mecC*-geenin puuttuessa näytteestä. Negatiivinen tulos saadaan 100 % todennäköisyydellä näytteen ollessa oikea negatiivinen ja positiivinen tulos saadaan 50 % todennäköisyydellä näytteen ollessa oikea positiivinen.

Menetelmän sensitiivisyyttä määritimme laimennossarjan avulla, jossa lopullisten näyteliuosten bakteerivahvuudet olivat $1,5 \times 10^3$ pmy/ml, $7,5 \times 10^3$ pmy/ml, $1,5 \times 10^4$ pmy/ml ja $7,5 \times 10^4$ pmy/ml. Tässä ajossa käytimme PCR-ohjelma 2:sta. Tuloksena saimme, että reaktioseoksen tulee sisältää ainakin 375 pmy:ä bakteeria, jotta menetelmä tunnistaa sen positiiviseksi eli alkuperäisen näytesuspensiossa tulee olla bakteeria $7,5 \times 10^4$ pmy/ml. Reaktioseoksen sisältäessä bakteeria 75 pmy tai vähemmän tulos on negatiivinen.

Työssä huomasimme, että syklien määrää lisättäessä lisääntyi epäspesifisen monistustuotteen määrä. Tämä epäspesifinen monistustuote johtuu siitä, kun käytetyt alukkeet eivät sitoudu aivan spesifisti oikeaan kohtaan DNA-juostetta. Toisaalta tätä epäspesifin tuotteen määrää pystyttiin vähentämään lyhentämällä kiinnittymisaikaa ja ekstensioaikaa. Lyhyemmässä sitoutumisajassa alukkeet pariutuvat ensisijaisesti oikealle DNA-alueelle, eikä aikaa epäspesifille sitoutumiselle jää. Ekstensioajan lyhentyessä myös epäspesifin monistustuotteen rakentumiselle ei jää aikaa. Näiden tietojen perusteella voisimme päätellä, että PCR-ohjelma 3 olisi ollut spesifisin, mikäli syklien määrää ei olisi nostettu kolmestakymmenestä neljäänkymmeneen.

Tulosten luotettavuuden kannalta käytimme jokaisessa ajossa negatiivista ja positiivista kontrollia, jotta voitiin varmistua välineiden ja liuosten puhtaudesta, laitteen toiminnasta sekä työtapojen samanlaisina pysymisestä ja aseptisuudesta. Lisäksi ajoimme erikseen kaksi kertaa *Staphylococcus Lysis Bufferin*, jotta varmistuimme sen puhtaudesta. Teimme ensimmäisenä kaikista tutkittavista bakteerikannoista samalla kertaa eristykset, jolloin toimimme samalla tavalla kaikkien kantojen kohdalla. DNA-eristystä tehtäessä bakteerimäärien arvioiminen oli vaikeaa, sillä eri bakteereilla pesäkkeiden koot vaihtelivat, mutta päätimme ottaa jokaisesta 5 suurehkoa pesäkettä.

Työn eri vaiheissa pyrimme toimimaan järjestelmällisesti ja kirjasimme ylös kaikki tapahtumat ja poikkeamat, jotta ne voitiin huomioida tuloksia arvioidessa. Esimerkiksi neljännessä ajossa oli tarkoituksena määrittää menetelmän herkkyyttä, mutta laskuvirheen takia todelliset bakteerimäärät olivat hyvin pienet, eikä tämän takia ollut mielekäs käsitellä tämän ajon tuloksia sen enempää. Koska jokaisessa ajossa analysoitavien bakteerinäytteiden määrät ja kannat vaihtelivat, ei tuloksia voida suoraan vertailla toisiinsa. Tämä olisi pitänyt huomioida siten, että jokaisessa ajossa olisi ajettu samat bakteerinäytteet, jolloin muuttaessa PCR-ohjelman ominaisuuksia, muutokset tuloksissa jokaisen bakteerin kohdalla olisi voitu tarkkailla. Tätä kautta olisi saatu myös vertailukelpoisemmat prosenttiosuudet, sillä näytteitä olisi ollut aina yhteensä 18 kappaletta.

Opinnäytetyön aihe oli mielenkiintoinen, sillä *mecC* MRSA on vasta löydetty MRSA:n varianttikanta ja meille opinnäytetyön tekijöille ennestään tuntematon. Haasteeksi muodostuikin luotettavan tiedon löytäminen *mecC* MRSA:han liittyen. Työn luotettavuutta kuitenkin lisää se, että olimme asiakokonaisuuksia kirjoittaessamme kriittisiä lähteiden suhteen sekä pyrimme käyttämään useita lähteitä kokonaisuuksia kirjoittaessamme. Tavoitteenamme oli myös käyttää mahdollisimman uusia lähteitä. Vanhimpia lähteitä käytimme niiltä osin, miltä tieto ei ollut vanhentunutta. Prosessin aikana opimme etsimään ja hyödyntämään englanninkielisiä lähteitä, koska suomen kielellä löytyy vähemmän uutta ja ajantasaista tietoa sisältävää materiaalia mikrobiologian ja molekyylibiologian aihealueilta. Kaikki lähteet on merkitty tarkasti, kuviin on merkitty lähteet ja se jos niitä on muokattu. Työssämme pyrimme huomioimaan myös eettiset periaatteet työskennellessämme laboratoriossa, jossa käsiteltiin potilasnäytteitä. Itse käsitelimme vain kahta potilasnäytettä, jotka olivat analysoitavanamme näytetunnuksella, emmekä siten käsitelleet potilastietoja.

