

Anna Borisov

Tanja Immonen

**MYCOPLASMA PNEUMONIAE -SPESIFISTEN IgG-LUOKAN VASTA-AINEIDEN
MÄÄRITYS NON-KOMPETITIIVISELLA ELISA-MENETELMÄLLÄ**

Soveltuvuuden arviointi ja työohjeen luominen mikrobiologian syventävälle kurssille

MYCOPLASMA PNEUMONIAE -SPESIFISTEN IgG-LUOKAN VASTA-AINEIDEN MÄÄRITYS NON-KOMPETITIIVISELLÄ ELISA-MENETELMÄLLÄ

Soveltuvuuden arviointi ja työohjeen luominen mikrobiologian syventävälle kurssille

Anna Borisov ja Tanja Immonen
Opinnäytetyö
Syksy 2012
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä(t): Tanja Immonen ja Anna Borisov

Opinnäytetyön nimi: *Mycoplasma pneumoniae* -spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden määrittäminen non-kompetitiivisella ELISA-menetelmällä, soveltuvuuden arviointi ja työohjeen luominen mikrobiologian syventävälle kurssille.

Työn ohjaaja(t): Paula Reponen, Irja Parkkinen, Juho Tervonen ja Timo Jokela

Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: Syksy 2012

Sivumäärä: 31 + 2 liitesivua

Opinnäytetyömme aiheena oli *Mycoplasma pneumoniae* -spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden määrittäminen non-kompetitiivisella ELISA-menetelmällä. ELISA-menetelmä perustuu antigeenin, spesifisen vasta-aineen sekä kaksoisvasta-aineen väliseen sitoutumiseen toisiinsa. Opinnäytetyömme tavoitteena oli arvioida määrittämyksen soveltuvuutta Oulun seudun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian syventävän kurssin harjoitustyöksi sekä laatia määrittäystä varten työohje.

Syventävällä mikrobiologian kurssilla opiskelijoiden osaamistavoitteina on syventää ja laajentaa osaamistaan muun muassa bakteriologiassa sekä perehtyä mikrobiologian laboratoriotutkimuksiin. Kurssin sisältö vaihtelee ajankohtaisten teemojen mukaan. *Mycoplasma pneumoniae* aiheuttamat hengitystieinfektiot ovat yleistyneet huomattavasti muutamien viime vuosien aikana, mikä olikin yksi tärkeimmistä kriteereistä opinnäytetyömme aihetta valittaessa.

Opinnäytetyömme aineisto koostui Savyons LTD Oy:n valmistamasta kitistä, joka sisälsi määrittäystä varten tarvittavat reagenssit, kontrollit, standardit ja kuoppalevyn. Määrittäystä varten saimme positiivisiksi varmistettuja, muutaman vuoden vanhoja potilasnäytteitä Oulun yliopistollisen sairaalan mikrobiologian laboratorion.

Määrittämyksessä saadut tulokset poikkesivat olettamuksestamme; mikrobiologian laitokselta saamamme potilasnäytteet jäivät määrittämyksessä negatiivisiksi. Kitin ohjeessa annetut kriteerit kuitenkin täyttyivät, joten voimme olettaa kitin toimineen luotettavasti. Johtopäätöksemme oli, että pitkäaikainen säilytys oli saattanut laskea potilasseerumeiden vasta-ainepitoisuudet kitin mittaustarkkuuden ulkopuolelle. Lisäksi mikrobiologian laboratorion käyttämä määrittämysmenetelmä on saattanut olla meidän käyttämäämme määrittämysmenetelmää herkempi. Potilaiden yksityisyysuojan vuoksi emme kyenneet enää jäljittämään näytteiden alkuperää ja määrittämysmenetelmää mikrobiologian laitoksen tietokannasta.

Määrittämysmenetelmä toimi luotettavasti, vaikka potilasnäytteet jäivät negatiivisiksi. Mielestämme *Mycoplasma pneumoniae* -spesifisten vasta-aineiden määrittäminen non-kompetitiivisella ELISA-menetelmällä soveltuu erittäin hyvin mikrobiologian syventävälle kurssille, koska työn suorittaminen on mahdollista annetussa aikarajassa. Myöskään kitin rajallinen säilyvyys ja hinta ei aiheuta ongelmia, koska kaikki kuoppalevyt tulevat käytetyiksi yhden harjoitustyön aikana. Suosittelemme kuitenkin käyttämään jatkossa tuoreita potilasnäytteitä.

Asiasanat: *Mycoplasma pneumoniae*, ELISA, mikrobiologia, harjoitustyö

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

Author(s): Tanja Immonen ja Anna Borisov

Title of thesis: Specific *Mycoplasma pneumonia* IgG-class antibody detection by using non-competitive ELISA-method, evaluation of suitability for microbiology specialisation course and producing working instructions

Supervisor(s): Paula Reponen, Irja Parkkinen, Juho Tervonen and Timo Jokela

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2012

Number of pages: 31 + 2 appendices

Our thesis project was to detect *Mycoplasma pneumonia* specific IgG-class antibodies by using the non-competitive ELISA-method. The ELISA-method is based on the binding of antigen and antibodies. Our thesis project was commissioned by Oulu University of Applied Sciences, Biomedical Laboratory Science Degree Programme. We evaluated the detection suitability as a practical rehearsal for microbiology specialisation course and produced working instructions.

In the microbiology specialisation course one of the students learning aims is to improve their knowledge about microbiology detection methods and bacteriology. The course content is changed by current themes. *Mycoplasma pneumoniae* has caused a severe number of airway infections in the last few years. That was the main reason why we chose this topic for our thesis.

Biomedical Laboratory Science Degree Programme bought the test kit for the detection from a company called Savyons Diagnostics LTD Oy. Test kit included reagents, controls, standards and *M.pneumoniae* antigen coated microtiter plate. We also received positive patient samples that were a few years old from the microbiology laboratory of Oulu university hospital.

The results were not what we had hypothesized; the positive patient samples became negative. But we can be sure that the results were reliable because all the detection criteria were acquired. Our conclusion was that the preservation of the patient samples had probably affected the antibody concentration. Also the detection method in the microbiology laboratory might have been different than ours. We can not be sure of that because we deleted the patient information.

The detection was reliable even though the results were negative. We think that this detection is a good practical rehearsal for the microbiology specialisation course. The detection can be made in the time limit and the kit remains in good condition as long as needed. The price is not a problem, because the kit will be used in one practical course.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, ELISA, microbiology, practical rehearsal

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	PROJEKTIN SUUNNITTELU	7
3	PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT	9
4	MYCOPLASMA PNEUMONIAE	10
4.1	Tartuntatie ja patogeneesi.....	10
4.2	Oireet ja taudinkuvat.....	11
4.3	Epidemiologia	12
4.4	Diagnosointi	12
4.5	Antibiottihoido	13
5	ELISA-MENETELMÄ (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	14
5.1	Kompetitiivinen ELISA-menetelmä.....	15
5.2	Non-kompetitiivinen ELISA-menetelmä	16
6	HARJOITUSTYÖN TESTAUS	17
6.1	Työvaiheet	17
7	TULOKSET	20
7.1	Vasta-ainemäärityksen tulokset ja luotettavuus	20
7.2	Määrityksen luotettavuus ja tulosten arviointia.....	21
7.3	Harjoitustyön soveltuvuus Mikrobiologia II -kurssille	23
7.4	Työohjeen luominen.....	25
8	POHDINTA	27
	LÄHTEET	29
	LIITTEET	31

1 JOHDANTO

Opinnäytetyömme aiheena oli *Mycoplasma pneumoniae* -bakteerin spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden määrittäminen non-kompetitiivisella ELISA- eli enzyme linked immunosorbent assay -menetelmällä. Tarkoituksenamme oli arvioida määrittämyksen soveltuvuutta mikrobiologian syventävälle kurssille ja laatia sille työohje. Saimme aiheemme Oulun seudun ammattikorkeakoulun, bioanalytiikan koulutusohjelman opettaja Irja Parkkiselta sekä lehtori Paula Reposelta. Aiheen taustalla oli tarve saada Oulun seudun ammattikorkeakoulun järjestämälle mikrobiologian syventävälle kurssille uusi harjoitustyö ja työohje opiskelijoiden käytettäväksi. *Mycoplasma pneumoniae* sopii harjoitustyöhön ajankohtaisuutensa vuoksi, sillä mykoplasmainfektioiden määrä on lisääntynyt merkittävästi viime vuosien aikana.

