



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Veronika Konstantinova

# *Legionella* -suvun bakteerien määrittäminen kvantitatiivisella Multiplex qPCR menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

07.12.2020

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Veronika Konstantinova <i>Legionella</i> -suvun bakteerien määrittäminen kvantitatiivisella Multiplex qPCR menetelmällä  24 sivua + 1 liite 7.12.2020
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	laboratoriokoordinaattori, mikrobiologi MMT Minna Santalahti lehtori Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Metropolilab:in toimipisteessä, mikrobiologian laboratoriossa. Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida laboratoriolle uusi menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää <i>Legionella</i>-suvun bakteerien pitoisuutta verkostovesinäytteistä kvantitatiiviseen qPCR-menetelmän avulla. Menetelmä tehdään kaupallisella <i>Legionella</i> quantification Ly-oKit menetelmällä, jonka valmistajan Bioteccon Diagnostics on validoinut standardin ISO/TS 12869:2019 -mukaan ja laboratorion pitää tehdä menetelmälle käyttöönottoverifiointi.</p> <p>Kiinteistöjen vesijärjestelmiin pääsee pieniä määriä mikrobeja vesilaitosten käsittelemän veden mukana, vesijärjestelmissä mikrobit lisääntyvät. Tunnetuimpia taudinaiheuttajia vesijärjestelmissä ovat <i>Legionella</i>-bakteerit, jotka voivat aiheuttaa infektion päästyään muodostuneen aerosolin mukana hengitysteihin. <i>Legionella pneumophila</i> on patogeeni, joka voi aiheuttaa ihmisessä keuhkotulehduksia. Myös muut <i>Legionella</i>-suvun bakteerit voivat aiheuttaa ihmiselle vakavia oireita.</p> <p>EU:n juomavesidirektiivin muutoksiin ollaan lisäämässä ensimmäistä kertaa <i>Legionellojen</i> riskinarvio kiinteistöille sekä raja-arvot kylmässä talousvedessä ja lämpimässä käyttövedessä. <i>Legionella</i>-suvun bakteerien määrittäminen kvantitatiivisella qPCR menetelmällä säästää paljon aikaa verrattuna viljelymenetelmään, sillä viljelyn inkubointiaika on kymmenen vuorokautta, kun taas qPCR-menetelmällä tulokset saadaan samana päivänä.</p> <p>Verifiointiaineiston ja referenssimenetelmävertailun perusteella viljelymenetelmän ja kvantitatiivisen PCR-menetelmän välille löydettiin vastaavuus. Kaikkia parametreja ei voitu tutkia näytteiden ja ajan rajallisuuden vuoksi. Menetelmää ei voida käyttöönottaa laboratoriossa ennen kuin menetelmän oikeellisuus on varmistettu ulkoisen vertailumittauksen avulla. Tämä määrittäminen jäi pois opinnäytetyöstä aikataulun takia.</p>	
Avainsanat	qPCR, multiplex-reaktio, reaaliaikainen PCR, <i>Legionella</i> , verifiointi

Author Title	Veronika Konstantinova Determination of <i>Legionella</i> Bacteria by Using Quantitative Multiplex qPCR Method
Number of Pages Date	24 pages + 1 appendix 7 December 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Minna Santalahti, Laboratory coordinator, microbiologist MMT Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>This verification study was carried out for MetropoliLab Oy. The verification concerned a new method for laboratory determination of <i>Legionella</i> bacteria by using quantitative Multiplex qPCR method. The method is performed by commercial <i>Legionella</i> quantification LyoKit, which has been validated by the manufacturer Biotecon Diagnostics according to ISO/TS 12869:2019 and the laboratory must perform the commissioning verification of the method.</p> <p>Small amounts of microbes can enter water systems to be treated by water utilities. In water system microbes multiply. <i>Legionella</i> bacteria are the most well-known pathogens in water systems, which can cause pneumonia in humans. Other bacteria of the genus <i>Legionella</i> can also cause severe symptoms in humans.</p> <p>Determination of <i>Legionella</i> bacteria by the quantitative qPCR method saves a lot of time compared to the culture method. The incubation time of culture is ten days, while the qPCR method gives the results on the same day. For determination, water sample was filtered on a membrane, after which DNA was isolated from the membrane with StarPrep two isolation kit. The isolated DNA was pipetted into the PCR reaction tubes and placed to instrument for running. The standard line gives a quantitative result on the concentration of <i>Legionella</i> in the water sample. The method was tested for its repeatability and uncertainty in measurement.</p> <p>Based on the verification data and the reference method, conformity between the culture method and the quantitative PCR method was found. Not all parameters could be analyzed due to limited samples and time. The method cannot be implemented in a laboratory until the accuracy of the method has been verified by an external reference measurement. This parameter was left out of this thesis study due to schedule issues.</p>	
Keywords	qPCR, multiplex-reaction, real time PCR, <i>Legionella</i> , verification

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Legionella	2
2.1	Legionella ympäristössä	2
2.2	Legionelloosi	3
3	Kvantitatiivinen PCR	4
4	Materiaalit ja menetelmät	6
4.1	Näytteet ja matriisit	6
4.2	Legionellabakteerin kvantitatiivinen määrittäminen vesinäytteistä	7
4.2.1	DNA:n eristäminen vesinäytteistä	8
4.2.2	Legionellan kvantitatiivinen määrittäminen PCR:llä	10
4.2.3	Laitteisto ja tulosten analysointi	11
5	Tulokset	13
5.1	qPCR-tulosten vertailu viljelymenetelmään	13
5.2	Spesifisyys ja herkkyys	13
5.3	Lineaarisuus	14
5.4	Toistettavuus	15
5.5	Oikeellisuus	16
5.6	Määritysrajat ja toteamisrajat	16
5.7	Mittausepävarmuus	17
6	Tulosten tarkastelu	19
7	Johtopäätökset	22
	Lähteet	23
	Liitteet	
	Liite 1. Näytteiden tulokset	

## Lyhenteet

Cq-arvo	Cycle Threshold, kynnysyikli
DNA	deoksiribonukleeiinihappo
GU	genominen yksikkö, joka vastaa yhtä bakteerisolua
GVPC	Legionella-suvun bakteerien agarpohja, joka sisältää selektiivitekijöinä glysiiniä, vankomysiiniä, polymyksiini B:tä ja syklohesimidiä
PCR	polymeraasiketjureaktio
Pmy/l	pesäkkeitä muodostavaa yksikköä litrassa
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction, kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Metropolilab:in toimipisteessä, mikrobiologian laboratoriossa. Metropolilab tarjoaa laboratoriopalveluita yrityksille, laitoksille, kuntien ja valtion viranomaisille sekä yksityisille henkilöille. Laboratoriopalveluihin kuuluu elintarvike-, vesi- ja ympäristöanalyysit.

Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida Metropolilab:in laboratoriolle uusi menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää *Legionella*-suvun bakteerien pitoisuutta verkostovesinäytteistä kvantitatiivisen qPCR-menetelmän avulla. Laboratorion pitää tehdä menetelmälle käyttöönottoverifiointi, sillä menetelmä tehdään kaupallisella kitillä. Menetelmä on validoitu valmistajan Bioteccon Diagnostics toimesta standardin ISO/TS 12869:2019 mukaan [1].

Kvantitatiivisen PCR-menetelmän verifiointiin ei ole varsinaista ohjetta, vaan se tapahtuu yleensä validointiohjeiden soveltamisen kautta. Verifiointisuunnitelma tulee tehdä aluksi, ja siinä määritetään mitä parametreja ja paljonko näytteitä verifiointin aikana tullaan tutkimaan. Verifioitavan menetelmän herkkyys ja spesifisyys voidaan määrittää esimerkiksi vertaamalla verifioitavalla menetelmällä saatujen tulosten (positiivinen/negatiivinen) määrää referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin. [4.] Tässä työssä referenssimenetelmänä käytettiin *Legionellan* viljelymenetelmää.

Juomavesidirektiivin muutoksia ollaan viimeistelemässä EU:ssa. Direktiiviin ollaan lisäämässä ensimmäistä kertaa *Legionellojen* vuoksi tehtävä riskinarvio kiinteistöille sekä raja-arvo, jota *Legionella*-bakteerin pitoisuus ei saisi ylittää kylmässä talousvedessä ja lämpimässä käyttövedessä. *Legionella*-bakteerit on otettu mukaan direktiiviin, sillä bakteerin aiheuttama infektio aiheuttaa runsaasti sairastumisia. Jatkossa kiinteistöjen on mitattava laajemmin *Legionella*-bakteerien pitoisuuksia, ja ryhdyttävä torjuntatoimiin heti raja-arvojen ylittyessä mahdollisten terveyshaittojen ehkäisemiseksi. [3]

Direktiivin muutoksen takia monet laboratoriot haluavat laajentaa omia analyysipalveluitaan. *Legionella*-suvun bakteerien määrittäminen kvantitatiivisella qPCR-menetelmän avulla säästää paljon aikaa tuloksien saamisessa verrattaessa viljelymenetelmään, sillä viljelyn inkubointiaika on kymmenen vuorokautta, kun taas qPCR-menetelmällä saadaan tulokset samana päivänä.