Opinnäytetyöprosessin myötä opimme paljon stafylokokeista. Perehdyimme syvemmin *S. aureuksen* rakenteeseen, patogeenisyyteen sekä sen aiheuttamiin infektioihin. Erityisesti MRSA-kantojen monimuotoisuus yllätti. Opimme polymeraasiketjureaktiosta ja siihen liittyvien työvaiheiden suorittamisesta. Esimerkiksi opimme toimimaan puhdistilassa ja DNA:n eristäminen bakteeripesäkkeestä tuli rutiininomaisemmaksi. Omia tavoitteitamme olivat tiedon syventäminen *Staphylococcus aureuksesta* sekä kokeellisen osuuden suorittamisesta. Mielestämme saavutimme tavoitteet hyvin.

Työmme pohjalta nousevat jatkotutkimusehdotukset ovat, että menetelmän optimointia jatkettaisiin järjestelmällisemmin, jolloin näytteitä ei vaihdeltaisi ohjelman ominaisuuksia muuttaessa. Toisaalta bakteerien DNA:n eristämässä voisi olla jokin standardisoidumpi tapa määrittää bakteerien määrä. Menetelmän sensitiivisyyden määrittämistä ja optimointia tulisi myös jatkaa, jotta voitaisiin tarkentaa, mikä on reaktioseoksen pienin bakteerimäärä 75–375 pmy:n väliltä, jolla *mecC* MRSA:n tunnistaminen vielä onnistuu. Myös bakteerisuspension vahvuuden määrittämisessä olisi hyvä olla jokin ihmissilmää parempi arviointitapa.

Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi oli erittäin opettavainen ja kokemusrikas prosessi. Opinnäytetyö tuotti hyödyllistä tietoa osaksi PCR-menetelmän validointia, jotta *mecC* MRSA -diagnostiikkaan saadaan toimiva ja tehokas tunnistusmenetelmä. Tämän työn myötä on saavutettu jälleen yksi askel kohti tehokkaampaa MRSA-diagnostiikkaa.

LÄHTEET

Campbell, M.K. & Farrell, S.O. 2012. Biochemistry. 7th edition. China: Cengage Learning.

Esko, E. (toim.) 1995. Aerobibakteerien tunnistaminen. Moodi 4/1995.

Fimlab laboratoriot Oy. 2013. Staphylococcus aureus, metisilliiniresistentti (MRSA), viljely. Ohjekirja. Luettu 21.3.2015.

http://www.fimlab.fi/lake/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=5959;id=11180

García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J. & Holmes, M.A. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. The Lancet Infectious Diseases.

Global Health Laboratories. 2013. Microbiology standard Operating procedure. Bacterial Identification Using BioMerieux API kits.

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) 2010. Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1.painos. Helsinki: Duodecim.

Hirvonen, J. sairaalamikrobiologi. 2015. *mecC* MRSA. Sähköpostiviesti jari.hirvonen@fimlab.fi. Luettu 31.3.2015.

Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Izquierdo Álvarez, S. & Bernabeu Andreu, F.A. 2011. Procedures for Validation of Diagnostic Methods in Clinical Laboratory Accredited by ISO 15189. Luettu 24.1.2015. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/22135.pdf>

Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Savolainen-Kopra, C., Pirhonen, J., Vuopio, J., Jalava, J., Toropainen, M., Nohynek, H., Toikkanen, S., Löflund, J.-E., Kuusi, M. & Salminen, M. (toim.) 2014. Tartuntataudit Suomessa 2013. Raportti 16/2014. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Elektroninen aineisto. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL). <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-190-7>

Kloos, W. E. & Wolfshohl, J. F. 1982. Identification of *Staphylococcus* Species with the API STAPH-IDENT System. Journal of Clinical Microbiology. 16(3).

Koskela, M. 2015. Bakteeriviljelynäytteen laadun arviointi. Moodi 5/2015.

Kärpänoja, P. 2014. MALDI-TOF MS –menetelmän käyttö bakteereiden ja sienten tunnistuksessa. Moodi 4-5/2014.

Leinonen, E. 2012. Uutta lääkkeitä: Telavansiini. Sic!-Lääketietoa Fimeasta 1/2012. http://sic.fimea.fi/etusivu/1_2012

Levinson, W. 2014. Review of medical microbiology and immunology. 13. painos. The United States of America: McGraw Hill Education.

Mahon, C.R., Lehman, D.C. & Manuselis, G. 2014. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition. New York: Saunders.

Nissinen, A. 2009. Bakterin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. Fi-Re suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä. Luettu 14.4.2015. <http://www.thl.fi/attachments/Fire/kiikkomenetelma.pdf>

Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Sekhar, G.C. & Thomas, R. 2008. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. Indian Journal of Ophthalmology. 56 (1).

Paterson, G.K., Harrison, E.W. & Holmes, M.A. 2014. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology. 22(1).

Rantakokko-Jalava, K. 2013. Moniresistenttien bakteerien seulontaan uusi laadunarviointiohjelma. Moodi 5/2013.

Roche Diagnostics. 2005. LightCycler® 2.0 Instrument - Operator's Manual. Version 2.0. Manual B: for general laboratory use.