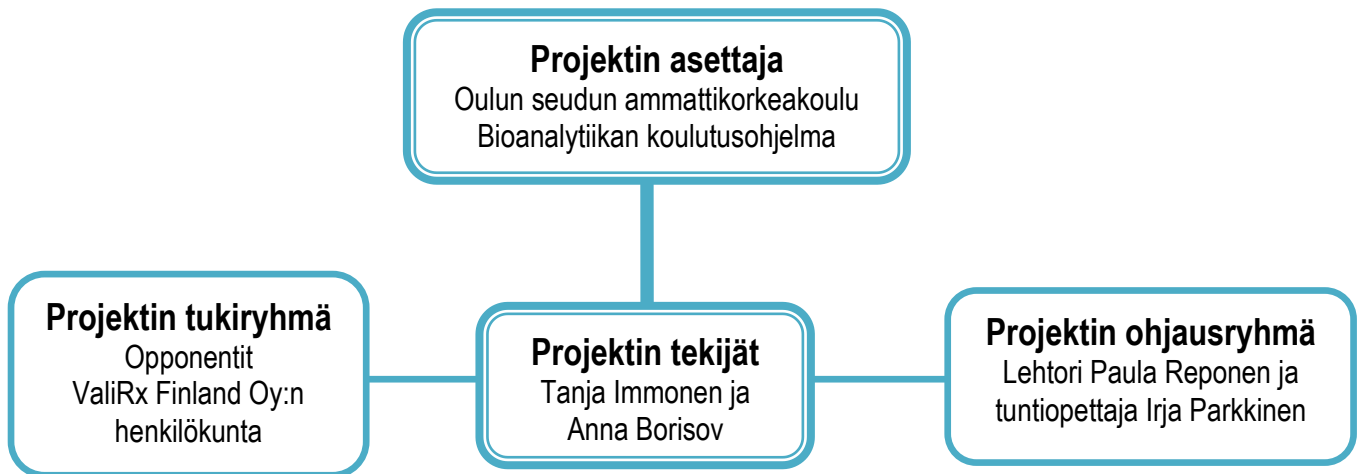
Ammattikorkeakoulujen toiminnassa korostuu työelämälähtöisyys ja alueellinen kehittäminen. Ammattikorkeakoulujen tarkoituksena on kouluttaa opiskelijoista ammattilaisia, jotka vastaavat työelämän tarpeisiin ja kehittävät sen toimintaa. (Opetus- ja kulttuuriministeriö, hakupäivä 4.9.2012) Bioanalyytikon työssä erilaisten analysointimenetelmien tunteminen ja niiden soveltaminen laboratorion eri osa-alueille on olennainen osa ammattitaitoa. Kattavat ja ajantasaiset työohjeet kuuluvat osaltaan laadukkaaseen laboratoriotyöskentelyyn, ja niiden laatiminen kuuluu myös bioanalyytikon toimenkuvaan. Mikrobiologia on yksi bioanalyytikon toiminta-alueista. Käytimme opinnäytetyössämme immunologista määrittystä, vaikka aiheemme liittyikin pääasiassa mikrobiologiaan. Tämä johtui siitä, että immunologiaan perustuvat vasta-ainemääritykset ovat yleisimpiä analysointikeinoja tutkittaessa uusia ja jo sairastettuja tauteja.

Oppimistavoitteitamme projektin aikana olivat projektityöskentely ja siinä vaadittavat taidot, määrittämyksen perehtyminen, organisointitaidot sekä laadukkaasti harjoitustyön kriteereihin perehtyminen. Tavoitteenamme oli myös oppia käyttämään Viktor-analysointia ja luoda sille määrittäystä varten tarvittava käyttöohje. Harjoitustyövaihtoehdon tarjoaminen mikrobiologian syventävän kurssille, yksityiskohtaisen harjoitustyöohjeen laatiminen ja niiden käyttäminen opetuksessa olivat toiminnallisia tavoitteitamme.

2 PROJEKTIN SUUNNITTELU

Yleisesti projekti tarkoittaa ehdotusta tai suunnitelmaa. Projektin lopputuloksena voi syntyä erilaisia tuotteita tai ratkaisuja ongelmiin. Projekti sisältää useita erilaisia vaiheita projektin suunnittelusta projektin päättymiseen (Ruuska 2007, 18–20). Opinnäytetyöprojektimme käynnistyi aiheen valinnalla. Aiheen saimme Oulun seudun ammattikorkeakoululta, lehtori Paula Reposelta sekä tuntiopettaja Irja Parkkiselta. Opinnäytetyömme aiheena oli arvioida *Mycoplasma pneumoniae* -IgG-luokan vasta-ainemäärityksen soveltuvuutta harjoitustyöksi mikrobiologian syventävälle kurssille ja laatia sille yksityiskohtainen työohje. Aiheen valinnan jälkeen perehdyimme valmistavissa seminaareissa opinnäytetyöhömmme liittyviin aiheisiin, kuten *Mycoplasma pneumoniae* -bakteeriin, ELISA-määritysmenetelmään ja käyttämämme kitin toimintaperiaatteeseen. Projektimme etenemiseen sisältyi myös tutkimussuunnitelman teko. Tutkimussuunnitelmamme sisälsi suunnitelman opinnäytetyöprojektimme etenemisestä ja siihen liittyvistä yksityiskohdista. Analyttinen työvaihe laboratoriossa toteutettiin tutkimussuunnitelman palauttamisen jälkeen, jolloin teimme vasta-ainemäärityksen ja loimme alustavan työohjeen.

Projektilla tarkoitetaan ihmisjoukkoa, joka on luotu tilapäisesti jonkin tehtävän suorittamista varten. Projektiorganisaation tehtävänä on suorittaa annettu tehtävä ja saattaa se päätökseen annetuissa resursseissa. Projektiorganisaatiomme muodostuu projektin asettajasta, projektiryhmästä, ohjausryhmästä ja tukiryhmästä. (Ruuska 2007, 19, 21–22). Projektimme asettaja oli Oulun seudun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveysalan yksikkö, bioanalytiikan koulutusohjelma. Projektiryhmä muodostui projektin tekijöistä (Anna Borisov ja Tanja Immonen). Ohjausryhmään kuuluivat ohjaavat opettajamme lehtori Paula Reponen ja tuntiopettaja Irja Parkkinen. ValiRX Finland Oy:n henkilökunta OAMK:n toimipisteessä ja työmme opponentteina toimivat bioanalytiikan opiskelijat sekä opiskeluryhmämme bio9 muodostivat projektimme tukiryhmän.



KUVIO 1. Organisaatiokaavio.

Projektitehtävät määrittivät opinnäytetyömme tarkoitusta ja tavoitteita. Opinnäytetyöprojektimme ideointi jatkui koko prosessin ajan, vaikka projektitehtävämme pysyivätkin koko ajan samoina. Opinnäytetyötä tehdessämme pohdimme vastauksia projektitehtäviimme, joita ovat:

1. Soveltuuko määritys mikrobiologian syventävän kurssin harjoitustyöksi?
2. Toimiiko käyttämämme määritysmenetelmä luotettavasti?
3. Onko työhjeemme laadukas ja työelämälähtöinen?

3 PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT

Bioanalyytikon suurimpia työllistäjiä ovat terveysasemien ja sairaaloiden laboratoriot. Heidän keskeisimpiin tehtäviinsä kuuluvat muun muassa näytteiden analysointi ja tulosten arviointi sekä laboratoriotoinnin kehittäminen ja tutkimustulosten luotettavuuden varmistaminen opettamalla ja ohjaamalla muuta henkilökuntaa. Laboratoriot ottavat tutkimusvalikoimiinsa uusia tutkimuksia ja tutkimusmenetelmiä epidemioiden ilmaantuessa. Uusien työohjeiden laadinta ja niiden soveltaminen käytäntöön kuuluvat tärkeänä osana bioanalyytikon työnkuvaan. Bioanalyytikon opintojen tarkoituksena onkin opettaa ymmärtämään laboratoriotutkimusten ja tutkimusmenetelmien kehittämisen merkitys väestön terveyden edistämässä. (OAMK:n internetsivut, 2012, hakupäivä 30.05.2012)

Oulun seudun ammattikorkeakoulun, bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian syventävän kurssin tavoitteisiin kuuluvat osaamisen syventäminen ja laajentaminen muun muassa bakteriologiassa. Kurssin sisältöön kuuluvat myös erilaiset laboratoriotutkimukset, esimerkiksi molekyylibiologiset menetelmät ja niiden käyttö kliinisessä mikrobiologiassa. Kurssin sisältöön kuuluu myös ajankohtaisten teemojen käsittely. (OAMK:n internetsivut, 2012, hakupäivä 30.05.2012)

Projektissa testaamaamme harjoitustyötä ja lopputuotteena syntyvää työohjetta tulevat käyttämään pääasiassa kolmannen vuosikurssin bioanalytiikan opiskelijat. Kolmantena opiskeluvuonna opiskelijoiden tulee valita opintoihinsa syventäviä kursseja, joista mikrobiologia on yksi vaihtoehto. Mikrobiologian syventävän kurssin sisältöön kuuluu harjoitustyön tekeminen. Tarkoituksenamme oli tarjota harjoitustyövaihtoehto, joka on ajankohtainen *Mycoplasma pneumoniae* -infektioiden yleistymisen vuoksi. Voidaan olettaa, että kolmannen vuosikurssin opiskelijoilla on perustiedot hallinnassa, jolloin liian yksinkertainen harjoitustyö ei edistä heidän oppimistaan ja ammatillista kasvuaan.