## 2 Legionella

*Legionella* bakteerit ovat aerobisia, gramnegatiivisia sauvabakteereita ja bakteerin koko on noin 2–20 µm [5, s. 175]. *Legionella* käyttää energialähteenään aminohappoja ja niiden ensisijainen tarvitsema kasvutekijä on L-kysteiini. *Legionella*-sukuun kuuluu 62 lajia, joista 28 lajia voi aiheuttaa infektiota ihmiselle. *Legionella* ei kuulu ihmisen normaalimikrobistoon. *Legionella pneumophila* -bakteerilla on 15 erilaista serotyyppiä, joista yleisimmien sairastumisia aiheuttaa seroryhmään 1 kuuluvat kannat. [6; s. 5]

*Legionella* bakteerista voi saada tartunnan hengittäessään bakteereja sisältävää aerosolia. *Legionellat* pääsevät vesijärjestelmistä ilmaan esimerkiksi suihkujen, hanojen ja ilmastotuttimien aiheuttaman aerosolin mukana. Sen lisäksi *Legionellaa* esiintyy mm. maaperässä. [7]

### 2.1 Legionella ympäristössä

*Legionella*-bakteerit ovat tunnetuimpia taudinaiheuttajia vesijärjestelmissä. Lisäksi bakteeria esiintyy pieninä pitoisuuksina mm. makeissa luonnonvesissä ja maaperässä. Verkostovedestä *Legionella*-bakteerit pääsevät kulkemaan kiinteistöjen vesijärjestelmiin, jossa ne voivat päästä lisääntymään. Sopiva veden lämpötila *Legionellojen* lisääntymiseen on +20...-40°C, samoin veden vähäinen vaihtuvuus, putkistojen korroosio, biofilmit ja puutteellinen lämmöneritys ovat suotuisia olosuhteita bakteerille. [7.] Myös putkissa olevan biofilmin alkueläimet ja mikrobisto ovat *Legionelloille* sopiva kasvuympäristö ja ne suojaavat veden virtauksilta ja desinfektioaineiden vaikutuksilta. Kaikki vesijärjestelmät, joissa vesi on lämmintä, ovat *Legionellojen* kasvupaikkoja. Näin ollen *Legionellan* lisääntymistä voidaan torjua huolehtimalla veden lämpötilasta.

Talousveden on oltava riittävä kylmä (<20 °C) ja lämpimän veden riittävän kuumaa (vähintään 55 °C) koko vesijärjestelmässä. Samoin säännöllinen vesijärjestelmän käyttö, huolto ja puhdistus auttaa *Legionellojen* torjunnassa. Jätevedenpuhdistamoilla *Legionella* voi esiintyä suurissa pitoisuuksissa, ja niiden pääsyä ilmaan on vaikeaa estää. Tällöin ainoa keino estää tartuntaa on käyttää hengityssuojaimia. [8]

## 2.2 Legionelloosi

*Legionella*-bakteeri löydettiin vuonna 1976 Philadelphiassa sotaveteraanien kokoukseen liittyneen keuhkokuume-epidemian yhteydessä. *Legionella* voi aiheuttaa infektion, kun bakteerin pitoisuus on riittävän suuri, ja *Legionella* leviää hengitysilmaan aerosolien avulla. Bakteerin päästyä alas keuhkoputkiin asti ja sieltä kudoksiin, syntyy infektio. Ihmiselimestössä infektio tapahtuu fagosytoivissa soluissa, ensisijaisesti keuhkojen alveolaarisissa makrofageissa, joissa ne lisääntyvät. *Legionellat* voivat aiheuttaa vakavan keuhkokuumeen eli legioonalaistaudin. Taudin itämisaika on noin 2–10 päivää, mutta joissakin taudintapauksissa itämisaika on todettu jopa 16 päivää. Vettä juomalla tartuntaa ei voi saada, sillä veden on päästävä keuhkoihin pieninä pisaroina. Infektiivistä ainstusta ei tunneta, mutta joissakin tartuntalähteessä veden *Legionella*-bakteerin pitoisuus on ollut noin 10 000–10 miljoonaa pmy/l. Myös pienemmätkin pitoisuudet voivat aiheuttaa sairastumista, sillä siihen vaikuttaa mm. *Legionella* kannan taudinaiheuttamiskyky ja altistuneen terveydentila. Legionelloosi ei lähtökohtaisesti tartu henkilöstä toiseen eikä myöskään tartu eläimistä. [9]

*Legionellojen* aiheuttama infektio voidaan havaita virtsan antigeenitestillä, *Legionella*-vasta-ainemittauksen sekä kudospöytien viljely- ja värjäysmenetelmien avulla. Luotettavimmaksi menetelmäksi on todettu virtsan *Legionella*-antigeenien mittaaminen potilasnäytteistä. Testi pystyy kuitenkin tunnistamaan vain *L. pneumophila* -lajin seroryhmän 1 infektioita. [10]



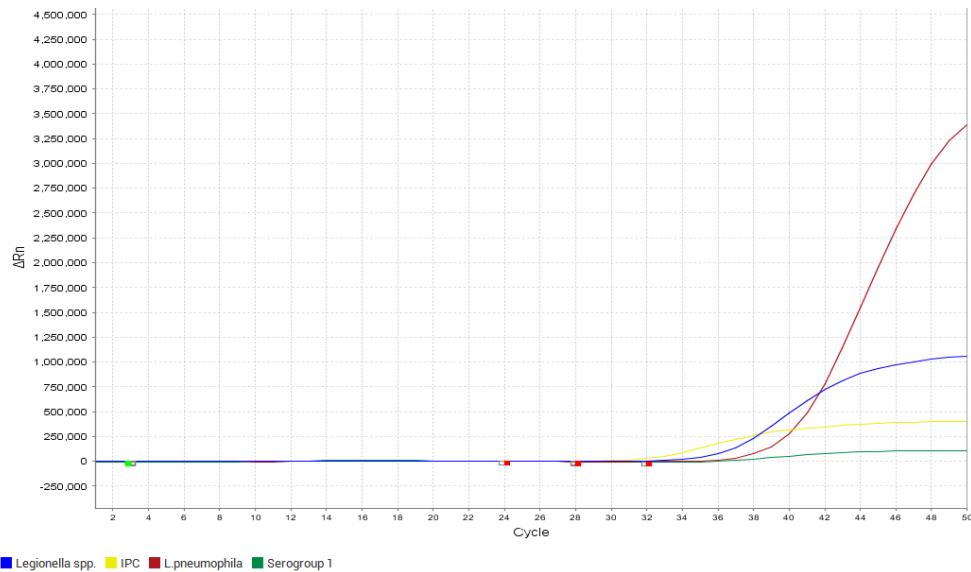
Legionella-bakteerin aiheuttamien keuhkokuumeiden määrät ovat kasvusuunnassa Euroopassa. Vuonna 2018 oli yhteensä 11 343 *Legionellojen* aiheuttamaa keuhkokuume-tapausta (ECDC 2019). Taudin lisääntymiseen on vaikuttanut mm. diagnostiikan paran-tuminen, jolloin legionelloosin tunnistaminen kehittyi. Suomessa vuosittain legionelloo-sitapauksia on noin 30, joista yli puolet ulkomailta on tuotuja. [10]

Suomessa lääkärin on ilmoitettava kaikki legionelloosit tartuntatautirekisteriin, samoin laboratoriot ilmoittavat positiivisista *Legionella*-bakteeri löydöksistä. Legionelloosi-ta-pauksien kohdalla pyritään selvittämään tartunnan alkuperä uusien tapausten estä-miseksi, useimmiten tartunta on peräisin vesilähteestä. [11]

### 3 Kvantitatiivinen PCR

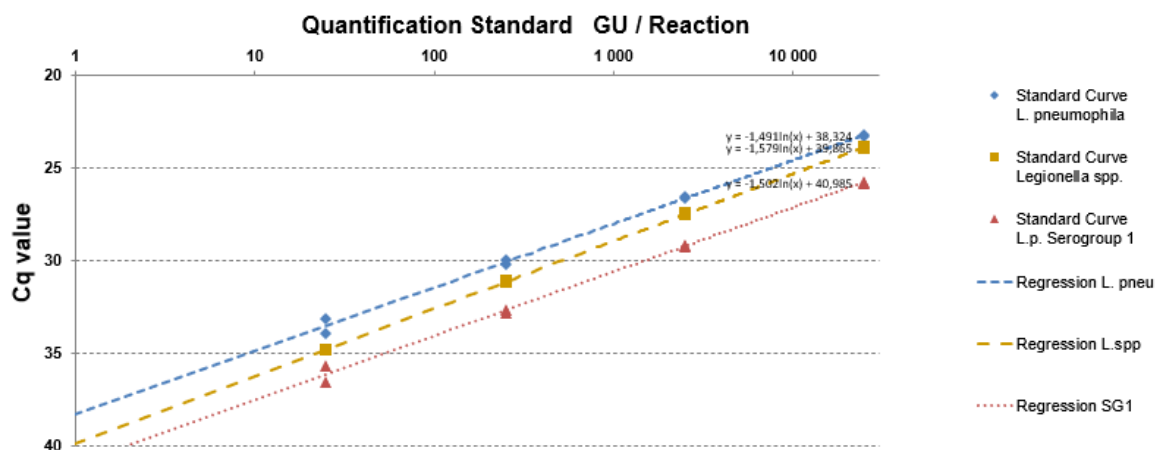
Kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion eli qPCR-tekniikan avulla on mahdollistaa tun-nistaa esimerkiksi taudinaiheuttaja yhden tai useamman valitun nukleinihapposekvens-sin perusteella. qPCR-tekniikkaa käyttäen voidaan saman aikaisesti määrittää tietyn kohdegeenin pitoisuus erilaisista näytteistä suurella herkkyydellä. qPCR:ssä tutkittavaa DNA-jaksoa monistetaan ja detektoidaan samanaikaisesti. Kvantitatiivisessä menetel-mässä on ajettava standardisuora, jonka laimennossarjassa on tunnettu geenikopiolu-kumäärä samasta kohdegeenistä, jota halutaan tutkia. [12]

Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä käytetään fluoresoivia koettimia, jotka sitoutuvat DNA:han. Syntynyttä fluoresenssia mitataan syklien aikana, ja se on verrannollinen mo-nistuneen DNA:n määrään (Kuva 1). Alin taso, jolla fluoresenssi voidaan luotettavasti todeta ja erottaa taustasta, asetetaan kynnsarvoksi (threshold). Threshold cycle eli  $C_q$ -arvo on kääntäen verrannollinen kohdegeenin lukumäärään näytteessä. Fluoresenssia seurataan koko PCR-prosessin ajan. Mitä suurempi DNA-molekyylien määrä näytteessä on, sitä aikaisemmin fluoresenssitason nousu havaitaan PCR-syklien aikana. Monistus-käyriä voidaan tarkastella määrittämällä fluoresenssi lineaarisella tai logaritmisella as-teikolla. [13]



Kuva 1. Näytteen laivavesi G:n kohdegeenien monistuskäyrät reaaliaikaisella Applied Biosystem QuantStudio5 -PCR-laitteella. Fluoresenssi on ilmoitettu lineaarisella asteikolla.

Tuntemattoman näytteen DNA-pitoisuus voidaan määrittää kohde-DNA:sta valmistetun standardisuoran avulla (Kuva 2). Standardisuoran asteikkona käytetään standardinäytteiden pitoisuutta ja niiden saamia Cq-arvoja. Standardisuora on ajettava aina, kun otetaan käyttöön uusi PCR-kittierä. Myös jokaisella laitteella on ajettava oma standardisuora. Yksittäisten PCR-ajojen onnistumista seurataan ajamalla jokaisessa ajossa kohde-DNA:ta sisältämättömiä ja sisältäviä kontrollinäytteitä. Jokaisessa ajossa on oltava vähintään yksi positiivinen kontrolli, negatiivinen kontrolli ja eristyskontrolli. [14]



Kuva 2. Standardisuora 25-25000 GU/ reaktio, Legionella Quantification LyoKit reaaliaikaisella Applied Biosystem QuantStudio5 -PCR-laitteella.

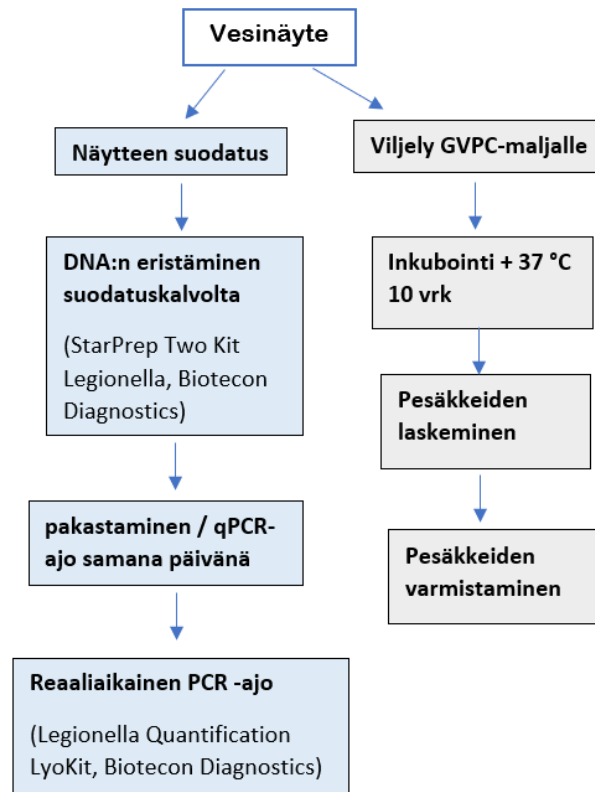
Perinteiseen PCR-menetelmään verrattuna qPCR-menetelmän hyvä puoli on monistetun DNA:n havaitseminen samaan aikaan kun PCR-reaktio tapahtuu, ja tulos saadaan muutamassa tunnissa. Perinteisessä PCR-menetelmässä taas tulokset pitää jälkikäteen tarkistaa agarosigeelielektroforeesilla. Huonona puolena on qPCR-menetelmän kustannukset, koska menetelmän laitteet sekä reagenssit ovat kalliimmat kuin perinteisellä PCR-menetelmällä. [13]

## 4 Materiaalit ja menetelmät

### 4.1 Näytteet ja matriisit

Verifiointissa tutkittiin rinnakkain viljelymenetelmällä GVPC-maljoilla ja kvantitatiivisella PCR-menetelmällä yhteensä 31 vesinäytettä (Kuva 3.). Rinnakkaiset näytteet analysoitiin aina samasta esikäsittelyvaiheen vesinäytepullostasta. Verifiointissa analysoitiin luonnollisia sekä bakteerilla siirrostettuja vesinäytteitä. Menetelmän matriisina oli mm. verkostovedet, talousvedet, laivavedet sekä vesinäytteitä, joihin oli siirrostettu maljalla kasvavaa *Legionellaa*. Luonnolliset näytteet olivat laboratorioon tulleita asiakasnäytteitä. Suurimmasta osasta näytteiden viljelytulokset olivat selvillä ennen DNA:n eristämistä, ja näytteet valittiin viljelytuloksen perusteella mikrobipitoisuudet huomioiden.

Bakteerilla kontaminoituja vesinäytteitä valmistettiin itsenäisesti laboratoriossa mm. verkostoveteen ja steriiliin veteen. Kontaminoituvana bakteereina käytettiin erilaisia *Legionella*-lajeja mm. *Legionella SG 1*, *Legionella pneumophila SG 2*, *Legionella bozemani* ja *Legionella anisa*. *Legionellaa* sisältäviä luonnollisia näytteitä oli rajoitettu määrä laboratoriossa. Luonnolliset vesinäytteet olivat suurimmaksi osaksi laivavesiä, sillä verkostovesissä harvemmin havaitaan isoja legionellapitoisuuksia.



Kuva 3. Menetelmän toimintaprosessi

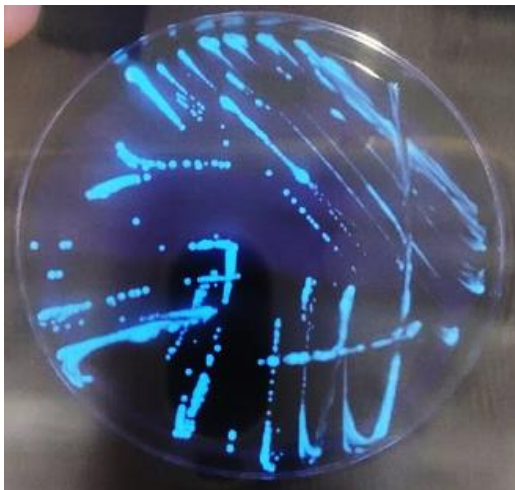
#### 4.2 Legionellabakteerin kvantitatiivinen määrittäminen vesinäytteistä

GVPC on puskuroitu hiiliagaralusta, joka sisältää muiden mikrobien kasvua estäviä antibiootteja, rauta (III) suoloja ja L-kysteini-aminohappoja, jotka ovat välttämättömiä *Legionella*-suvun bakteerien kasvuun. GVPC-agaralustaa on käytetty tässä työssä viljelymenetelmässä. [6]

Tyypilliset *Legionella*-bakteerin pesäkkeet GVPC-agarilla ovat melko litteitä, valkoisia, harmaita, sinertäviä tai jopa vihertäviä. Pesäkkeiden kasvua voidaan havaita maljoilla noin kolmen vuorokauden inkuboinnin (+37 °C) jälkeen. *Legionella*-lajit ja erityisesti *L. pneumophila* ovat hidaskasvuisia, joten kasvatusta jatketaan aina 10 vuorokauteen asti. *Legionella*-bakteerin määrittäminen puhtaista vesinäytteistä perustuu kalvosuodatusmenetelmään ja kalvon inkuboimiseen kasvatusalustalla, sillä puhtaan veden *Legionella* pitoisuus voi olla pieni, jolloin suodatuksella saadaan konsentroitua suurempi vesinäytemäärä kerralla. [6.]

Likaisempien vesinäytteiden määrittäminen tapahtuu pintaviljelymenetelmällä, jossa näytettä viljellään (esimerkiksi 0,1 ml) suoraan kasvatusalustalle. Tällainen vesinäyte on esimerkiksi laivavesi.

Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan veriagarmaljoilla. Jos veriagarmaljoilla ei havaita kasvua, suoritetaan lopullinen varmistus *Legionella pneumophila*- tai *Legionella spp.* -bakteeriksi käyttäen PCR- menetelmää. *Legionella spp.* -bakteeri on fluoresoiva GVPC-maljalla UV-valossa (Kuva 4.), mikä helpottaa bakteerin tunnistamista selektiiviseltä maljalta muiden *Legionella*-bakteerien joukosta. [6]



Kuva 4. *Legionella spp.* (*L. bozeman*) -pesäkkeitä GVPC-maljalla UV-valon alla.