Smith, A.C. & Hussey, M.A. 2013. Gram Stain Protocols. ASM Microbe Library. Luettu 14.4.2015. www.microbelibrary.org/component/resource/gram-stain/2886-gram-stain-protocols

Suominen, I. & Ollikka, P. 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. painos. Helsinki: Hakapaino Oy.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu

Terveyskirjasto. 2015a. Opportunistinen mikrobi. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 2.1.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02424

Terveyskirjasto. 2015b. Kolonisaatio. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 4.1.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01696

Tieteen termipankki. 2015. Pesäkkeen muodostava yksikkö. Luettu 25.1.2015. http://www.tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:pesäkkeen_muodostava_yksikkö

Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M.L. & Warnock D. W. 2011. Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 10th edition. Washington DC: ASM Press.

Virtuaaliammattikorkeakoulu. 2007. Varsinainen kokeellinen tutkimus. Luettu 1.10.2014. <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojaksot/0709019/1193463890749/1193464131489/1194289356644/1194290145403.html>

Vuopio-Varkila, J., Kuusela, P. & Kotilainen, P. 2010. *Staph. aureuksen* mikrobilääkeherkkyys. Mikrobiologia. Artikkel. Elektroninen aineisto. Kustannus Oy Duodecim.

WHO. 2015. Minimizing infection through improved infection control. Luettu 17.8.2015. http://www.who.int/patientsafety/education/curriculum/who_mc_topic-9.pdf?ua=1

LIITTEET

Liite 1. Laimennosohje

1. Siirrosta bakteerikasvustoa (mecC+ kontrollikanta) 1ml fysiologiseen keittosuolaliuokseen 0.5 McFarlandin vahvuuteen (lähtösuspensio $1,5 \times 10^8$ pmy/ml). Sekoita huolellisesti			
2. Laimenna bakteerikasvustoa 1:100 pipetoimalla lähtösuspensiota 10 μ l uuteen 1ml fysiologiseen keittosuolaliuokseen ($1,5 \times 10^6$ pmy/ml).			
3. Laimenna 2. kohdan laimennoksesta jälleen 1:100 pipetoimalla 10 μ l uuteen 1ml fysiologiseen keittosuolaliuokseen ($1,5 \times 10^4$ pmy/ml).		4. Laimenna 2. kohdan laimennoksesta ottamalla 100 μ l uuteen 1ml fysiologiseen keittosuolaliuokseen ($1,5 \times 10^5$ pmy/ml).	
A. 10 μ l + 100 μ l Bufferia ($1,5 \times 10^3$ pmy/ml)	B. 100 μ l + 100 μ l Bufferia ($7,5 \times 10^3$ pmy/ml)	C. 10 μ l + 100 μ l Bufferia ($1,5 \times 10^4$ pmy/ml)	D. 100 μ l + 100 μ l Bufferia ($7,5 \times 10^4$ pmy/ml)
7,5 pmy/reaktio (5 μ l)	37,5 pmy/reaktio	75 pmy/reaktio	375 pmy/reaktio

Liite 2. PCR-ajot

1(3)

TAULUKKO 8. Ensimmäinen ajo

1.	Pos. kontrolli <i>mecC</i> MRSA
2.	Neg.kontrolli PCR-vesi
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>
4.	<i>Escherichia coli</i>
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6.	<i>Streptococcus pneumonia</i>
7.	<i>Streptococcus. pyogenes</i>
8.	<i>Enterococcus faecalis</i>
9.	<i>Streptococcus salivarius</i>
10.	<i>Enterococcus facium</i>
11.	<i>Proteus mirabilis</i>
12.	Staphylococcus Lysis Buffer

TAULUKKO 9. Toinen ajo

1.	Pos. kontrolli, <i>mecC</i> MRSA
2.	Neg. kontrolli
3.	<i>Streptococcus agalactiae</i>
4.	<i>Micrococcus luteus</i>
5.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6.	<i>Bacillus cereus</i>
7.	<i>Candida albicans</i>
8.	ESBL

(jatkuu)

TAULUKKO 10. Kolmas ajo

1.	Pos. kontrolli, <i>mecC</i> MRSA
2.	Neg. kontrolli
3.	<i>Escherichia coli</i>
4.	<i>Enterococcus faecium</i>
5.	<i>Proteus mirabilis</i>
6.	<i>Streptococcus agalactiae</i>
7.	<i>Micrococcus luteus</i>
8.	<i>Bacillus cereus</i>
9.	ESBL

TAULUKKO 11. Viides ajo

1.	Potilasnäyte 1
2.	Potilasnäyte 2
3.	<i>mecA</i> MRSA
4.	Pos. kontrolli, <i>mecC</i> MRSA
5.	Neg. kontrolli
6.	Staphylococcus Lysis Buffer

TAULUKKO 12. Kuudes ajo

1.	A ($3,8 \times 10^2$ pmy/reaktio)
2.	B ($1,9 \times 10^3$ pmy/reaktio)
3.	C ($3,8 \times 10^3$ pmy/reaktio)
4.	D ($1,9 \times 10^4$ pmy/reaktio)
5.	Neg. kontrolli

(jatkuu)

