



Veriviljelyjen *Streptococcus pneumoniae*
epäilyjen tunnistus AccuProbe testillä

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
Bioanalyttikko
Opinnäytetyö
Syksy 2009

Alan Daniar

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Alan Daniar			
Työn nimi			
Veriviljelyjen <i>Streptococcus pneumoniae</i> epäilyjen tunnistus AccuProbe-testillä			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syksy 2009	48 + 4 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i> eli pneumokokki on normaali nielun bakteeri, joka on yleinen taudinaiheuttaja. Pneumokokki on aikuisilla neljänneksi ja lapsilla kolmanneksi yleisin veriviljelyistä löytyvä bakteeri. Pneumokokki tunnistetaan positiivisesta veriviljelypullosta perinteisellä tutkimusmenetelmällä muun muassa pesäkkeen morfologian, Gram-värijäyksen, katalaasitestin, alfa-hemolyysin, optokiiniherkkyyden, lateksin ja sappiliukuisuuden perusteella. Perinteisillä menetelmillä joskus ei voi tunnistaa bakteerilajia, silloin se on määritettävä polymeerasiketjureaktio (PCR)-menetelmällä, joka ei ole nopea ja se on työläs. Tällöin bakteerin tunnistus hidastuu. Korvaavaksi menetelmäksi on ajateltu Gen-Probe Accu-Probe <i>Streptococcus pneumoniae</i> Culture Identification Test -tunnistustesti, joka on nopea testi pneumokokin tunnistamista varten.</p> <p>Työn tarkoituksena on selvittää Gen-Probe Accuprobe-hybridisaatiomenetelmän soveltuvuus veriviljelyiden pneumokokkiepäilyjen osoittamiseksi suoraan veriviljelypullojen näytteistä. Työssä määritän Gen-Probe Accuprobe-hybridisaatiomenetelmän spesifisyyttä ja sensitivisyyttä perinteiseen ja PCR-menetelmään verrattuna. Tein opinnäytetyöni HUSLABin mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolle. Työni suoritin bakteriologian osastossa touko-heinäkuussa 2009.</p> <p>Työn otos oli 74 potilaan veriviljelynäytettä, jotka oli testattu aikaisemmin perinteisellä- tai PCR-menetelmällä. Otoksessa oli 39 pneumokokkipositiivista veriviljelypulloa ja 35 pneumokokkinegatiivista veriviljelypulloa. Analysoin AccuProbe-menetelmällä näytteet. Pohdin menetelmän sensitivisyyttä ja spesifisyyttä cut off -rajan määrittämisen jälkeen positiivisten ja negatiivisten tulosten avulla.</p> <p>Tuloksista ilmeni, että AccuProbella voidaan osoittaa suoraan veriviljelypullojen näytteistä pneumokokki, vaikka valmistajan ohjeen mukaan voi käyttää bakteereiden pesäkettä. AccuProbe-menetelmä havaitsi hyvin kaikki positiiviset ja negatiiviset näytteet. Oli vain yksi väärä positiivinen tulos.</p> <p>Viridans-streptokokit ja pneumokokit ovat lähisukuisia, jolloin tarkan cut off -rajan asettaminen erottamaan viridans-streptokokit ja pneumokokit ei ole mahdollista. Tulosten perusteella on muodostunut korkea cut off -raja, mutta myös RLU-tulosarvo hämäräalue, jossa niiden kahden bakteerilajien erottaminen vaatii lisää tutkimusta.</p>			
Avainsanat			
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , pneumokokki, Gen-Probe AccuProbe, hybridisaatio, Veriviljely.			