#### 4.2.1 DNA:n eristäminen vesinäytteistä

Näytteen käsittely ja DNA:n eristys suoritettiin StarPrep Two Kit (Biotecon Diagnostics) -ohjeiden mukaan [15]. Vesinäytteet säilytettiin jääkaapissa ennen analysointia. Näyte sekoitettiin varovasti ennen analysointia työturvallisuus huomioiden.

Näyte suodatettiin suodatuskalvon (Pall corporation supor 0,2 µm, 66143) läpi vesi-imujärjestelmän avulla. Analyysiin käytetty suodatuskalvo oli PES-kalvo eli polyeetterisulfoni kalvo. Suodatuskalvo taitettiin 5 ml:n kierrekorkkiputkeen, jossa oli huuhtelupuskuria. Huuhtelupuskurina käytettiin Biotecon Diagnosticsin valmistamaa Rinse Buffer -puskuria. Näytteitä sekoitettiin vorteksilla, jolloin solut huuhtoutuivat kalvolta puskuriiin, minkä jälkeen näyte sentrifugoitiin.

Sentrifugoinnin tarkoitus oli kuivata puskurilla huuhdeltu filterti ja saada solut putken pohjalle. Suspensiosta siirrettiin 700 µl:n eppendorf-putkeen. DNA:n eristys tapahtui kokonaan yhdessä eppendorf-putkessa, mikä minimoi ristikontaminaatiota.

Vesinäytteet voivat sisältää isoja määriä kuolleita soluja sekä vapaata DNA:ta, mikä voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia ja vääristää kvantitatiivisen PCR-määrityksen. Ennen varsinaista DNA-eristystä eppendorf-putkeen lisättiin D-reagenssi ja inkuboitii D-Light -inkubointilaitteessa. Inkubointi tapahtui 10 minuuttia huoneenlämmössä ja pimeässä, jonka jälkeen inkuboitii 5 minuuttia D-light -valon kanssa. D-reagenssin ja D-light -inkuboinnin tarkoituksena on erottaa DNA kuolleista ja elävistä soluista. Näkyvälle valolle altistuminen johtaa reagenssin kovalenttiseen sitoutumiseen kuolleista soluista vapautuneeseen DNA:han ja estää DNA:n monistumisen PCR:ssä (Kuva 4). D-reagenssin inkuboinnin jälkeen näyte sentrifugoitiin, jolloin solut kerättiin putken pohjalle pellettiin ja D-reagenssi poistettiin pipetoimalla. [16]



Kuva 5. D-reagenssin toimintaperiaate, Bioteccon Diagnostics [16]

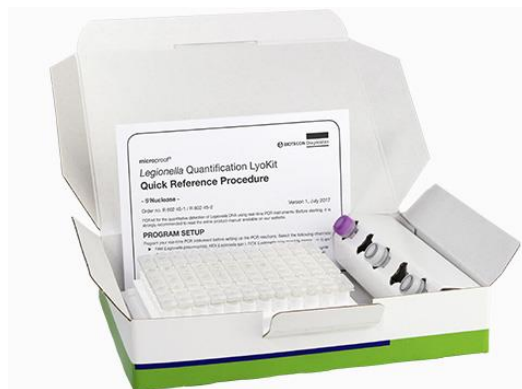
Varsinaisessa DNA-eristysvaiheessa solut hajotettiin mekaanisesti helmihajotuksella sekä kuumennuskäsittelyllä. Soluhajotuksen eli lyysauksen jälkeen näyte sentrifugoitiin, jonka jälkeen DNA on supernatantissa ja käyttövalmis qPCR-ajoa varten. Tarvittaessa eristetty DNA voidaan pakastaa myöhempää käyttöä varten. Tämä varmistettiin standardin vaatimusten mukaisesti myös verifiionnin yhteydessä.

#### 4.2.2 Legionellan kvantitatiivinen määrittäminen PCR:llä

Microproof® Legionella quantification LyoKit (R 602 45-1) on menetelmä *Legionella*-suvun bakteerien DNA:n nopeaan kvantitatiiviseen määrittämiseen (Kuva 5). Kuolleiden bakteerien DNA:n monistuminen PCR-ajossa voidaan estää käyttämällä DNA:n eristykseen D-reagenssia [16]. Menetelmä on validoitu ISO / TS 12869: 2019 -standardin mukaan. Kitti sisältää negatiivisen ja positiivisen kontrollin sekä, 4 valmista standardiliuosta, joista tehdään standardisuora. Standardinliuoksien määritysraja on 25-25000 GU. [1]

Kitissä on kaikki tarvittavat reagenssit ja kontrollit luotettavia tuloksia varten. Luotettavuuden varmistamiseksi reaktioputket sisältävät sisäisen kontrollin (IC), jolla seurataan DNA-näytteessä mahdollisesti olevia inhibiittoreita. Sisäinen kontrolli monistuu samassa PCR-ajossa *Legionella*-spesifisten alukkeiden kanssa. Sisäinen kontrolli on leimattu fluoresoivalla Cy5 -leimalla, *Legionella pneumophila* -FAM-leimalla, *Legionella spp.* -HEX/VIC-leimalla ja *Legionella pneumophila seroryhmä 1* -ROX-leimalla. [1]

Sisäinen kontrolli monistuu aina silloin, kun reaktio-olosuhteet ovat kunnossa. Mikäli sisäinen kontrolli ei ole monistunut, näytteen monistusreaktiossa on tapahtunut inhibitio. Inhibitiota voivat aiheuttaa mm. näytteen sisältämät suolat, rasvat ja proteiinit. Inhibition havaittaessa näyte-DNA:ta laimennetaan PCR-ajoa varten. [15]



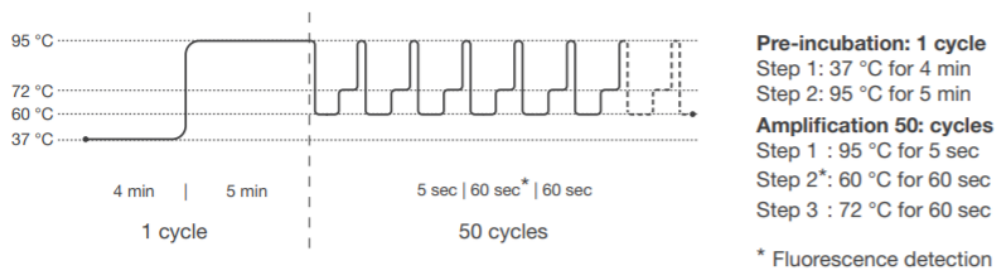
Kuva 6. Microproof Legionella Quantification LyoKit, BIOTECON Diagnostics [1]

PCR-kitti sisältää kaikki *Legionella* DNA:n havaitsemiseen tarvittavat PCR-reagenssit kylmäkuivattuna yhdessä reaktioputkessa. PCR-reaktion suorittamiseen riittää näyte-DNA:n lisääminen reaktioputkiin, mikä vähentää pipetointivirheen riskiä PCR-reaktioseoksen koostamisessa sekä kontaminaatoriskiä.

#### 4.2.3 Laitteisto ja tulosten analysointi

qPCR-laitteen ohjelmiston avulla määritetään mitattujen fluoresenssien perusteella fluoresenssikäyrät ja monistetuista DNA-näytteistä C<sub>q</sub>-arvot. Threshold cycle- eli C<sub>q</sub>- arvo on kääntäen verrannollinen kohdegeenin lukumäärään näytteessä. Näytteen sisältämä kohdegeenin määrä määritetään lineaarisen standardisuoran avulla.[13]

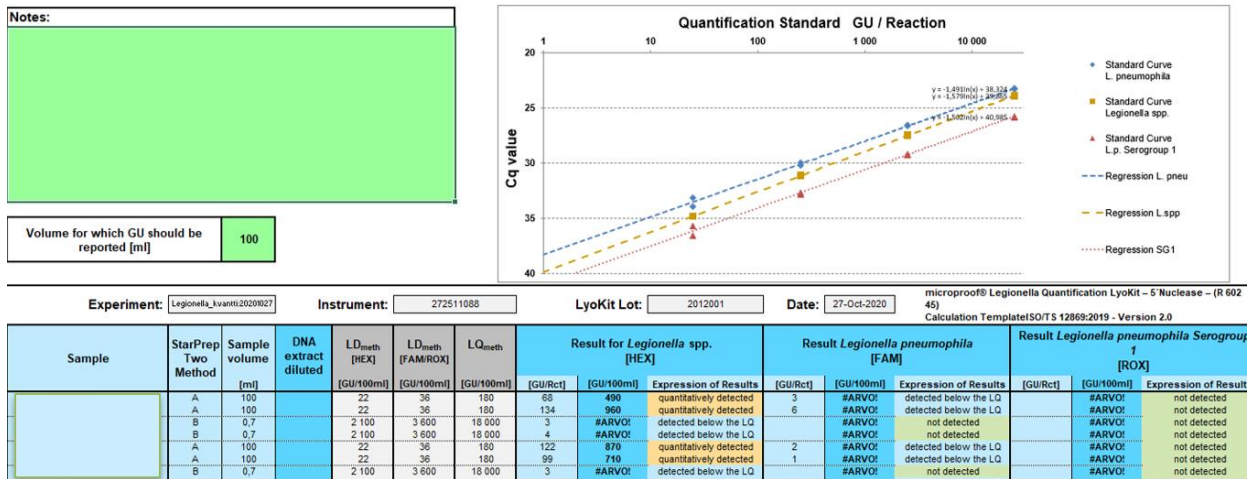
Näytteiden PCR-reaktiot ajettiin reaaliaikaisella QuantStudio 5 -PCR-laitteella. PCR-ajossa käytettiin reaktioseoksille valmistajan optimoimaa ajo-ohjelmaa (Kuva 7).