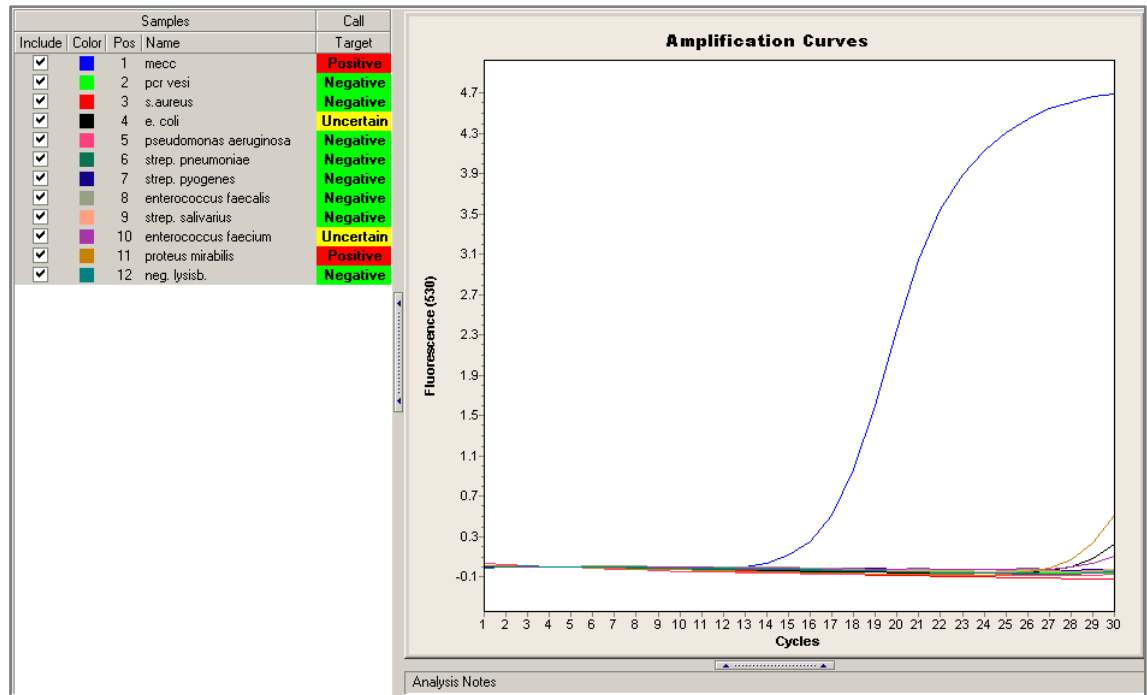
3(3)

TAULUKKO 13. Seitsemäs ajo

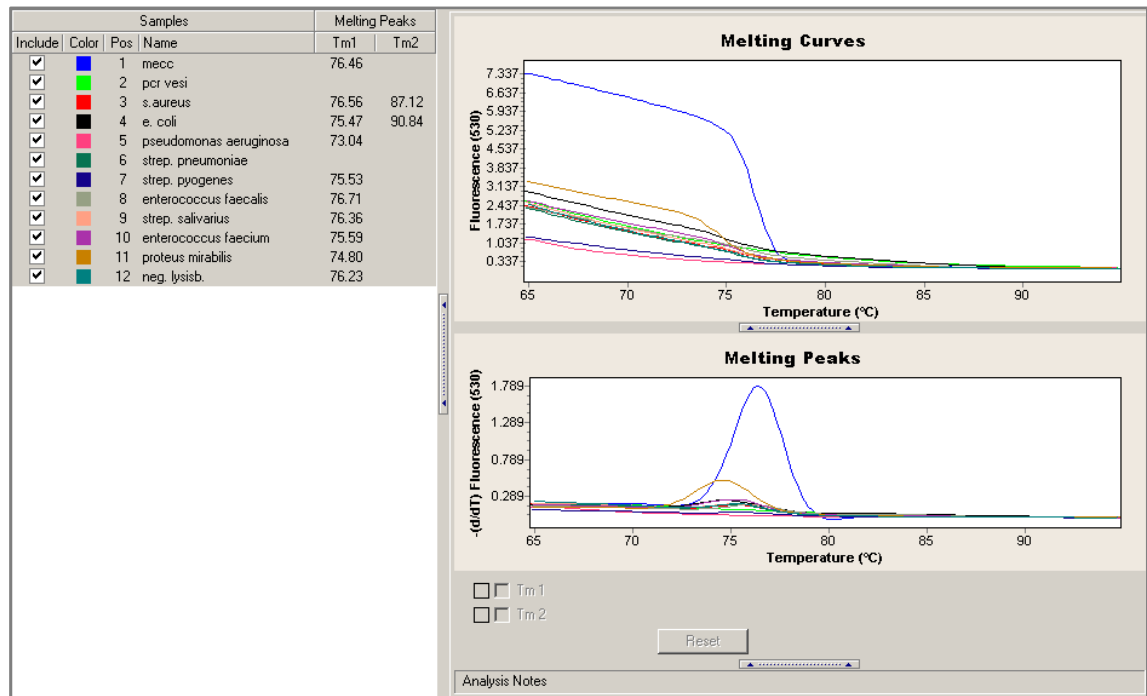
1.	Pos. kontrolli, <i>mecC</i> MRSA
2.	Neg. kontrolli
3.	Potilasnäyte 2
4.	<i>Micrococcus luteus</i>

Liite 3. Tulokuvat

1(5)