4 MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Mykoplasmat ovat luonnossa ja eläimillä sekä ihmisellä tavattavia pieniä, soluseinättömiä bakteereita. (Korppi & Kleemola 2010, 263). Ne kuuluvat *Mollicutes* -luokkaan, johon kuuluvilta mikrobeilta puuttuu soluseinämän peptidoglykaania syntetisoivat geenit. Koska mykoplasmoilla ei ole soluseinämää, ne eivät värjäydy Gram-värjäyksessä vaikka ovatkin sukua muinaisille Gram-positiivisille bakteereille. (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008) Mykoplasmoista tärkeimpänä ihmispatogeeninä pidetään *Mycoplasma pneumoniae*, joka aiheuttaa hengitystieinfektioita etenkin koululaisilla ja nuorilla aikuisilla. Tunnetuin *M. pneumoniae* aiheuttama sairaus on keuhkokuume, mutta *M. pneumoniae* aiheuttaa myös muunlaisia taudinkuvia. (Korppi & Kleemola 2010, 263–264)

4.1 Tartuntatie ja patogeenesi

Mycoplasma pneumoniae leviää pisaratartuntana, ja infektion itämisaika on noin 2–4 viikkoa. (Korppi & Kleemola 2010, 265) Mykoplasmainfektioita sairastavat kantavat mikrobia lähengitysteissään, ja yskiminen edistää tartunnan leviämistä. (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008)

Ensimmäinen askel infektion etenemisessä on tarttuminen hengitysteiden epiteeliin. *M. pneumoniae* rakenteessa on erityinen kärkiosa, jonka sisältämien tartuntaproteiinien, kuten P1-proteiinin avulla *M. pneumoniae* kiinnittyy hengitysteiden epiteelin värekarvoihin. Nämä proteiinit ovat tärkeitä *M. pneumoniae* taudinaiheuttamiskyvylle, ja niiden puuttuminen tekee mykoplasman avirulentiksi eli kyvyttömäksi aiheuttamaan tautia. Tunkeutuminen isäntäsolun sisään ei ole välttämätöntä infektion syntymiseksi, koska jo läheinen kontakti *M. pneumoniae* ja isäntäsolun välillä riittää aiheuttamaan vaurioita kohdekudoksiin (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008.) Tärkeimpinä patogeenesin tekijöinä pidetään hengitysepiteelin värekarvojen toiminnan estymistä ja *M. pneumoniae* isäntäsolulle aiheuttamaa oksidatiivista stressiä. Oksidatiivisessa stressissä on kyse vetyperoksidin ja vapaiden happiradikaalien muodostumisesta. (Korppi & Kleemola 2010, 263)

4.2 Oireet ja taudinkuvat

M. pneumoniae aiheuttamat infektiot ovat tavallisimmin hengitystieinfektioita. Lievimpänä *M. pneumoniae* aiheuttamat hengitystieinfektiot ilmenevät muun muassa nuhana, yskänä, kurkkukipuna, päänsärkynä ja kuumeena, jotka usein paranevat itsestään. Myös oireettomat infektiot ovat mahdollisia. Tunnetuin *M. pneumoniae* aiheuttama tauti on kuitenkin keuhkokuume, jonka osuus kaikista keuhkokuumeetapauksista on noin 15–20%. Useimmiten *M. pneumoniae* aiheuttama keuhkokuume alkaa hitaasti ylähengitysteiden oireista edeten yskäksi, kuumeeksi ja lihassäryiksi. Yskä voi pitkittyä, ja täydellinen toipuminen voi viedä jopa muutaman kuukauden. *M. pneumoniaella* on osuutensa myös pikkulasten ahtauttavissa keuhkoputken tulehduksissa sekä nuorten astman pahenemisvaiheissa (Korppi & Kleemola 2010, 264)

Hengitystieinfektioiden ohella *M. pneumoniae* voi aiheuttaa myös muunlaisia taudinkuvia. Iho- ja limakalvo-oireet ovat yleisiä, sillä jopa viidenneksellä *M. pneumoniae* -infektiota sairastavista ilmenee iho-oireita, muun muassa erythema multiforme -ihottumaa tai Stevens-Johnsonin oireyhtymää (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008.) Iho-oireiden ohella myös lihas- ja nivelkivut ovat mahdollisia, ja vatsakipua ja pahoinvointia voi esiintyä etenkin lapsilla. *M. pneumoniae* aiheuttamien neurologisten taudinkuvien, muun muassa meningiitin ja enkefaliitin yleisyydeksi arvellaan muutamaa prosenttia kaikista mykoplasmatapauksista. *M. pneumoniae* voi aiheuttaa myös sydänlihaksen tai sydänpussin tulehdusta, ja kylmäagglutiniineista johtuvaa suonensisäistä hemolyysiä. Tällaisten infektioiden kohdalla mikrobiologinen diagnostiikka on kuitenkin haastavaa, joten tarkkoja lukuja niiden esiintyvyydestä ei ole saatavilla. (Korppi & Kleemola 2010, 264)

Tyypillisimpiä *M. pneumoniae* aiheuttamat infektiot ovat lapsilla ja nuorilla, vaikka infektiota esiintyykin kaikissa ikäryhmissä (Korppi & Kleemola 2010, 265) Terveyden- ja hyvinvoinnin laitoksen raportin mukaan mykoplasmainfektiot vuosina 1995-2009 olivat runsaimmillaan ikäryhmissä 10–14-vuotiaat sekä 5–9 - ja 15–19-vuotiaat (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos raportti 17/2010 Tartuntataudit Suomessa 1995-2009.) Myös vuoden 2010 mykoplasmainfektioista suurin osa todettiin 5–19-vuotiailla (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos raportti 17/2011 Tartuntataudit Suomessa 2010.)

4.3 Epidemiologia

Mykoplasmainfektion syntyyn vaikuttaa sekä kohdejoukon ikä että epidemiologinen tilanne (Korppi & Kleemola 2010, 265) Tyypillisesti *M. pneumoniae* aiheuttamat infektiot ilmenevät maanlaajuisina epidemioina muutaman vuoden välein. Kuitenkin infektiota esiintyy myös epidemioiden väliaikoina, ja pienemmät paikalliset epidemiat esimerkiksi varuskunnissa ja kouluissa ovat mahdollisia. THL:n Tartuntataudit Suomessa 1995–2009 raportin mukaan vuosina 1995–2009 epidemiat ovat alkaneet aina syksyllä jatkuen vuodenvaihteen yli ja hiipuneen keväällä, mutta kaikkina seurantavuosina *M. pneumoniae* aiheuttamia infektiota on kuitenkin ollut joka kuukausi jonkin verran. (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos raportti 17/2010 Tartuntataudit Suomessa 1995–2009).

4.4 Diagnosointi

M. pneumoniae aiheuttamia infektiota ei voida diagnosoida pelkästään kliinisten löydösten perusteella. (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008.) Mykoplasmainfektiot eivät useinkaan aiheuta juuri mykoplasmaalle spesifisiä oireita, vaan oireet muistuttavat muidenkin mikrobien, etenkin virusten aiheuttamia infektiota. Tavallisista laboratoriotutkimuksista ei useinkaan ole apua mykoplasmainfektion diagnostiikassa, sillä esimerkiksi CRP- ja veren leukosyyttiarvojen perusteella sitä ei voi erottaa muusta virus- tai bakteerikeuhkokuumeesta. Toisaalta sekainfektiot muiden bakteerien sekä virusten kanssa ovat yleisiä (Korppi & Kleemola 2010, 265–266)

Suomessa mykoplasmainfektioita raportoitiin yli 1200 kappaletta vuonna 2009. Lähes kaikki näistä tapauksista diagnosoitiin immunologisesti eli vasta-ainetutkimuksen avulla: vain 1 diagnooseista perustui viljelyyn ja 21 PCR:ään. (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos raportti 17/2010 Tartuntataudit Suomessa 1995–2009.) Vaikka bakteerien viljely onkin yleisin tunnistusmenetelmä bakteriologisessa laboratoriossa, se ei sovellu käytettäväksi *M. pneumoniae* tutkimiseen. Suomessa mykoplasma viljelyä tehdään vain muutamassa laboratoriossa sen vaativuuden vuoksi. (Korppi & Kleemola 2010, 266) *M. pneumoniae* vaatii oman erityisen kasvualustan kasvaakseen laboratorio-olosuhteissa. Viljely kestää viikosta kolmeen viikkoon, ja onnistuu vain noin 40–90% tapauksista. (Gilbert-Barness & Barness 2010.) Toisaalta viljely on standardoitu referenssimenetelmä, sillä sen spesifisyys on 100%. (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008.)

Yleisimmät laboratoriodiagnosointimenetelmät *Mycoplasma pneumoniae* tutkimiseksi ovat immunologiset määritykset, eli elimistössä mikrobia vastaan kehittyneiden vasta-aineiden tutkiminen. *Mycoplasma pneumoniae* spesifiset IgM-luokan vasta-aineet nousevat seerumissa heti oireiden ilmaannuttua. Pitoisuushuippu saavutetaan noin neljässä viikossa, jonka jälkeen vasta-ainepitoisuus laskee diagnostisesti merkityksettömälle alueelle muutamassa kuukaudessa. Erityisesti nuorilla aikuisilla IgM-luokan vasta-ainepitoisuudet nousevat usein korkealle. IgM-luokan vasta-aineiden määrittäminen voidaan siis tehdä hyvin pian oireiden ilmaannuttua ja se sopii parhaiten akuutin infektion diagnosointiin nuorilta aikuisilta. IgG-luokan vasta-aineet nousevat seerumissa hitaasti, mutta pysyvät koholla kauemmin kuin IgM-luokan vasta-aineet. Kahden eri näytteen ottaminen kaksi viikkoa toisistaan saattaa paljastaa akuutin tai uusiutuneen infektion, vaikkei IgM-luokan vasta-aineita löytyisikään. Diagnoosin varmistamiseen riittää silloin todettu IgG vasta-ainepitoisuuden nousu otetuissa näytteissä. Tällöin taudinaiheuttajan löytymisellä ei kuitenkaan ole enää kliinistä merkitystä, mutta sen avulla voidaan todeta sairastettu *Mycoplasma pneumoniae* -infektio. (SeroMP recombinant IgG, IgM and IgA, Instruction manual, s. 1)

4.5 Antibioottihoito

Koska mykoplasamalla ei ole peptidoglykaanista koostuvaa soluseinää, ei beetalaktaamiantibiooteilla, kuten penisillineillä ja kefalosporiineilla ole tehoa niihin. Sen sijaan proteiinisynteesiin ja DNA:ta modifioiviin molekyyliin vaikuttavat antibiootit ovat tehokkaita (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte 2008.) Makrolidit ovat usein ensimmäinen vaihtoehto *M. pneumoniae* aiheuttaman infektion hoidossa (Dumke & Von Baum et al 2010.) Makrolidien lisäksi *M. pneumoniae*en tehoavia antibiootteja ovat myös tetrasykliiniryhmän antibiootit sekä ketolidit ja fluorokinolonit (Korppi ja Kleemola 2010.)