Kuva 7. qPCR-ajo-ohjelma, Legionella Quantification LyoKit BIOTECON Diagnostics [17].

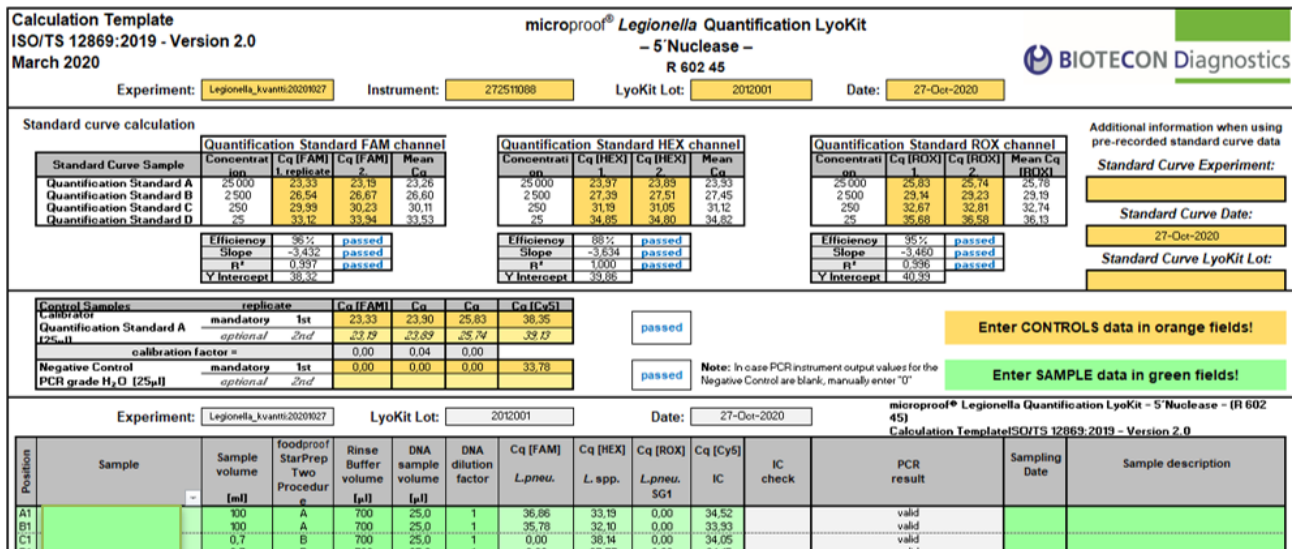
PCR-ajossa saadut C<sub>q</sub>-arvot jokaiselle kohdegeenille siirrettiin Bioteccon Diagnosticsin kehittämään laskentapohjaan, joka ottaa huomioon standardisuoran sekä ajon kontrollien tulokset (Kuva 8). Laskentapohja on kehitetty ISO 12869:2018:n vaatimusten mukaisesti [1]. Laskentapohja ilmoittaa heti mahdollisista inhibitioista näytteessä. Lopullinen pitoisuus saadaan laskentapohjasta suoraan C<sub>q</sub>-arvojen ja näytetietojen syöttämisen jälkeen.





Kuva 8. Laskentapohja tuloksille, Legionella Quantification LyoKit Calculation Template, Biotecon Diagnostics

Taulukko laskee automaattisesti tulokset yksikössä genomyksikköä reaktiota kohden (Kuva 9). Lopullisen pitoisuuden yksikön saa määritettyä itse, tässä työssä kaikki tulokset haluttiin laskea genomyksikköä / 100 ml. Määritysrajan ulkopuolella olevat tulokset taulukko huomioi myös ja merkitsee ne eri värillä.



Kuva 9. Laskentapohja tuloksille, Legionella Quantification LyoKit Calculation Template, Biotecon Diagnostics

## 5 Tulokset

### 5.1 qPCR-tulosten vertailu viljelymenetelmään

Yhteensä 24 näytteestä saatiin positiivinen tulos sekä viljely- että qPCR-menetelmää käyttäen. Kahdesta näytteestä saatiin ”väärä positiivinen” tulos PCR-menetelmällä, koska näytteen viljelytulos oli negatiivinen. Molemmat näytteet olivat luonnollisia vesinäytteitä, yksi niistä oli kraanavesi ja toinen laivavesi. PCR-menetelmä on herkempi viljelymenetelmään verrattuna, mistä väärä positiivinen tulos voi johtua. PCR-tulos näillä näytteillä jäi kuitenkin alle määritysrajan, joten *Legionellan* määrä näytteissä oli todella pieni. Näytteiden viljelymaljoilla oli myös paljon taustakasvua, joka saattoi myös peittää alleen legionellapesäkkeiden kasvua.

Rinnakkaisten viljely ja qPCR- tulosten pitoisuuksissa oli myös eroja. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että PCR-menetelmä on herkempi kuin viljelymenetelmä. qPCR-menetelmä myös mittaa hieman eri asiaa kuin perinteinen viljelymenetelmä. qPCR-menetelmä mittaa tietyn kohdegeenin määrää näytteessä, kun taas viljelymenetelmä mittaa mikrobin kasvua tietyissä olosuhteissa ja havaitsee vain kasvuun pystyvät mikrobit.

### 5.2 Spesifisyys ja herkkyys

Verifioitavan menetelmän spesifisyys ja herkkyys- eli sensitiivisyys määritetään suhteessa referenssimenetelmään. Sensitiivisyys voidaan laskea esimerkiksi qPCR-menetelmällä positiiviseksi osoitettujen näytteiden osuutena kaikista viljelyllä positiivisiksi osoitetusta näytteistä. Menetelmän spesifisyys voidaan laskea qPCR-menetelmällä negatiiviseksi osoitettujen näytteiden osuutena kaikista viljelyssä negatiivisiksi osoittautuneista näytteistä (Taulukko 1.). [4]

Taulukko 1. Tulosten yhtenevyyden vertailu. PA=positiivisten yhteensopivuus, PD= positiivinen poikkeama, ND=negatiivinen poikkeama, NA= negatiivinen yhteensopivuus.

	Referenssi menetelmä pos. (+/ )	Referenssi menetelmä neg. (-/ )
Verifioitava menetelmä pos. ( /+)	+/+ 24 (PA)	-/+ 2 (PD)
Verifioitava menetelmä neg. ( /-)	+/-0 (ND)	-/- 5 (NA)

Verifioitavan ja referenssi menetelmien positiivisista ja negatiivisista tuloksista (Taulukko 1.) lasketaan seuraavien kaavojen 2 ja 3 mukaan menetelmän herkkyys, spesifisyys ja tarkkuus [19].

$$\text{Suhteellinen herkkyys} = \frac{PA}{PA+ND} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Suhteellinen spesifisyys} = \frac{NA}{NA+PD} \times 100\% \quad (2)$$

Menetelmän laskettu suhteellinen herkkyys ja spesifisyys on esitetty Taulukossa 2.

Taulukko 2. Menetelmän herkkyys, spesifisyys ja tarkkuus.

Suhteellinen herkkyys %	Suhteellinen spesifisyys %
100	72

Valmistaja on validoinut kattavasti käytettävän kaupallisen kitin alukkeiden selektiivisyyden ja spesifisyyden ISO-standardin vaatimusten mukaan. Menetelmä on testattu 119 eri *Legionella*-kannalla, sekä 40 muulla mikrobilla, joista osa on lähisukua *Legionellalle*. Kaikista testatuista kannoista on saatu oikeat tulokset. Menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys oli valmistajan validoinnin perusteella 100%. [18]

### 5.3 Lineaarisuus

Lineaarisuuden avulla saadaan kuvattua kvantitatiivisen menetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia tutkittavan mikrobin pitoisuuteen. Standardisuora saadaan analysoimalla laimennossarjaeri pitoisia standardinäytettä, joiden kohdegeenin määrä tunnetaan. Suoran korrelaatiokertoimen- eli  $R^2$ -arvon on oltava mahdollisimman lähellä yhtä. [6.] Lineaarisuus on laskettu kahden erillisen qPCR-ajon standardisuorien keskiarvoina kahdella eri qPCR-laitteella ajettuna. Kvantitatiivisen PCR-menetelmän lineaarisuus on esitetty Taulukossa 3.

Taulukko 3. Menetelmän lineaarisuus

	<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila SG1</i>
Slope	-3,49	-3,61	-3,50
Monistustehokkuus (%)	93,50	89,00	93,50
R <sup>2</sup>	0,990	1,00	0,990
Y-intercept	38,425	39,675	41,025

Standardin ISO/TS 12869:2019 mukaan menetelmän standardisuoran slope-arvon on oltava -4,115:n ja -2,839:n välillä, monistustehokkuus 75–125 %. [18]

#### 5.4 Toistettavuus

Toistettavuus kuvaa menetelmän tulosten vaihtelua, kun samoja näytteitä analysoidaan useammalla rinnakkaisella samassa tai eri ajossa [6]. qPCR:n toistettavuusmäärittämisä varten sama henkilö analysoi näytteitä viidellä rinnakkaisella qPCR-reaktiolla aiemmin eristetyistä DNA-ututeista.

qPCR-menetelmän toistettavuus  $S_r$  laskettiin kaavalla 3 [19]:

$$S_r = \sqrt{(\sum(x - \bar{x})^2)/(n - 1)} \quad (3)$$

jossa  $x$  = tulos (log),  $\bar{x}$  = keskiarvo (log),  $n$  = tulosten lukumäärä.