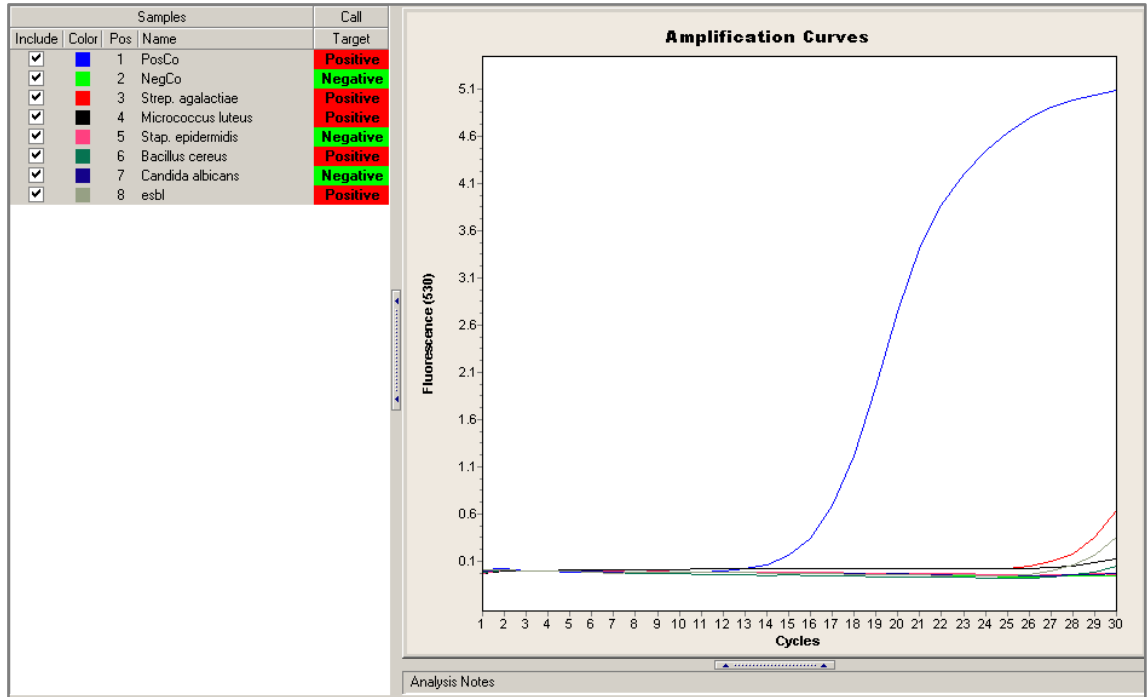
KUVA 5. Ensimmäisen ajon tulokuva.



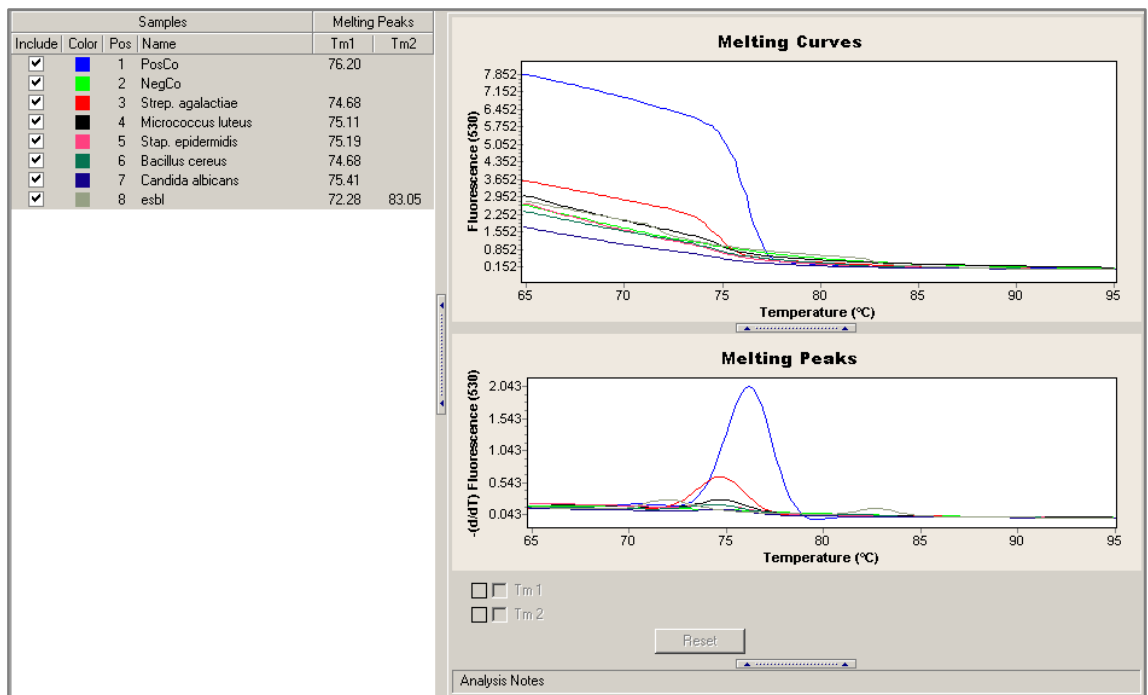
KUVA 6. Ensimmäisen ajon sulamiskäyräanalyysi.