5 ELISA-MENETELMÄ (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

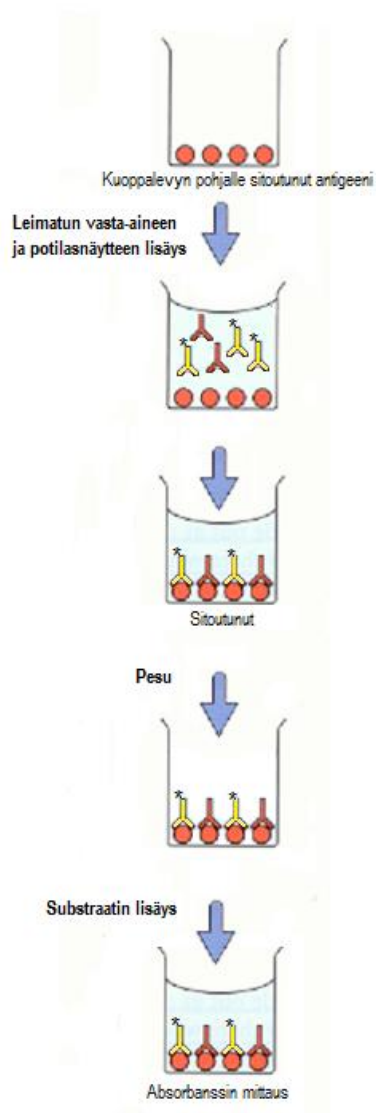
Mycoplasma pneumoniae -spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden määrittäminen perustuu heterogeeniseen entsyymi-immunokemialliseen menetelmään eli EIA-menetelmään, jossa reaktioon osallistuva entsyymi on sidottuna kaksoisvasta-aineeseen. Heterogeeninen EIA-menetelmä tarkoittaa määrittäystä, jossa mitattava vasta-aine ja sitoutunut leimattu kaksoisvasta-aine erotetaan toisistaan ennen lopullista mittausta. EIA-menetelmässä entsyymileima on kytketty joko antigeeniin tai vasta-aineeseen. ELISA-menetelmässä detektioreaktiota katalysoiva entsyymi on sidottuna kaksoisvasta-aineeseen. Substraatin lisäyksen jälkeen mitattavan yhdisteen spesifiseen kaksoisvasta-aineeseen kytketty entsyymi katalysoi substraatin. Lopputuotteena syntyy fotometrisesti mitattava värillinen reaktiotuote, jonka määrä on suoraan verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. Tyypillisesti ELISA-menetelmässä käytettäviä entsyymejä ovat alkalinen fosfataasi, beeta-galaktosidaasi ja peroksidaasi. (Vilpo & Niemelä, 2003, 78; Penttilä, 2004, 93–95) Meidän määrittämissämme entsyyminä toimii HRP (horse radish peroxidase) eli piparjuuriperoksidaasi.

ELISA-määrittämenetelmiä voidaan ajatella olevan kahdenlaisia: kompetitiivisia ja non-kompetitiivisia määrittämenetelmiä. Kompetitiivisessä eli kilpailevassa ELISA-menetelmässä mitattava vasta-aine sekä vakiomääräinen leimattu vasta-aine lisätään kuoppalevyille samanaikaisesti, jolloin ne kilpailevat keskenään sitoutumisesta kuoppalevyn pohjalle sidottuun antigeeniin. Non-kompetitiivisessä eli ei-kilpailevassa määrittämenetelmässä mitattava vasta-aine sitoutuu kuoppalevyn pohjalle sidottuun antigeeniin. Pesujen jälkeen lisättävä leimattu kaksoisvasta-aine sitoutuu antigeenissa kiinni olevaan vasta-aineeseen. Tällöin kilpailutilannetta ei synny. (Penttilä, 2004, 90–92) *M. pneumoniae*-spesifisten IgG-luokan vasta-ainemäärittämissä käytämme non-kompetitiivista ELISA-menetelmää.

Yleisesti ELISA-menetelmää käytetään kliinisessä kemiassa, seulonta-, vierianalytiikka- ja kotitestisovelluksissa sekä serologisissa eli immunologiaan perustuvissa tutkimuksissa bakteeri- ja virustautien immuniteetin osoituksissa. (Penttilä, 2004, 94–95; Huovinen ym. 2003, 66)

5.1 Kompetitiivinen ELISA-menetelmä

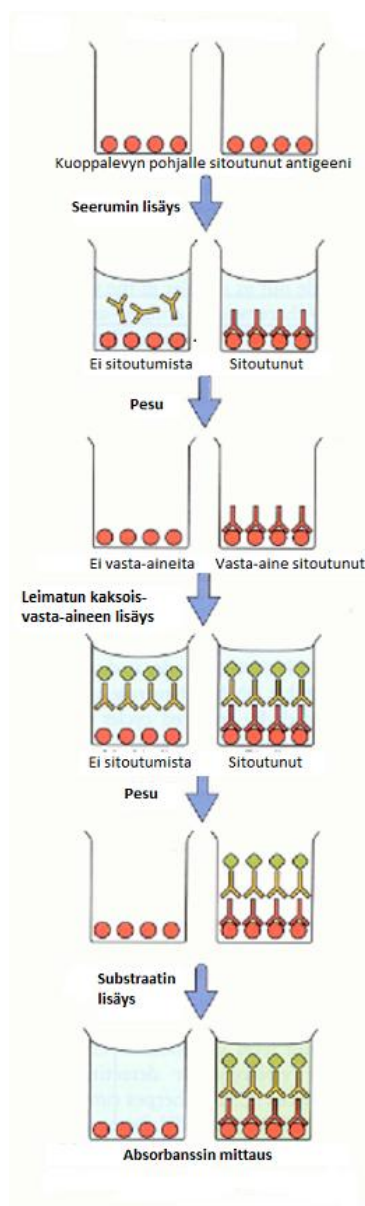
Kompetitiivisen ELISA-menetelmässä tunnettu määrä leimattua vasta-ainetta ja potilasnäytteen vasta-aine kilpailevat yhtä aikaa sitoutumisesta kiinteään faasin pohjalle sidottuun antigeeniin. Pesujen avulla näytteestä poistetaan sitoutumattomat leimatut ja leimaamattomat vasta-aineet, jotta mittausepätarckkuuksilta vältyttäisiin. Substraatin lisäyksen jälkeen leimattuun vasta-aineeseen sidottu entsyymi katalysoi substraatin ja syntyy fotometrisesti mitattava värillinen reaktiotuote. Reaktiotuotteen määrä on kääntäen verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. (Penttilä, 2004, 90, 94–95)



KUVIO 2. Kompetitiivinen ELISA-menetelmä. (Mukaiillen Analytisch Diagnostisch Centrum. Hakupäivä 15.2.2012)

5.2 Non-kompetitiivinen ELISA-menetelmä

Non-kompetitiivinen ELISA-menetelmä perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan. Potilasnäyte lisätään kuoppalevyille, jolloin potilasnäytteen sisältämät spesifiset vasta-aineet sitoutuvat kuoppalevyn pohjalle sidottuun antigeeniin. Pesujen avulla poistetaan ylimääräinen sitoutumaton vasta-aine. Leimattu kaksoisvasta-aine kiinnittyy ainoastaan antigeeni-vasta-aine –kompleksiin, ja ylimääräinen sitoutumaton, leimattu kaksoisvasta-aine pestään pois. Substraatin lisäyksen jälkeen leimattuun vasta-aineeseen sidottu enstyyymi katalysoi lisätyn substraatin ja syntyy värillinen reaktiotuote. Reaktiotuotteen määrä on suoraan verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. (Penttilä, 2004, 90, 94–95)



KUVIO 3. Non-kompetitiivinen ELISA-menetelmä (Mukaillen Analytisch Diagnostisch Centrum. Hakupäivä 15.2.2012)

6 HARJOITUSTYÖN TESTAUS

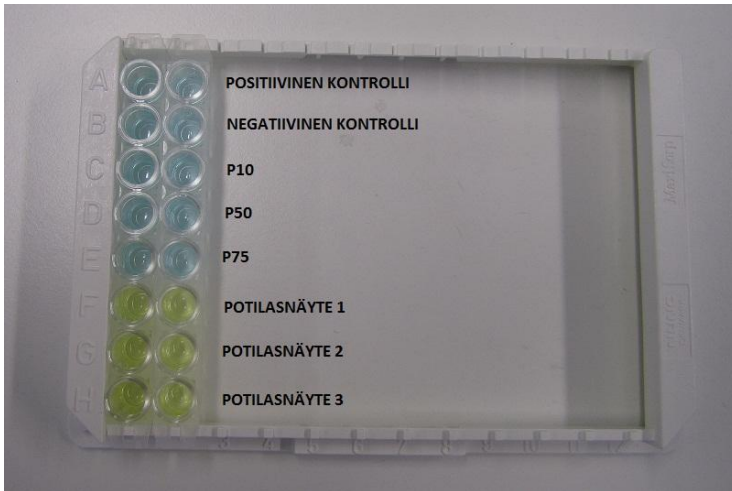
Käytimme määrittäessä Savyons Diagnostics Ltd:n valmistamaa *Mycoplasma pneumoniae* -spesifisten IgG-luokan vasta-ainemäärittäykseen tarkoitettua kittiä. Kitin mukana tuli englanninkielinen pakkausseloste, jota käytimme apuna määrittäessä ja suomenkielisten ohjeiden laadinnassa. Kitti sisälsi yhden 96-kuoppalevyn, reagenssit, kontrollit ja kalibraattorit. Lisäksi saimme positiivisiksi varmistettuja potilasnäytteitä Oulun yliopistollisen sairaalan mikrobiologian laboratorion kautta.