Toistettavuus on hyväksyttävä, jos  $S_r$ -arvo on alle 0,15.[4]

Taulukko 4. Toistettavuus tulokset yhdellä näytteellä viidellä rinnakkaismäärittämisellä.

Näyte	Kohdegeeni	$S_r$	Tulosten lukumäärä
Laivavesi A	<i>Legionella pneumophila</i>	0,13	5
Laivavesi A	<i>Legionella SG1</i>	0,13	5
Laivavesi A	<i>Legionella spp.</i>	0,17	5

Luotettavien toistettavuusmääritys tuloksia varten tarvittaisiin ainakin neljä näytettä viidellä rinnakkaisella qPCR-reaktiolla aiemmin eristetystä DNA-ututeista [4]. Toistettavuusmäärityksessä (Taulukko 4.) on laskettu vain yhden luonnollisen vesinäytteen  $S_r$ -arvot jokaiselle kohdegeenille erikseen. *Legionella pneumophila* ja *Legionella SG1:n*  $S_r$ -arvot olivat alle 0,15, joka on hyväksyttävä. Kuitenkin *Legionella spp:n*  $S_r$ -arvo jäi hie-man yli sallitun arvon 0,15.

## 5.5 Oikeellisuus

Oikeellisuus määrittää menetelmälle mitattujen sekä oikeiden näytepitoisuuksien välisen eron. Menetelmän oikeellisuus varmistetaan ulkoisen vertailumittauksen osallistumisen kautta, mutta se ei osunut tämän opinnäytetyön aikatauluun. Oikeellisuusmääritys ulkoisen vertailumittauksen kautta tarvitaan ennen kuin menetelmä voidaan hyväksyä käyttöön laboratoriossa. [19]

## 5.6 Määritysrajat ja toteamisrajat

Menetelmä pystyy havaitsemaan myös määritysrajaa pienempiä pitoisuuksia, mutta saadut arvot eivät ole menetelmän lineaarisella mittausalueella. Kaavan 3 avulla voidaan laskea pitoisuudet myös näytteille, joiden pitoisuus on alle lineaarisen mittausalueen. qPCR-ajon tuloksista saadaan näytteille tulos yksikössä GU/reaktio, joka voidaan muuntaa yksikköön GU/100 ml laskemalla manuaalisesti seuraavan kaavan 4 avulla.[14]

$$tulos \left[ \frac{GU}{100 \text{ ml}} \right] = \frac{tulos \left[ \frac{GU}{reaktio} \right] \times eluutiotilavuus [\mu\text{l}] \times saantokerroin \times Y}{PCR \text{ reaktion tilavuus } [\mu\text{l}] \times näytteen tilavuus [ml]}, \text{ jossa} \quad (4)$$

PCR reaktion tilavuus = 25  $\mu\text{l}$

eluutiotilavuus = 125  $\mu\text{l}$

saantokerroin = 1000 $\mu\text{l}$  / 700  $\mu\text{l}$  Rinse Buffer = 1,44

Y= 100 ml

Jokaiselle kohdegeenille on laskettu toteamis- ja määrittäysraja. Teoreettisen toteamisrajan avulla määritetään pienin pitoisuus, joka voidaan luotettavasti analysoida. Määrittäysraja kertoo näytteen pitoisuusalarajan, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio [4]. Määrittäyksiä varten pienin standardiliuos (25 GU) laimennettiin suhteessa 1:10. Laimennettu standardiliuos ajettiin kolmella rinnakkaisella näytteellä. Tuloksista laskettiin jokaiselle kohdegeenille erikseen pitoisuus GU/100 ml kaavan 3 mukaan.

Toteamis- ja määrittäysraja lasketaan rinnakkaisten näytteiden keskiarvon ja keskihajonnan tulosten avulla [19]. Toteamisraja määritettiin laskemalla laimennetun standardiliuoksen keskiarvo kerrottuna kolme kertaa keskihajonnalla. Menetelmän määrittäysraja laskettiin laimennetun standardiliuoksen keskiarvo kerrottuna kuusi kertaa keskihajonnalla. Taulukossa 5 on esitetty jokaiselle kohdegeenille lasketut määrittäys- ja toteamisrajat.

Taulukko 5. Määrittäys- ja toteamisrajat kohdegeeneille qPCR-menetelmässä.

Kohdegeeni:	GU/100	GU/100ml		GU/100ml	
	ml				
Std 2,5 GU <i>Legionella spp.</i>	22	Keskiarvo	24	<b>Toteamisraja</b>	<b>57</b>
Std 2,5 GU <i>Legionella spp.</i>	36	Keskihajonta	11	<b>Määrittäysraja</b>	<b>90</b>
Std 2,5 GU <i>Legionella spp.</i>	14				
Std 2,5 GU <i>Legionella pneumo.</i>	22	Keskiarvo	19	<b>Toteamisraja</b>	<b>52</b>
Std 2,5 GU <i>Legionella pneumo.</i>	29	Keskihajonta	11	<b>Määrittäysraja</b>	<b>85</b>
Std 2,5 GU <i>Legionella pneumo</i>	7				
Std 2,5 GU <i>Legionella SG1</i>	22	Keskiarvo	19	<b>Toteamisraja</b>	<b>53</b>
Std 2,5 GU <i>Legionella SG1</i>	29	Keskihajonta	11	<b>Määrittäysraja</b>	<b>85</b>
Std 2,5 GU <i>Legionella SG1</i>	7				

Valmistaja on määrittänyt menetelmän määrittäysrajaksi vähintään 10 GU/reaktio. [18]

## 5.7 Mittausepävarmuus

Menetelmän mittausepävarmuus määritettiin tässä työssä SFS-EN ISO 19036:2019–standardin mukaisesti kullekin kohdegeenille erikseen.

Menetelmän tekninen epävarmuus  $U_{\text{tech}}$  määritettiin laboratorion sisäisen toistettavuuden keskihajontana ( $S_{\text{IR}}$ ) globaalin periaatteen mukaisesti, jolloin analysoidaan näytteitä mahdollisimman erilaisissa olosuhteissa.[20] Valituista näytteistä tehtiin 2-4 rinnakkaista määrittystä, joista oli rinnakkaisesti tehty DNA:n eristäminen sekä qPCR-ajo.

Mittausepävarmuutta menetelmissä aiheuttavat mm. näytteen esikäsittelyn sekä DNA-erityksen eri vaiheet. Myös PCR:n monistumiseen liittyvät ongelmat voivat vaikuttaa huomattavasti mittausepävarmuuteen. Mittausepävarmuutta aiheuttavia tekijöitä voidaan minimoimaan huolellisella työskentelyllä. [16]

Menetelmän kohdegeenien epävarmuudet  $U_{\text{tech}}$  laskettiin laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonnan laskukaavan avulla ja laajennettu tekninen epävarmuus laskettiin kertomalla tekninen epävarmuus  $S_{\text{IR}}$  kahdella. [20]

Laboratorion sisäisen toistettavuuden keskihajonta kaava on

$$S_{\text{IR}} = \frac{\sqrt{(\sum(x-\bar{x})^2)}}{(n-1)} \quad , \quad (5)$$

jossa lasketaan keskihajonta analyysituloksista ja jaetaan vapausasteella. [19]

Menetelmän mittausepävarmuuden määrittämiseen käytettiin 26 näytteen tuloksia, joista 16 oli laivavesiä ja 10 bakteerilla kontaminoituja vesinäytteitä. Menetelmän kohdegeenien mittausepävarmuuden ja laajennettu teknisen epävarmuuden tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa (Taulukko 6).

Taulukko 6. Menetelmän kohdegeenien mittausepävarmuudet.

Kohdegeeni	Tekninen epävarmuus ( $S_{IR}$ )	Laajennettu tekninen epävarmuus ( $k=2$ )
<i>Legionella spp.</i>	0,16	0,32
<i>Legionella pneumophila</i>	0,14	0,28
<i>Legionella pneumophila SG1</i>	0,15	0,30

Laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonnan ( $S_{IR}$ ) tulee olla alle 0,4 [19]. Saadut mittausepävarmuudet kaikille kohdegeeneille ovat hyväksyttäviä.

## 6 Tulosten tarkastelu

Verifiointiaineiston ja referenssimenetelmävertailun perusteella viljelymenetelmän ja kvantitatiivisen PCR-menetelmän välille löydettiin vastaavuus. Kaikkia verifiointin parametreja ei kuitenkaan voitu tutkia ajan puutteen ja vähäisen näytemäärän vuoksi. Menetelmää ei voida käyttöönottaa laboratoriossa ennen kuin menetelmän oikeellisuus on varmistettu ulkoisen vertailumittauksen avulla. Tämä määrittäminen jäi pois opinnäytetyöstäni aikataulun vuoksi.