(jatkuu)

2(5)



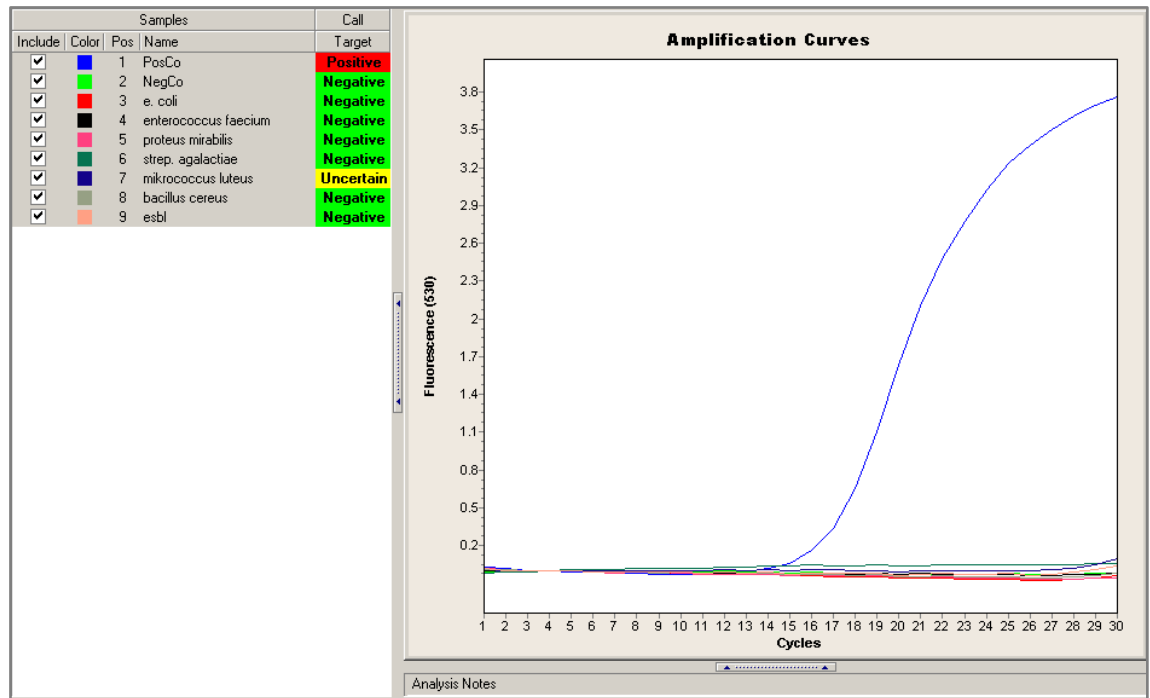
KUVA 7. Toisen ajon tuloskuva.



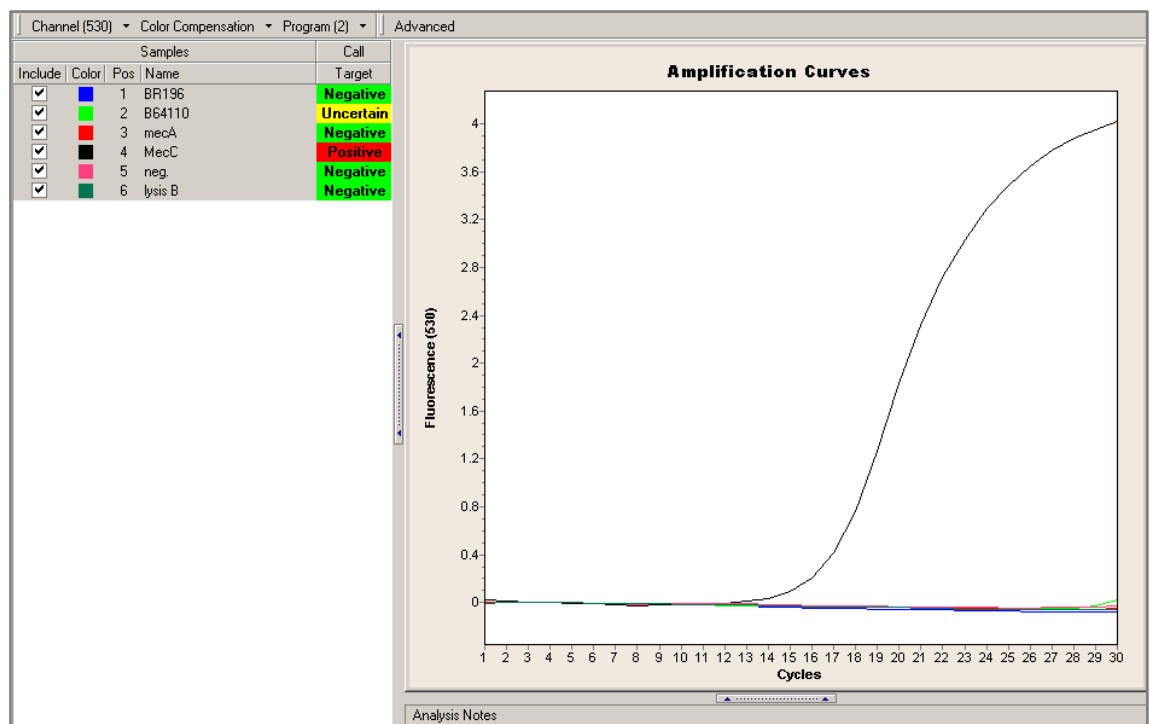
KUVA 8. Toisen ajon sulamiskäyräanalyysi.