KUVIO 4. SeroMP™ Recombinant IgG -kitti ja määrittäykseen käytettävät reagenssit.

6.1 Työvaiheet

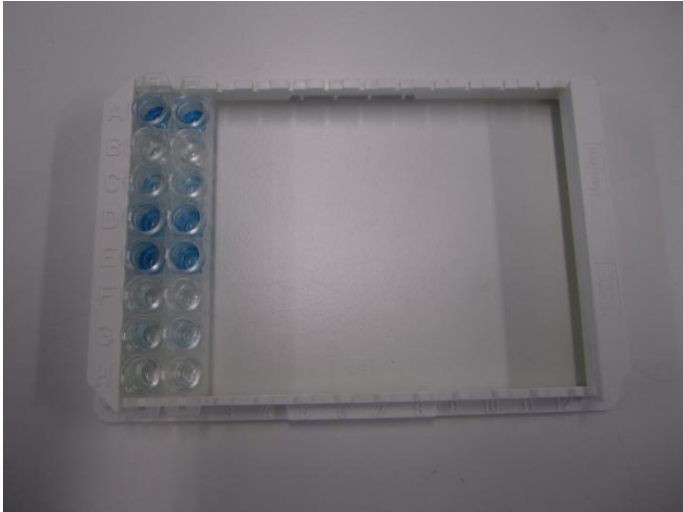
Otimme kitin lämpiämään huoneenlämpöön noin puoleksi tunniksi ennen esitestauksen aloittamista. Käytimme 96-kuoppalevystä kaksi stripsiä eli 16 näytekuoppaa, koska teimme kaikista näytteistä rinnakkaiset pipetoinnit. Kuoppalevyjen kuopat ovat päällystetty *Mycoplasma pneumoniae* -rekombinanteilla antigeeneilla. Pipetoimme kuoppiin laimennettujen potilasnäytteiden lisäksi negatiivista ja positiivista kontrollia sekä kolmea eri kalibraattoria (P10, P50 ja P100). Kontrolleja sekä standardeja ei tarvinnut esikäsitellä ennen pipetointia. Kuviossa 5 on esitettyä pipetointijärjestys.



KUVIO 5. Pipetointijärjestys.

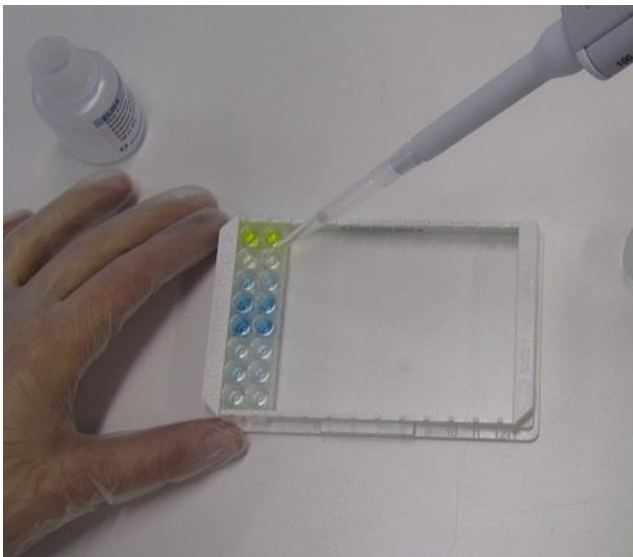
Inkuboimme parafilmillä peitetyjä näytteitä yhden tunnin ajan lämpökaapissa, jolloin näytteiden sisältämät *M. pneumoniae*-spesifiset IgG-luokan vasta-aineet kiinnittyivät kuoppalevyn pohjalla oleviin antigeeneihin. Inkubaation loppuvaiheessa laimensimme HRP-konjugaattia. (LIITE 1.) HRP-konjugaatit ovat piparjuuriperoksidaasilla (horseradish peroxidase) konjugoituja IgG-vasta-aineita.

Inkuboinnin jälkeen pesimme näytteitä kolme kertaa pesuliuksella ValiRx Finland Oy:n omistamalla kuoppalevypesurilla. Pesun tarkoituksena oli huuhdella kiinnittymättömät vasta-aineet pois. Tämän jälkeen pipetoimme näytteisiin laimennettua HRP-konjugaattia. Näytteet HRP-konjugaatin lisäyksen jälkeen on esitetty kuviossa 6. Peitimme näytteet parafilmillä ja inkuboimme niitä tunnin ajan lämpökaapissa. Inkuboinnin aikana HRP-konjugaatit kiinnittyivät rekombinantiantigeeni-vasta-aine -kompleksiin. HRP-konjugaatin kiinnittyminen on suoraan verrannollinen *M. pneumoniae* -spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden sitoutumiseen rekombinantiantigeeneihin.



KUVIO 6. Näytteet HRP-konjugaatin lisäyksen jälkeen.

Inkuboinnin jälkeen toistimme pesusarjan, jotta ylimääräinen HRP-konjugaatti huuhtoutui pois. Pestyihin näytteisiin lisäsimme TMB-substraattia eli tetrametyylibentsidiini-substraattia, jolloin kaksoisvasta-aineeseen kiinnittynyt piparjuuriperoksidaasi hydrolysoi lisätyn TMB-substraatin. Pysäytimme hydrolyysin 15 minuutin huoneenlämmössä inkuboinnin jälkeen pysäytysliuoksella (stop solution), jolloin kuoppalevyjen väri muuttui sinisestä keltaiseksi. Väri vaihtuminen on havainnollistettu kuviossa 7.



KUVIO 7. Pysäytysliuoksen pipetoinnin vaikutus näytteisiin.

Määritimme näytteiden absorbanssit spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm heti pysäytysliuoksen pipetoinnin jälkeen. Absorbanssien mittauksessa käytimme monileimailmaisinta, Viktor-analysaattoria.

7 TULOKSET

Opinnäytetyöprojektimme tarkoituksena oli testata *M.pneumoniae*-vasta-ainemääritystä, arvioida sen soveltuvuutta Oulun seudun ammattikorkeakoulun järjestämälle Mikrobiologia II -kurssille sekä luoda tuote, joka on työohje opiskelijoille harjoitustyötä varten. Projektitehtävämme oli selvittää, soveltuuko testaamamme määrittäminen mikrobiologian syventävän kurssin harjoitustyöksi, onko käyttämämme määrittäminen luotettava ja onko laatimamme työohje laadukas ja työelämälähtöinen.

7.1 Vasta-ainemäärityksen tulokset ja luotettavuus

Victor-analysaattorilla mittaamiemme absorbanssiarvojen perusteella pystyimme luomaan standardikuvaajan, arvioimaan käyttämämme kitin luotettavuutta ja testin onnistumista sekä määrittämään vasta-ainepitoisuudet kontrolleista ja potilasnäytteistä. Käsin tehtävässä ELISA:ssa yksi virhelähde on käsin pipetointi. Jokaisesta näytteestä, kontrollista ja standardista teimme rinnakkaiset mittaukset saadaksemme mahdolliset pipetointivirheet ja muut satunnaiset virheet esille. Vertaamalla rinnakkaisista mittauksista saatuja absorbansseja kuviossa 8 nähdään, että kaikki rinnakkaiset määrittäykset onnistuivat hyvin. Voidaan siis olettaa, että pipetoinnissa ei tapahtunut suuria virheitä.

	1	2	Mitattujen absorbanssien keskiarvo
A Positiivinen kontrolli	1,77381	1,77682	1,775315
B Negatiivinen kontrolli	0,0734655	0,0745069	0,0739862
C Standardi P10	0,556103	0,567299	0,561701
D Standardi P50	1,48327	1,54192	1,512595
E Standardi P75	1,89733	1,71471	1,80602
F Potilasnäyte 1	0,161664	0,161649	0,1616565
G Potilasnäyte 2	0,371404	0,386851	0,3791275
H Potilasnäyte 3	0,123684	0,132253	0,1279685

KUVIO 8. Näytteiden absorbanssit aallonpituudella 450 nm.