Reaaliaikaisen multiplex qPCR-menetelmän avulla saadaan monistettua useita tutkittavia kohdegeenejä samaan aikaan. Multiplex-reaktiota suositellaan monien helpottavien tekijöiden takia mm. kontaminaatoriski pienenee, sillä näytekäsittelyä on vähemmän. Tulosten luotettavuutta parantaa se, että jokaisesta näytteestä monistetaan samassa reaktiossa myös sisäinen kontrolli. Tärkein tekijä on kuitenkin se, että eri kohdegeenien monistaminen samassa reaktioputkessa säästää aikaa ja vähentää laboratorion kuluja ja resursseja. qPCR-reaktiot tapahtuvat kuoppalevyllä, jossa kaikki reaktiot ovat yhdessä putkessa ja lämpötilaa säädellään qPCR laitteen lämpöblokin avulla.[21]

Reaaliaikaisessa PCR-analytiikassa laitteen ja reagenssien oikea toiminta on oleellista luotettavien tulosten saamiseksi. PCR-menetelmä on herkkä, joten kontaminaatoriskiä sekä laitteen ja menetelmän toimivuutta tarkkaillaan laadunvarmistustoimenpiteillä. qPCR:n toimivuuden ja tulosten luotettavuuden määrittämistä varten ajossa oli mukana useita kontrolleja. [13.]



Positiivisena kontrollina PCR-ajossa käytettiin kitin sisältämä standardi-DNA:ta. Negatiivisena kontrollina käytettiin PCR-vettä. Kontrollien tulosten perusteella voidaan saatuja tuloksia pitää onnistuneina ja luotettavina. PCR-analyysin aikana on oltava myös eristyskontrolli puhtauden laadunvarmistukseen. Eristyskontrolli eristetään saman aikaan varsinaisen näytteen kanssa. Eristyskontrolli on tehtävä jokaisella eristyskerralla. Eristyskontrollinäytteen tuloksen ollessa negatiivinen voidaan olettaa, ettei kontaminaatiota ole tapahtunut eristyksen eikä PCR-ajon aikana. Reagenssipakkaukset säilytettiin ohjeiden mukaisesti, ja kaikkien reagenssien päiväykset olivat asianmukaisesti voimassa. Kaikki eristyskontrollinäytteet pysyivät puhtaina, joten voidaan olla varmoja, ettei analysoituihin näytteisiin tullut DNA-eristyksen aikana kontaminaatioita. [1; 15]

Eristetty DNA voidaan myös pakastaa ennen varsinaista PCR-ajoa. Pakastus testattiin muutamalla rinnakkaisella näytteellä, eikä näytteiden pitoisuuksissa havaittu eroa pakastuksen jälkeen. *Legionella* standardissa oli maininta DNA:n pakastamisen mahdollisuudesta, mutta DNA:n pakastaminen täytyi standardin mukaan verifioida laboratoriossa kuitenkin erikseen. [15]. Mielenkiinnosta testattiin myös vesinäytesuodattimen pakastamista ennen DNA:n eristämistä, mutta DNA-pitoisuus pienenee huomattavasti pakastamisen takia. Tämän testauksen perusteella vaikuttaa siltä, etteivät Legionellat kestä suodattimen pakastamista, ja DNA-eristys tulee tehdä aina välittömästi näytteen suodatuksen jälkeen.

qPCR-analyysissä oli haasteita joidenkin näytematriisien takia, sillä osassa näytteistä oli havaittavissa näytematriisista johtuva inhibitio. Yksi näistä näytteistä oli laivavesi, jossa oli paljon ruosteen pigmenttiä. Tämä havaittiin DNA:n eristyksessä oranssina pellettinä, joka luultavasti häiritsi analysointia. Näytteet, joissa inhibitiota havaitaan, tulee analysoida PCR-menetelmällä uudelleen laimennetusta DNA-näytteestä.

Verifiointin laskuissa käytettiin myös tuloksia, jotka jäivät alle menetelmän määritysrajan. Nämä tulokset laskettiin manuaalisesti kaavan 3 avulla. Tuloksissa otettiin huomioon kuitenkin vain yli 3 GU/reaktio sisältäneet näytteet, koska todettiin että 2,5 GU sisältäneet standardiliuokset monistuivat luotettavasti. Myös kitin validointiraportissa valmistaja on maininnut, että menetelmän havaitsemisrajan tulisi olla vähintään 5 GU/reaktio [18]. Kaikkien näytteiden tulokset ovat näkyvissä liitteessä 1.

Menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys olivat verifiointin perusteella hyvät. Omat tulokset erosivat valmistajan ilmoittamista tuloksista, sillä valmistaja oli määrittänyt menetelmän spesifisyyden ja herkkyuden erilaisia mikrobikantoja käyttämällä, kun taas laboratorion verifiointissa verrattiin kahdella rinnakkaisella menetelmällä saatuja tuloksia keskenään. Lisäksi varsinaisten nollanäytteiden määrä analyysissä oli erittäin pieni, mikä alensi merkittävästi menetelmän suhteellista spesifisyyttä. Valmistajan validoinnin perusteella menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys oli 100%, kun taas verifiointin aikana saatiin sensitiivisyydelle tulokseksi 100 % ja spesifisyydelle 72 % (Taulukko 2).

Oikeellisuusmäärittystä ei ole suoritettu verifiointin aikana. Valmistaja on suorittanut oikeellisuusmäärittelyn ulkoisen vertailumittauksen avulla neljällä eri pitoisuudella. Oikeellisuusmäärittelyn tulokset olivat standardin ISO/TS12869:2019 mukaan hyväksytyjä.[18] Laboratorion tulee tehdä oikeellisuusmäärittely vielä ennen menetelmän käyttöönottoa.

Legionella-menetelmän standardissa (SFS-EN ISO 11731:2017) menetelmän sallittu monistustehokkuus on laaja 75-125%. Verifiointin aikana saatu monistustehokkuus menetelmälle oli noin 89-94%. Standardisuoran kulmakertoimeksi saatiin -3,50, mikä oli myös menetelmän validointiraportin sallimien arvojen -4,115 ja -2,839 välillä. [18]

Mittausepävarmuutta määritettäessä useampien henkilöiden olisi hyvä tehdä näytteitä rinnakkain, mikä ei onnistunut ajanpuutteen vuoksi. Koska näytteitä tulisi määrittää myös mahdollisimman erilaisissa oloissa, olisi hyvä vertailla myös esimerkiksi eri LOT:ien ja PCR-laitteiden aiheuttamia eroja. Verifiointin mittausepävarmuuden tulokset olivat standardin ISO/TS 12869:2019 mukaan hyväksytyjä [18; 19]

## 7 Johtopäätökset

Verifiointiaineiston ja menetelmävertailun perusteella viljelymenetelmä ja kvantitatiivinen PCR-menetelmä vastasivat hyvin toisiaan, vaikka ne lähtökohtaisesti mittaavatkin eri asioita. Kaikkia verifioinnin parametreja ei voitu tutkia näytteiden ja ajan rajallisuuden vuoksi. Menetelmää ei voida käyttöönottaa laboratoriossa ennen kuin menetelmän oikeellisuus on varmistettu ulkoisen vertailumittauksen avulla. Opinnäytetyöni tulokset voidaan kuitenkin hyödyntää laboratorion verifiointiraportissa, ja ottaa menetelmä käyttöön, kun menetelmän oikeellisuus on varmistettu.

Menetelmä tunnisti tehtyjen testien perusteella oikein testatut *Legionella*-suvun bakteerikannat. Vaikka menetelmässä on paljon vaiheita näytteen esikäsittelyssä, DNA:n eristämässä ja PCR:ssä, se on kuitenkin merkittävästi nopeampi viljelymenetelmään verrattuna. Tämä nopeuttaa tuloksien saamista ja *Legionellan* torjuntatoimenpiteisiin ryhtymistä huomattavasti.

Verifioitu kitti on hyvin helppokäyttöinen, ja onnistunutta PCR-ajoa voidaan seurata kontrollien avulla. Tuloslaskenta on nopeaa Bioteccon kehittämän taulukon avulla, johon riittää näytteiden ja kontrollien Cq-arvojen syöttäminen tulosten saamiseksi. Menetelmätodettiin toimivaksi analysoitujen parametrien tulosten perusteella. Näitä parametreja olivat mittausepävarmuus, määrittämissrajat, toistettavuus, lineaarisuus, spesifisyys ja herkkyys. Menetelmä voidaan ottaa käyttöön laboratoriossa, kun menetelmän oikeellisuus on saatu varmistettua.

## Lähteet

- 1 Microproof Legionella quantification LyoKit. Verkkoaineisto. Bioteccon Diagnostics. <<https://www.bc-diagnostics.com/products/kits/real-time-pcr/environmental/micro-proof-legionella-quantification-lyokit/>>. Luettu 1.9.2020.
- 2 Infektiotaudit ja rokotukset. Legionellan esiintyvyys Suomessa. Terveiden ja hyvinvoinninlaitos. Verkkoaineisto. <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-jarokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/legionella/legionellanesiintyvyys-suomessa>>. Päivitetty 8.6.2020. Luettu 1.10.2020.
- 3 EU:n uusi juomavesidirektiivi parantaa talousveden turvallisuutta. 2020. Verkkoaineisto. <[https://www.ymparisto.fi/fiFI/Vesi/EUn\\_uusi\\_juomavesidirektiivi\\_parantaa\\_ta\(54711\)](https://www.ymparisto.fi/fiFI/Vesi/EUn_uusi_juomavesidirektiivi_parantaa_ta(54711))>. Päivitetty 5.2.2020. Luettu 1.10.2020.
- 4 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy.
- 5 Legionella and the prevention of legionellosis. WHO. Verkkoaineisto. <[https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/legionella.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf)>. Luettu 1.10.2020.
- 6 SFS-EN ISO 11731:2017. Water quality. Enumeration of Legionella (ISO 11732:2017). Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.
- 7 Ympäristöterveys. Legionellabakteerit vesijärjestelmissä. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen verkkoaineisto. <<https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa>>. Päivitetty 22.6.2020. Luettu 1.10.2020.
- 8 Ympäristöterveys. Legionellabakteerit vesijärjestelmissä. Legionellan kasvuun vaikuttavat tekijät. <<https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa/legionellan-kasvuun-vaikuttavat-tekijat>>. Päivitetty 22.6.2020. Luettu 1.10.2020.
- 9 Lumio, J. Legioonalaistauti. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto. Verkkoaineisto. <[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00580](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00580)>. Päivitetty 15.11.2019. Luettu 1.9.2020.
- 10 Liisa Maunuksela; Titta Berlin; Marja Lehtolainen; Merja Torniainen; Jaana Kusnetsov; Pia Räsänen; Piia Airaksinen. 31.8.2020. THL&Ruokavirasto. Legionellabakteerien esiintyminen kiertotaloustuotteissa.