(jatkuu)

3(5)



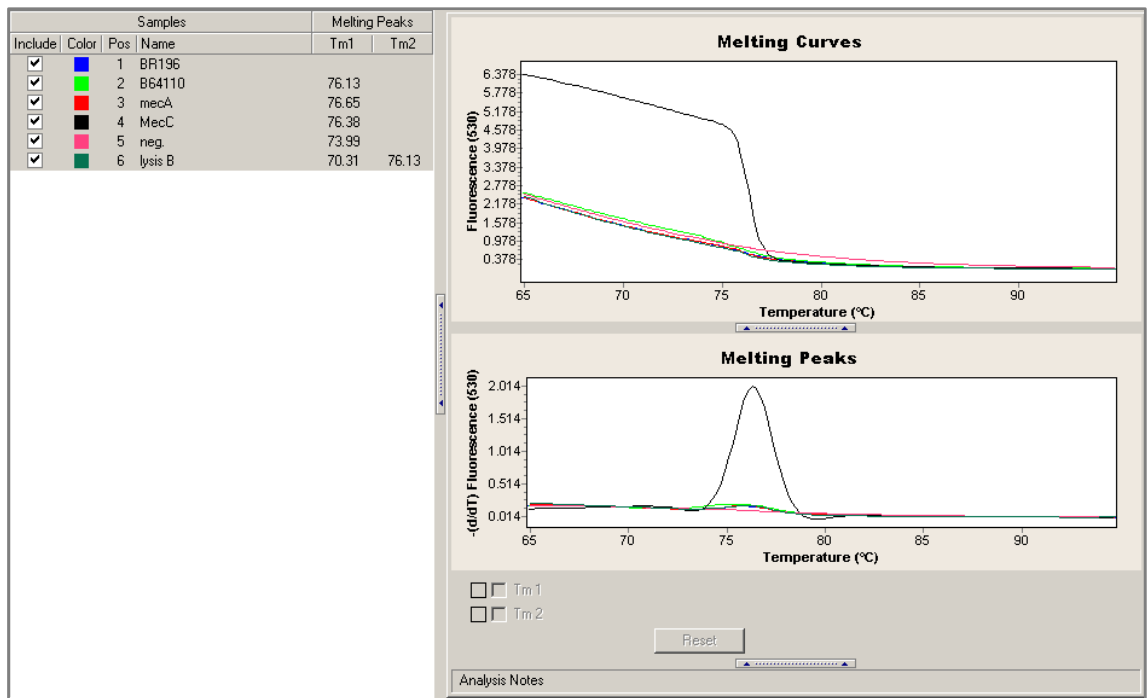
Kuva 9. Kolmannen ajon tuloskuva.



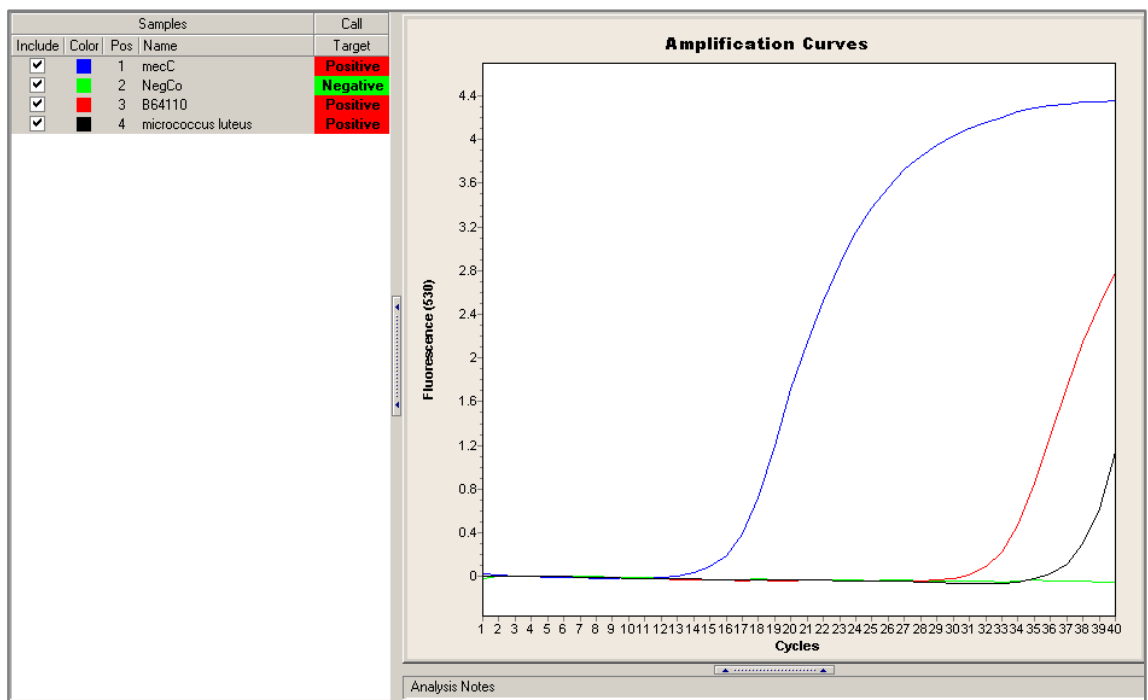
Kuva 10. Viidennen ajon tuloskuva.