7.2 Määrityksen luotettavuus ja tulosten arviointia

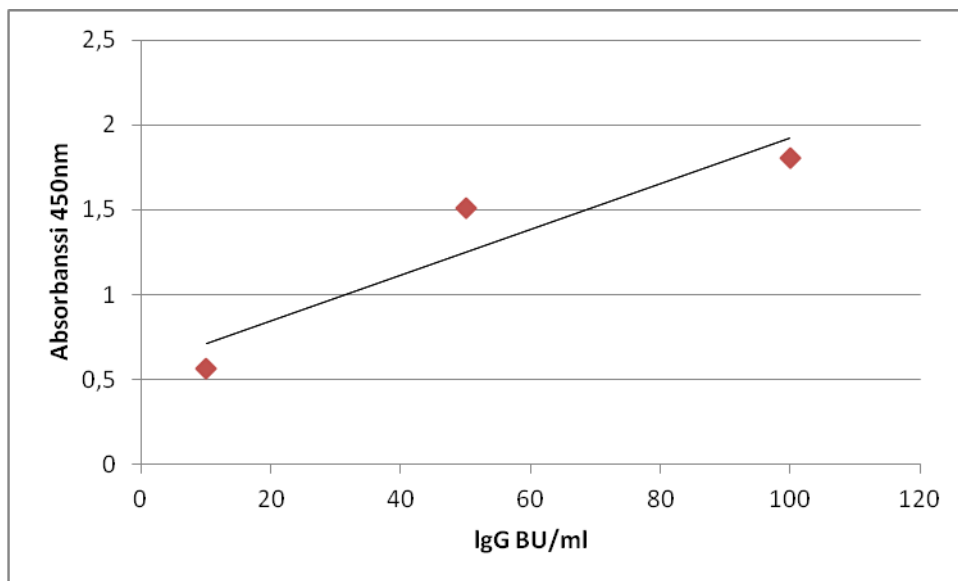
Savyons Diagnostics Ltd:n valmistaman kitin ohjeessa on annettu kriteerit, joiden tulee täytyä testin toimiessa oikein. Ohjeen mukaan standardin P75 absorbanssin tulee olla $>0,9$, ja määrittämissämme saimme standardin P75 absorbanssiksi keskimäärin 1,806. Standardin P10/negatiivisen kontrollin absorbanssien suhteen tulee olla $> 1,5$, ja määrittämissämme saimme suhteeksi 7,6 ((A P10) 0,561701 / (A negatiivinen kontrolli) 0,0739862 \approx 7,6). Standardin P50/negatiivisen kontrollin absorbanssien suhteen tulee olla > 4 , ja määrittämissämme saimme suhteeksi 20,4 ((A P50) 1,512395 / (A negatiivinen kontrolli) 0,0739862 \approx 20,4). Standardin P75/negatiivisen kontrollin suhteen tulee olla > 5 , ja me saimme suhteeksi 24,4 ((A P75) 1,80602

/ (A negatiivinen kontrolli) $0,0739862 \approx 24,4$). Näiden kriteerien mukaan testi siis toimi luotettavasti.

Standardikuvaajan avulla voidaan määrittää kontrollien sekä potilasnäytteiden vasta-ainepitoisuudet. Standardikuvaaja on piirretty standardeista P10, P50 ja P75 saamiemme absorbanssien mukaan, jolloin x-akselilla on standardien pitoisuus BU/ml ja y-akselilla absorbanssi mitattuna Victor-analysaattorilla aallonpituudella 450 nm. Absorbansseiksi on laskettu kunkin standardin rinnakkaisten mittausten antama keskiarvo. Standardikuvaaja on esitetty kuviossa 9.

TAULUKKO 1. Standardien pitoisuudet ja määritetyt absorbanssit aallonpituudella 450 nm.

Standardi	IgG BU/ml	Absorbanssi 450 nm
P10	10	0,562
P50	50	1,513
P75	100	1,806



KUVIO 9. Standardikuvaaja.

Standardikuvaajasta saadaan selville, että positiivisen kontrollin vasta-ainepitoisuus on 90 BU/ml, kun positiivinen kontrolli antoi absorbanssiksi keskimäärin 1,77. Se ylittää siis selvästi kitin valmistajan ohjeen, jonka mukaan positiivisen kontrollin pitoisuuden tulee olla vähintään 40 BU/ml. Kitin ohjeen mukaan *M. pneumoniae* IgG -luokan vasta-aineet ovat positiiviset, kun pitoisuus seerumissa on 10 BU/ml tai enemmän. Tekemämme määrittäksen luotettavuutta

heikentävä asia on, että Oulun yliopistollisen sairaalan mikrobiologian laboratoriosta saamamme positiiviset potilasnäytteet jäivät määrityksessämme alle tämän rajan eli negatiivisiksi. Kaikkien potilasnäytteiden absorbanssit jäivät alle 0,562, mikä oli määrityksessämme mittausalueen alaraja.

Jäi epäselväksi, miksi Oulun yliopistollisen sairaalan mikrobiologian laboratoriosta hankkimamme *M.pneumoniae*-IgG-vasta-ainepositiiviset potilasnäytteet osoittautuivat määrityksessämme negatiivisiksi. Koska hävitimme potilaiden yksityisyydensuojan vuoksi saamiemme näytteiden potilastiedot ja näyttenumerot, emme pystyneet jälkikäteen tarkastamaan näytteistä saatuja vasta-ainepitoisuuksia Oulun yliopistollisen sairaalan tiedostoista. On mahdollista, että näytteiden vasta-ainepitoisuudet ovat laskeneet pitkäaikaisen säilytyksen aikana tai että Oulun yliopistollisen sairaalan käyttämä määritysmenetelmä on herkempi. Käyttämämme kitti toimi kuitenkin sen mukana tulleiden omien kontrollien perusteella oikein. Myös jokaisesta näytteestä, kontrollista ja standardista tekemämme rinnakkaiset mittaukset onnistuivat hyvin, eikä niissä ollut juuri eroa. Voidaan siis olettaa, että pipetointi onnistui analyysivaiheessa hyvin. Toisaalta saamamme näytteet olivat useita vuosia vanhoja ja on mahdollista, että pitkän säilytyksen aikana osa vasta-aineista on tuhoutunut. Tämä selittäisi, miksi vasta-ainepitoisuudet olivat odotettua pienemmät.

Yhtenä projektitehtävänä oli arvioida, onko käyttämämme määritysmenetelmä luotettava *M.pneumoniae*-spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden mittaukseen. Vaikka saamamme positiiviset potilasnäytteet antoivatkin negatiivisen tuloksen, kokonaisuudessaan ajattelimme käyttämämme kitin kuitenkin toimineen luotettavasti. Kitin valmistajan omat kontrollit toimivat moitteetta, ja valmistajan antamat kriteerit täyttyivät, joten niiden perusteella testiä voi pitää luotettavana.

7.3 Harjoitustyön soveltuvuus Mikrobiologia II -kurssille

Projektimme yhtenä tehtävänä oli arvioida *M. pneumoniae*-IgG-luokan vasta-ainemäärityksen soveltuvuutta harjoitustyöksi Oulun seudun ammattikorkeakoulun järjestämälle syventävälle Mikrobiologia II -kurssille. Soveltuvuutta arvioimme muun muassa vertaamalla harjoitustyön sisältöä Mikrobiologia II -kurssin opintojaksokuvaukseen ja oppimistavoitteisiin, arvioimalla harjoitustyölle tulevaa hintaa sekä sen toimivuutta ja onnistumista käytännössä opiskelijoiden tekemänä. Mielestämme *M.pneumoniae*-spesifisten IgG-luokan vasta-aineiden määritys kokonaisuudessaan sopii harjoitustyöksi syventävälle Mikrobiologia II -kurssille.

Mikrobiologiaa ajatellaan usein enimmäkseen bakteerien viljelynä ja tunnistamisena. Viljely onkin yleinen mikrobiologinen tapa tunnistaa bakteereita, sillä useat tauteja aiheuttavat bakteerit kasvavat viljeltynä laboratorio-oloissa. Kliiniseen mikrobiologiaan kuuluu kuitenkin myös muunlaisia analysointimenetelmiä, sillä kaikki bakteerit eivät kasva laboratorio-oloissa tai kasvavat erittäin huonosti. *Mycoplasma pneumoniae* on hyvä esimerkki bakteerista, jonka aiheuttaman infektion tunnistamiseen vaaditaan useimmissa tapauksissa muunlaisia menetelmiä kuin viljely. Tämä harjoitustyö antaakin opiskelijoille mahdollisuuden soveltaa immunologista määritysmenetelmää kliinisen mikrobiologian puolelle.

Mikrobiologia II -kurssin sisältöön kuuluu opintojaksokuvauksen mukaan ajankohtaisten teemojen käsittely. *Mycoplasma pneumoniae* aiheuttamat infektiot ovat lisääntyneet runsaasti viime vuosina ja saaneet myös huomiota mediassa. Opiskelijoilla on enemmän motivaatiota päästä tutkimaan ajankohtaisia ja tuttuja mikrobitauteja. Motivaatiota myös lisää, että he voivat halutessaan tutkia omia seeruminäytteitään.