- 11 Ympäristöterveys. Ympäristöterveys vesijärjestelmissä. Legionellaa koskeva lainsäädäntö ja ohjeistus. <<https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/legionellabakteerit-vesijarjestelmissa/legionellaa-koskeva-lainsaadanto-ja-ohjeistus>>. Päivitetty 8.9.2020. Luettu 1.10.2020.
- 12 Bio-Rad Applications Guide: Real-Time PCR Applications Guide. Verkkoaineisto. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>>. Luettu 2.11.2020.
- 13 Thermo Fisher Scientific: Efficiency of Real-Time PCR. Verkkoaineisto. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html>>. Luettu 1.10.2020.
- 14 Legionella Quantification LyoKit Produkt manual. 2020. Bioteccon Diagnostics.
- 15 StarPrep Two Kit Legionella manual. 2018. Bioteccon Diagnostics. S 400 08.1.
- 16 D reagent Manual, Bioteccon Diagnostics. 2016. A 500 02.
- 17 Legionella Quantification LyoKit, Quick Guide. 2020. Bioteccon Diagnostics. R602 45-1.
- 18 Legionella Quantification LyoKit Validation Data Report. 2019. Bioteccon Diagnostics.
- 19 SFS-EN ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain. Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.
- 20 Mittausepävarmuuslaskuri mikrobiologisille määrittäyksille. Ruokavirasto. Verkkoaineisto. <<https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriot/ohjeita-laboratorioille/menetelma--toiminta--ja-tyoohjeet/>>. Päivitetty 1.12.2020. Luettu 1.12.2020.
- 21 Bio-Rad Applications Guide: Principles and Uses of Multiplex PCR. Verkkoaineisto. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>>. Luettu 2.11.2020.

## Näytteiden tulokset

Näyte	Näytteen tilavuus (ml)	Tulokset Legionella spp		Tulokset Legionella pneumophila		Tulokset Legionella pneumophila Seroryhmä 1		SrarPrep Two Method
		[GU/reaktio]	[GU/100ml]	[GU/reaktio]	[GU/100ml]	[GU/reaktio]	[GU/100ml]	
Laivavesi A	10	1	72 *	ei havaittu		ei havaittu		A
Laivavesi A 1.	100	694	5000	358	2600	358	2600	A
Laivavesi A 1. 2.	100	1120	8000	628	4500	628	4500	A
Laivavesi A 1. 3.	100	415	3000	391	2800	379	2700	A
Laivavesi A 1. 4.	100	477	3400	397	2800	397	2800	A
Laivavesi A 1. 5.	100	474	3400	282	2000	282	2000	A
Laivavesi B 1.	100	68	490	3	21*	ei havaittu		A
Laivavesi B 2.	100	134	960	6	43*	ei havaittu		A
Laivavesi C 1.	100	122	870	2	14*	ei havaittu		A
Laivavesi C 2.	100	99	710	1	7*	ei havaittu		A
Laivavesi D 1.	100	159	1100	4	28*	ei havaittu		A
Laivavesi D 2.	100	168	1200	4	28*	ei havaittu		A
Laivavesi E 1.	100	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	A
Laivavesi E 2.	100	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	A
Laivavesi E 1. 2	100	292	2100	36	260	ei havaittu		A
Laivavesi E 2. 2	100	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	A
Laivavesi F 1.	200	1632	5800	6	21*	ei havaittu		A
Laivavesi F 2.	200	886	3200	4	14*	ei havaittu		A
Laivavesi G 1.	50	234	3300	2	28*	2	28*	A
Laivavesi G 2.	50	96	1400	2	28*	2	28*	A
Laivavesi H 1.	50	238	3400	1	14*	1	14*	A
Laivavesi H 2.	50	181	2600	1	14*	1	14*	A
Laivavesi I 1.	50	279	4000	3	43*	3	43*	A
Laivavesi I 2.	50	332	4700	3	43*	3	43*	A
Laivavesi J 1.	50	232	3300	2	28*	2	28*	A
Laivavesi J 2.	50	129	1800	2	28*	2	28*	A
Laivavesi K	100	280	2000	ei havaittu		ei havaittu		A
Laivavesi L	100	584	4200	ei havaittu		ei havaittu		A
Laivavesi M	100	443	3200	4	28*	ei havaittu		A
Vesinäyte N	50	2	28*	ei havaittu		ei havaittu		A
Vesinäyte O 1.	100	16	115*	ei havaittu		ei havaittu		A
Vesinäyte O 2.	100	23	165*	ei havaittu		ei havaittu		A
Ympäri A	50	raja-arvon yli		raja-arvon yli		ei havaittu		A

Ymppi B 1.	50	56	800	3	43*	ei havaittu		A
Ymppi B 2.	50	61	870	3	43*	ei havaittu		A
Ymppi B 3.	100	47	340	1	7*	ei havaittu		A
Ymppi B 4.	100	45	320	4	28*	ei havaittu		A
Ymppi B 5. suod. Pak.	50	5	72*	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi B 6. suod. pak.	100	13	93*	1	7*	ei havaittu		A
Ymppi C 1.	50	364	5200	2	28*	2	28*	A
Ymppi C 2.	50	776	11000	ei havaittu		3	43*	A
Ymppi C 3.	100	1441	10000	2	14*	2	14*	A
Ymppi C 4.	100	1218	8700	2	14*	2	14*	A
Ymppi C 5. suod. Pak.	50	131	1900	ei havaittu				A
Ymppi C 6. suod. pak.	100	573	4100	1	7*	ei havaittu		A
Ymppi D 1.	50	5	72*	5	72*	5	72*	A
Ymppi D 2.	50	8	115*	1	14*	ei havaittu		A
Ymppi E 1.	100	460	3300	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi E 2.	100	300	2100	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi E 3.	100	250	1800	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi F 1.	100	57	410	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi F 2.	100	66	470	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi F 3.	100	44	320	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi G 1.	100	63	450	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi G 2.	100	37	270	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi G 3.	100	26	190	ei havaittu		ei havaittu		A
Ymppi H 1.	100	285	2000	285	2000	285	2000	A
Ymppi H 2.	100	399	2900	399	2900	399	2900	A
Ymppi H 3.	100	652	4700	652	4700	652	4700	A
Ymppi I 1.	100	91	650	73	520	61	440	A
Ymppi I 2.	100	74	530	66	470	58	420	A
Ymppi I 3.	100	63	450	49	350	48	340	A
Ymppi J 1.	100	27	190	5	36*	5	36*	A
Ymppi J 2.	100	32	230	3	21*	3	21*	A
Ymppi J 3.	100	44	320	7	50*	7	50*	A

\* Tulokset jäivät alle määräysrajan, mutta laskettiin kaavan 3. avulla pitoisuus.

Näyte	Näytteen tilavuus (ml)	Tulokset Legionella spp		Tulokset Legionella pneumophila		Tulokset Legionella pneumophila Seroryhmä 1		SrarPrep Two Method
		[GU/reaktio]	[GU/100ml]	[GU/reaktio]	[GU/100ml]	[GU/reaktio]	[GU/100ml]	
Laivavesi A	0,7	25	18000	22	15700 *	22	15700 *	B
Laivavesi B 3.	0,7	3	3085*	ei havaittu		ei havaittu		B
Laivavesi B 4.	0,7	4	4114*	ei havaittu		ei havaittu		B
Laivavesi C 3.	0,7	3	3085*	ei havaittu		ei havaittu		B
Laivavesi C 4.	0,7	4	4114*	4	4114	ei havaittu		B
Laivavesi D 3.	0,7	3	3085*	ei havaittu		ei havaittu		B
Laivavesi D 4.	0,7	5	5140*	ei havaittu		ei havaittu		B
Laivavesi E 3.	0,7	10	10285	1	1028	ei havaittu		B
Laivavesi E 4.	0,7	8	8228	ei havaittu		ei havaittu		B
Ymppi A 10 <sup>-3</sup> 1.	0,7	124	89000	124	89000	ei havaittu		B
Ymppi A 10 <sup>-3</sup> 2.	0,7	125	89000	125	89000	ei havaittu		B
Ymppi A 10 <sup>-4</sup>	0,7	15	15429*	15	15430	ei havaittu		B
Ymppi A 10 <sup>-5</sup>	0,7	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	PCR inhibitio	B

\* Tulokset jäivät alle määritysrajan, mutta laskettiin kaavan 3. avulla pitoisuus.