(jatkuu)

4(5)



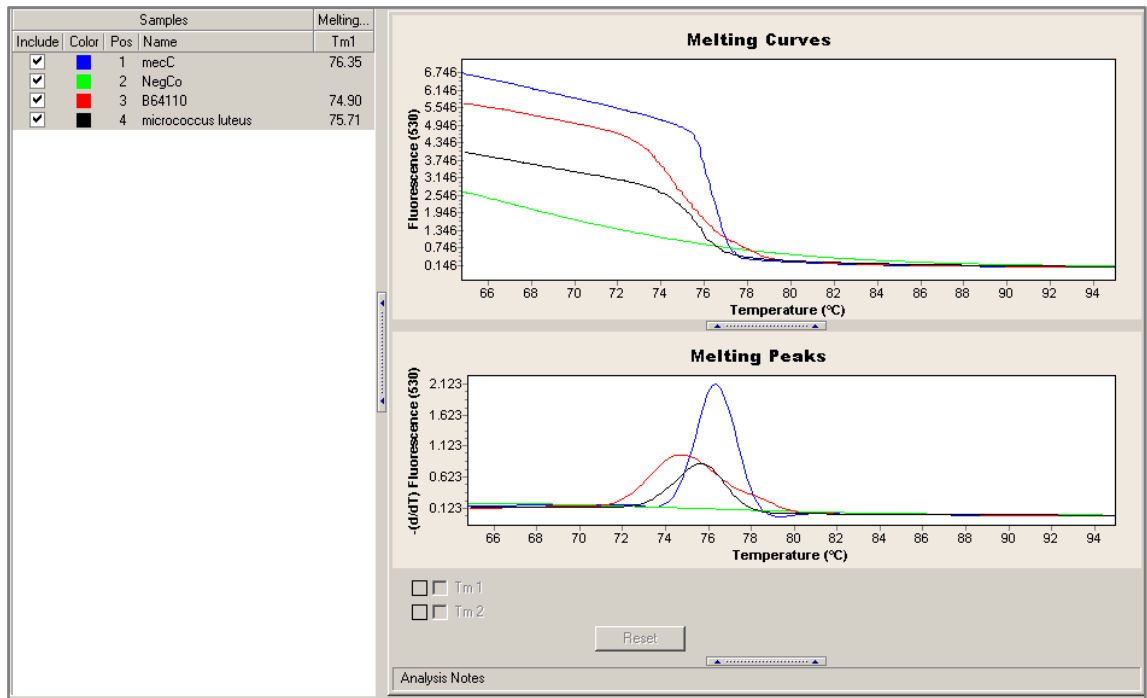
Kuva 11. Viidennen ajon sulamiskäyräanalyysi.



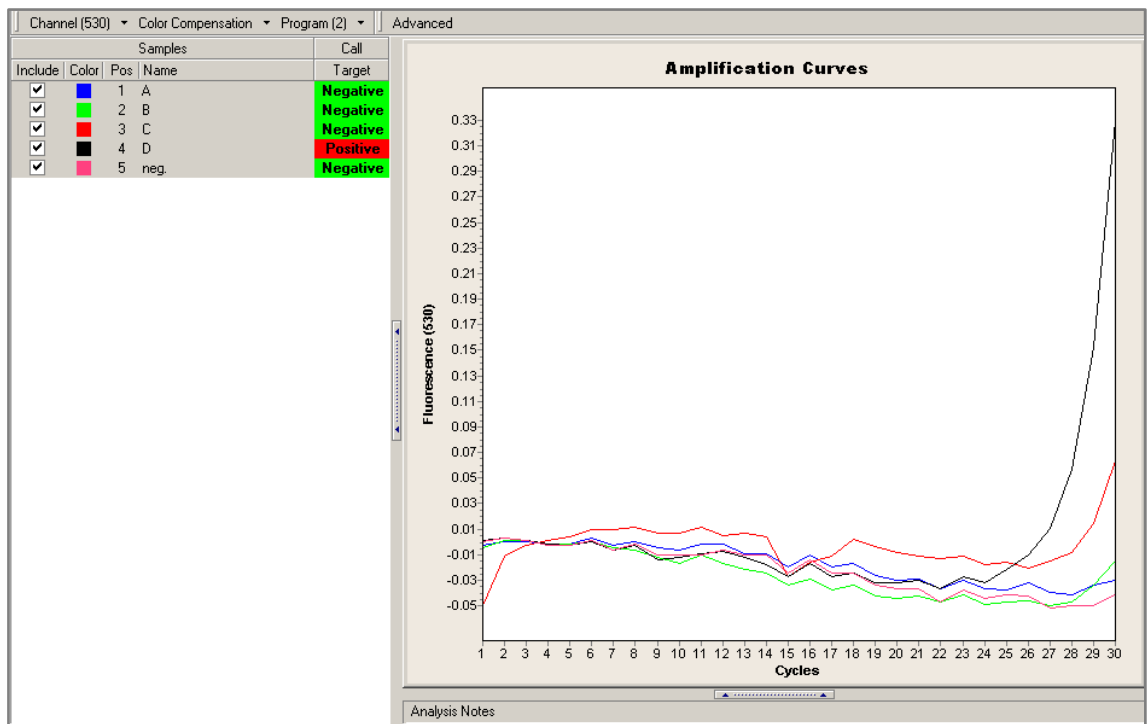
Kuva 12. Seitsemännen ajon tulokuva.

(jatkuu)

5(5)



Kuva 13. Seitsemän ajon sulamiskäyräanalyysi



Kuva 14. Herkkyysmäärityksen tuloskuva.