Myös ajallisesti harjoitustyö sopii opiskelijoiden tehtäväksi kurssin harjoitustyönä. Työn tekemiseen tulee varata aikaa reilusti, noin neljästä viiteen tuntia, mutta sen pystyy tekemään yhden koulupäivän aikana. Inkubaatioiden aikana opiskelijoilla on aikaa käydä tauolla ja syömässä sekä tutustua työohjeen sisältämään teoriaosuuteen. Opiskelijat voivat suorittaa harjoitustyötä melko itsenäisesti; opettajan apua tarvitaan lähinnä Victor-analysaattorin käytössä. Itsenäinen oppiminen on osa Oulun seudun ammattikorkeakoulun periaatteita.

Käyttämämme kitti on kallis, yli 300 euroa. Hinta ei kuitenkaan ole este harjoitustyön toteuttamiseksi. Kitin säilyvyys on myös rajallinen, mutta sillä ei ole juuri merkitystä harjoitustyön kannalta. Syventävää Mikrobiologia II -kurssia järjestetään vain kerran vuodessa tai harvemmin, ja yhden kitin voi laskea riittävän yhdelle opiskelijaryhmälle. Kitin voi tilata ennen harjoituskurssin alkamista, ja se tulee käytettyä kurssin aikana. Kitti sisältää yhden 96-kuoppalevyn, ja syventävän kurssin opiskelijamäärä on noin 10–14. Kuoppalevystä riittää siis keskimäärin 6–9 kuoppaa käytettäväksi yhtä opiskelijaa kohden.

Oulun yliopistollisen sairaalan mikrobiologian laboratoriosta saamamme positiiviset potilasnäytteet antoivat käyttämällämme kitillä negatiivisen tuloksen. Alkuperäisenä ajatuksenamme oli, että opiskelijoilla olisi ollut harjoitustyössä analysoitavana myös positiivisia potilasnäytteitä. Jatkossa suosittelimme käyttämään harjoitustyössä tuoreempia näytteitä.

7.4 Työohjeen luominen

Projektimme yhtenä tehtävänä oli luoda testaamallemme *M.pneumoniae* määrittelyä laadukas työohje opiskelijoiden käyttöön. Opinnäytetyöprojektimme aikana kävimme läpi tuotekehitysprosessin vaiheita, ja tuotteena syntyi työohje *Mycoplasma pneumoniae* IgG-luokan vasta-ainemäärittelyyn. Tuotekehitysprosessin vaiheita ovat muun muassa ongelmien ja kehittämistarpeiden tunnistaminen, ideavaihe, luonnosteluvaihe, kehittäminen sekä viimeistelyvaihe. (Jämsä & Manninen, 2000, 28).

Ongelmat ja kehittämistarpeet olivat selvillä jo opinnäytetyön aihetta valitessamme, kun Oulun seudun ammattikorkeakoulu tarvitsi työohjeen mikrobiologian syventävän kurssin harjoitustyöhön. Työohjetta ideoimme ja luonnostelimme jo heti tekemämme harjoitustyön testauksen jälkeen. Testatessamme *M. pneumoniae* vasta-ainemäärittelyä kirjoitimme työvaiheet ja mahdolliset ongelmat muistiin. Sen perusteella meidän oli helppo kehittää ja muokata työohjetta. Ennen lopullisen työohjeen luomista laadimme alustavan, luonnosmallisen työohjeen. Palautetta alustavasta työohjeesta saimme opponenteilta sekä ohjaavilta opettajilta. Emme voineet antaa työohjetta testattavaksi opiskelijaryhmälle, koska käyttämämme kitti oli kallis eikä analysoinnissa tarvittava ValiRX Finland Oy:n omistama Victor-analysaattori ole yleisesti opiskelijoiden käytettävissä. Opiskelijanäkökulma työohjeen toimivuudesta jäi siis osittain puuttumaan. Ohjaavilta opettajilta ja opponenteilta saamamme palautteen perusteella loimme lopullisen työohjeen.

Työohjeen laatimisessa otimme huomioon monta asiaa. Asiasisällön lisäksi myös visuaalinen puoli on työohjeessa tärkeä. Kuvilla ja väreillä pyritään herättämään lukijan mielenkiintoa sekä tukemaan tekstin sisältöä. (Luukkonen, 2004, 41–42) Visuaalisuuteen vaikuttavat myös värit ja tekstin tehostekeinot. Tällaisia ovat muun muassa kirjaintyyppi ja -koko sekä jäsentely ja otsikointi. (Jämsä & Manninen, 2000, 56–57) Käytimme työohjeessa kursivoitua tekstiä latinankielisten sanojen vahvistamiseksi sekä lihavoitua tekstin tärkeiden asioiden erottamiseksi. Kirjoitimme vain lyhyitä ja yksinkertaisia virkkeitä. Tekstin asiasisältöä ja harjoitustyön etenemistä sekä työssä tarvittavia tarvikkeita havainnollistimme aiheeseen liittyvillä kuvilla. Työohjeeseen valitsimme vaalean taustaväriä, jotta tulostuksenkin jälkeen teksti olisi luettavissa. Otimme huomioon, että monet opiskelijat tulostavat materiaalit mustavalkoisina. Työvaiheet kirjoitimme mahdollisimman lyhyesti ja selkeästi, jotta harjoitustyön etenemistä ja työvaiheita olisi helppo seurata.

Tuote on laadukas, kun se on suunniteltu ottamaan huomioon käyttäjäryhmän tarpeet, kyvyt ja muut ominaisuudet. (Jämsä & Manninen, 2000, 44) Työohjeemme ensisijaisia käyttäjiä ovat bioanalytiikan opiskelijat, jotka syventyvät kolmantena opiskeluvuotenaan mikrobiologiaan. Tuotteestamme hyötyvät myös kurssin opettajat, koska harjoitustyötä varten luodaan yksinkertainen, kuvallinen ja suomenkielinen työohje. Työohjeen valmistuksessa otimme huomioon opiskelijoiden jo olemassa olevat tiedot ja taidot. Opiskelijoiden taitojen aliarvioiminen ei motivoi opiskelijoita, mutta toisaalta liian vaativakaan harjoitustyö ei edistä oppimista.

Laadimme työohjeellemme laatukriteerit, joiden avulla arvioimme työohjeen laadukkuutta. Laatu on ominaisuuksista muodostuva kokonaisuus. Tuotteen on tarkoitus perustua tähän kokonaisuuteen ja täyttää sille asetetut vaatimukset ja odotukset. Laatua konkretisoivat laatukriteerit ja tavoitteet. Tavoitteiden tulisi olla mitattavia ominaisuuksia, jotta niiden toteutuminen voidaan arvioida. (Holma ym., 2001, 8, 26) Laatukriteerit on esitetty taulukossa 2.

Laatukriteerit työohjeelle	Ominaisuudet	Laatukriteerien toteutuminen
Selkeä	Lyhyet ja ytimekkäät virkkeet. Ei vaikeita sanoja. Oikea kirjasintyyli ja riviväli.	Etenee johdonmukaisesti. Teksti on ymmärrettävää.
Havainnollistava	Yksityiskohtainen ja kuvallinen työohje. Sisältää esimerkkejä.	Työohjetta on helppo noudattaa.
Hyödyllinen	Harjoitustyöhön välttämätön. Antaa pohjan työohjeen kirjalliselle rakenteelle.	Syventävälle kurssille saadaan uusi harjoitustyövaihtoehto. Työohjeesta on hyötyä myös muuta käyttöä varten.
Ajankohtainen	Perustuu yleistyneeseen infekioon. Serologia on entistä tärkeämpi määrittämenetelmä.	Valmentaa työelämään. Edistää ammatillista kasvua.
Opiskelijalähtöinen	Työohje helposti saatavilla. Sisältää relevanttia tietoa. Mielenkiintoa herättävä.	Opettaa uutta. Motivoi opiskelemaan.

TAULUKKO 2. Laatukriteerit

8 POHDINTA

Teimme opinnäytetyömme parityönä ja osallistuimme sen tekemiseen tasavertaisesti. Myös tulevassa työelämässä bioanalyytikon tulee pystyä työskentelemään itsenäisen työn lisäksi parin ja ryhmän kanssa sekä jakamaan tehtäviä. Oppimistavoitteenamme oli tutustua projektimuotoiseen toimintaan ja kehittää organisointitaitojamme. Opinnäytetyöprojektimme aikana opimme organisoimaan ja suunnittelemaan työmme etenemistä. Opinnäytetyömme ansiosta olemme saaneet monenlaisia valmiuksia toimia tulevassa työssämme bioanalytikoina.

Opinnäytetyössämme yhdistyy kaksi laboratoriomailman eri osa-aluetta, mikrobiologia ja immunologia. Opinnäytetyöprosessimme aikana syvennyimme immunologiseen tutkimukseen ELISA -määritysmenetelmän avulla ja sovelsimme sitä kliiniseen mikrobiologiaan, *Mycoplasma pneumoniae* tutkimiseen. Määritysmenetelmiin syventyminen oli yksi oppimistavoitteistamme. Erilaisten analysointimenetelmien tunteminen on olennainen osa bioanalyytikon ammattia, sillä työssä tarvitaan analyysien hallintaa ja niiden periaatteiden ymmärtämistä. Myös eri mikrobien ja niiden aiheuttamien infektioiden tunteminen kuuluu etenkin mikrobiologian laboratoriossa työskentelevän bioanalyytikon työnkuvaan. Mykoplasmainfektiot ovat yleistyneet viime vuosina merkittävästi. Laboratoriomailmassa ajankohtaiset mikrobitaudit näkyvät muun muassa näytemäärien kasvuna, joihin laboratorion tulee pystyä vastaamaan.

Yhtenä oppimistavoitteenamme oli tutustua laadukkaaseen työohjeeseen kriteereihin, ja se yhdistyy myös ammatilliseen kasvuun. Työohjeiden luominen ja niiden ajantasaistaminen kuuluvat bioanalyytikon ammattiin. Ajantasaiset ja kattavat työohjeet ovat olennainen osa laboratoriotyön laatua ja turvallisuutta. Laadukkuutta lisää se, että työohjeet eivät kulkeudu suullisesti ja muistin varassa työntekijältä toiselle, vaan että ne ovat kirjallisesti esillä ja työntekijöiden saatavilla. Näin jokainen työntekijä voi toimia samalla tavalla ja analyttisten virheiden mahdollisuus vähenee.

Opinnäytetyöprojektimme aikana emme saaneet selville, miksi Oulun yliopistollisen sairaalan mikrobiologian laboratoriosta saamamme positiiviset potilasnäytteet jäivät määrittelyssämme negatiivisiksi. Kitin ohjeessa annetut kriteerit kuitenkin täyttyivät, joten voimme olettaa tuloksien olevan luotettavia. Kitti toimi siis odotetulla tavalla, mutta näytteet eivät täyttäneet niille asetettuja tavoitteita. Tulimme siihen johtopäätökseen, että määrittely soveltuu mikrobiologian syventävän kurssin harjoitustyöksi, mutta kehoitamme oppilaita käyttämään jatkossa tuoreita potilasnäytteitä.

Työohjeesta olemme pyrinneet tekemään yksinkertaisen ja johdonmukaisen, jotta se vastaisi työelämän vaatimuksia. Töissä ollessamme olemme huomanneet, että helppolukuiset ja selkeät ohjeet eivät kuluta turhaan työntekijöiden aikaa ja resursseja. Työohjeemme on laadukas, mikäli se täyttää sille asettamamme kriteerit. Ajattelemme, että työohjetta käyttävät oppilaat pystyvät arvioimaan työohjeemme laadukkuutta parhaiten. Täytimme kuitenkin omasta mielestämme työohjeelle asettamamme tavoitteet.

Käytännön kannalta opinnäytetyömme on hyödyllinen opiskelijoille ja opettajille. Toiminnallisena tavoitteenamme on, että laatimaamme työohjetta käytetään tulevaisuudessa Mikrobiologia II -kurssilla harjoitustyön tekemisessä. Tämän tavoitteen toteutuminen riippuu siitä, otetaanko testaamamme harjoitustyö käyttöön kyseiselle kurssille. Tulevaisuudessa selvinnee, vastaako opinnäytetyömme kurssin ja opiskelijoiden tarpeita harjoitustyönä. Pohdimme myös tutkimuksen lisäämistä palvelulaboratorion tutkimusvalikoimaan *M. pneumoniae*-infektioiden yleisimpinä aikoina. Jatkotutkimuksena voisi mahdollisesti selvittää eri määrittämenetelmien eroja *M. pneumoniae*-vasta-ainepitoisuuksien mittaamisessa.

LÄHTEET

Dumke, R., Von Baum, H., Lück, P. & Jacobs, E. 2010. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clinical Microbiology and Infection* 16 (6), 613–616.

Gilbert-Barness, E. & Barness, L.A. 2010. *Clinical Use of Pediatric Diagnostic Tests*, 95–96

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. Kariston Kirjapaino Oy, 140

Holma, T., Outinen, M., Idänpään-Heikkilä, U. & Sainio, S. 2001. *Kirkasta ja uudista laadunhallintaa – kehitä laatutalo*. Suomen kuntaliitto, Helsinki. 8, 26

Hulkko, T., Lyytikäinen, O., Kuusi, M., Seppälä, S. & Ruutu, P. (toim) 2010. *Tartuntataudit Suomessa 1995–2009*. Terveys- ja hyvinvoinnin laitos raportti 17/2010, 16.

Hulkko, T., Lyytikäinen, O., Jaakola, S., Kuusi, M., Puumala, J. & Ruutu, P. (toim) 2011. *Tartuntataudit Suomessa 2010*. Terveys- ja hyvinvoinnin laitos raportti 17/2011, 11.

Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H. & Vaara, M. (toim.) 2003. *Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 2*. Duodecim. s.66, 374–380.

Jokiranta, S. & Seppälä, I. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) 2011. *Immunologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet kirja 2*. Duodecim. s.101–102, 104

Jämsä, K. & Manninen, E. 2000. *Osaamisen tuoteistaminen sosiaali- ja terveysalalla*. Tammi. 28, 30, 35, 43–44, 54, 56–57, 80

Korppi, M. & Kleemola, M. *Mykoplasmat*. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) 2010. *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet kirja 1*. Duodecim, 263–267

Kuvio 1. Beltina.org Encyklopedia of health. Hakupäivä 15.2.2012

<http://www.beltina.org/health-dictionary/antibody-definition-immune-system.html>

Kuvio 2. Analytisch Diagnostisch Centrum. Hakupäivä 15.2.2012

http://www.adcnv.com/index.php?topic=serologie_nl

Luukkonen, M. 2004. Tekstiä tekemään! Kirjoittajan opas. WSOY. 41–42

Ruuska, K. 2007. Pidä projekti hallinnassa. Gummerus Kirjapaino Oy. 18–22, 177.

Sánchez-Vargas, F. M. & Gómez-Duarte, O. G. 2008. Mycoplasma pneumonia – an emerging extra-pulmonary pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (2), 105–115.

SeroMP recombinant IgG, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the semi-quantitative detection of specific IgG antibodies to Mycoplasma pneumonia in human serum, Instruction manual, Catalog no. 1261–01, Savyons Diagnostics Ltd.

Vilpo & Niemelä, 2003. Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia. Kandidaattikustannus Oy. 78, 93–95

Åkerman, K. Immunokemialliset analysaattorit. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) 2010. Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia. Kandidaattikustannus Oy, 84

http://www.oamk.fi/koulutus_ja_hakeminen/nuoret_suomenkielinen/sosiaali_terveys_ja_liikunta/index.php?sivu=bioanalytiikka Oulun seudun ammattikorkeakoulun internetsivut.

http://www.oamk.fi/koulutus_ja_hakeminen/opiskelu_oamkissa/opinto-opas/koulutusohjelmat/?sivu=oj&koodi1=O1049BA&kieli=FI&opas=2009-2010&lk=&vuosi=9S0K Oulun seudun ammattikorkeakoulun internetsivut.

<http://www.minedu.fi/OPM/> Opetus- ja kulttuuriministeriön internetsivut

LIITTEET

LIITE 1. Laimennusohjeet.

LIITE 2. Määrityksen työvaiheet.

LIITE 1. Laimennusohjeet.

Potilasnäytteiden laimennus

Laimensimme potilasnäytteet 1:105.

- Ensin laimensimme näytettä 1:21 pipetoimalla 10 µl potilasseerumia ja 200 µl laimennusliuosta (unidiluent) eppendorf-putkeen.
- Laimensimme 1:21 laimennettua potilasnäytettä lisää pipetoimalla sitä 25 µl ja 100 µl laimennusliuosta (unidiluent) uuteen eppendorf-putkeen, jolloin laimennussuhteeksi saimme 1:105.
- Toistimme laimennussarjat kaikille potilasnäytteille.

Pesuliuksen laimennus

Laimensimme pesuliuksen 1:20.

- Valmistimme 500 ml pesuliosta. Mittasimme täyspipetillä 25 ml laimentamatonta pesuliosta (wash buffer) ValiRx Finland Oy:n henkilökunnalta saamaamme pesuliuospulloon sekä 475 ml deionisoitua vettä.

HRP-konjugaatin laimennus

Laimensimme HRP-konjugaattia 1:300 juuri ennen käyttöä.

- Pipetoimme 10 µl laimentamatonta HRP-konjugaattia ja 3 ml laimennusliuosta (unidiluent) koeputkeen.

LIITE 2. Määrityksen työvaiheet.

Työvaiheet

1. Pipetoimme 50 µl negatiivista ja positiivista kontrollia, 50 µl kalibraattoreita (P10, P50 ja P100) sekä laimennettuja potilasnäytteitä kuoppalevyille. Teimme kaikista näytteistä rinnakkaiset pipetoinnit.
2. Peitimme näytteet parafilmillä ja inkuboimme niitä 1 h ajan lämpökaapissa, +37°C lämpötilassa ja 100 % kosteudessa.
3. Pesimme näytteitä 3 kertaa laimennetulla pesuliuksella.
4. Pipetoimme 50 µl laimennettua HRP-konjugaattia jokaiseen näytteeseen.
5. Peitimme näytteet uudelleen parafilmillä ja inkuboimme niitä 1 h ajan lämpökaapissa, +37°C lämpötilassa ja 100 % kosteudessa.
6. Pesimme näytteitä 3 kertaa laimennetulla pesuliuksella.
7. Pipetoimme näytteisiin 100 µl TMB-substraattia.
8. Peitimme näytteet parafilmillä ja inkuboimme niitä huoneenlämmössä 15 minuutin ajan.
9. Pipetoimme 100 µl pysäytysliuosta (stop solution) jokaiseen näytteeseen.
10. Mittasimme näytteiden absorbanssit Viktor-monileimalukijalla 450 nm aallonpituudella.