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	2
2.1	Streptokokit	3
2.2	Streptococcus pneumoniaen virulenssitekijät	4
3	VERIVILJELY	5
3.1	Näytteenotto	6
3.2	Mikrobien kasvatus	7
3.3	Veriviljelykasvun osoitus	7
3.4	Veriviljelykasvun tunnistus	8
3.5	Automaattinen veriviljelyjärjestelmä	9
3.6	BacT/ALERT 3D -veriviljelylaite	9
4	PNEUMOKOKIN PERINTEISET TUNNISTUSMENETEMÄT	12
4.1	Pesäkemorfologia ja alfa-hemolyysi	12
4.2	Gramvärjäys	12
4.3	Akridiini-oranssi värjäys	13
4.4	Optokiinitesti ja katalaasikoe	13
4.5	Lateksiagglutinaatiokoe	14
4.6	Sappiliuokoisuustesti	14
5	GEENITUNNISTUSMENETELMÄT	15
5.1	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	15
5.2	Nukleiinihappojen hybridisaatiotekniikat	18
5.2.1	Hybridisaatiomenetelmän muodot	18
5.2.2	Ribosomaalinen RNA tärkeänä kohteena mikrobilajin määrittämisessä	19
5.2.3	Koettimet	20
5.3	Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä	21
5.3.1	Cut off -raja	24
5.3.2	Hybridisaation spesifisyys ja sensitiivisyys	24
5.3.3	Varastoinnin ja käsittelyn vaatimukset sekä huomautukset	24
6	AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET AIHEESTA	26
7	TYÖN TAVOITTEET JA KYSYMYKSET	29
8	TYÖN SUORITTAMINEN	30
8.1	Näytteiden keräys ja käsittely	30
8.2	Sopivan menetelmän määrittely veriviljelynäytteen alkukäsittelyyn	31

8.3	AccuProbe-testin suoritus	33
8.4	Tutkimusmenetelmän kontrollointi	34
9	TULOKSET	35
9.1	AccuProbe-menetelmän cut off -rajan määrittäminen	36
9.2	AccuProbe-tulosten spesifisyys ja sensitiivisyys	37
10	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	39
11	TYÖN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	41
12	POHDINTA	43
	LÄHTEET	46

LIITTEET 1-4

1 JOHDANTO

Streptococcus pneumoniae eli pneumokokki on normaali nielun bakteeri, joka on yleinen lasten ja aikuisten taudinaiheuttaja. Pneumokokki voi aiheuttaa muun muassa keuhkokuumeen (pneumonia), välikorvan ja sivuonteloiden tulehduksia ja aivokalvotulehduksen. Pneumokokin aiheuttamat infektiot olivat ennen penisilliinin keksimistä tavallisia kuolinsyitä. Pneumokokki-infektioiden diagnostiikan ja hoidon saavutuksista huolimatta pneumokokkitaudit ovat edelleen merkittäviä sekä Suomessa että muualla maailmassa. (Huovinen ym. 2005: 120.)

Pneumokokki on aikuisilla neljänneksi ja lapsilla kolmanneksi yleisin veriviljelyistä löytyvä bakteeri. Se on myös toiseksi yleisin veriviljelyn löydös sairaalan ulkopuolella alkaneissa bakteremioissa. Sairaalahoitoon otetuilta keuhkokuumeopotilailta tulisi aina ottaa veriviljelynäyte. Useimmissa tapauksissa veriviljelypositiivisuus todetaan aivokalvotulehduksen tai keuhkokuumeen yhteydessä. (Huovinen ym. 2005: 120–121.)

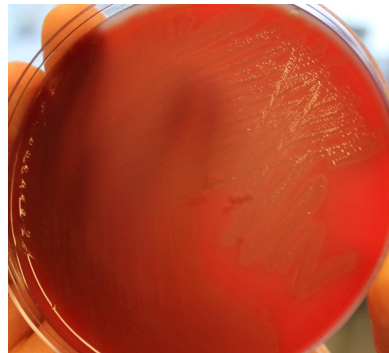
Työn aiheena on Veriviljelyjen *Streptococcus pneumoniae*-epäilyjen tunnistus AccuProbe-testillä. Opinnäytetyöni tarkoituksena on selvittää nopean Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän soveltuvuutta *Streptococcus pneumoniae* osoittamiseen suoraan veriviljelystä. Tällä uudella tekniikalla pneumokokin tulos veriviljelypullosta saataisiin jo puolen tunnin kuluttua eli huomattavasti nopeammin kuin nykyisin käytössä olevalla PCR-menetelmällä ja perinteisellä menetelmällä. Teen opinnäytetyöni HUS-LABin mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolle.

Pneumokokin tunnistaminen voi olla ongelmallista, sillä se on kasvuolosuhteiltaan varsin vaativa bakteeri. Pneumokokki autolysoituu herkästi epäedullisissa olosuhteissa. (Huovinen ym. 2005: 123.) Veriviljelypullossa pneumokokki autolysoituu helposti kun bakteeritiheys pullossa kasvaa (Kauppila 2007). Jos tällaisesta veriviljelypullosta otetaan näyte värjäystä sekä viljelyä varten, ei maljoilla usein ole mitään kasvua, eikä värjäystulos ole selvä kokki. Näistä syistä pneumokokin tunnistus perinteisillä menetelmillä ei usein ole mahdollista. Tällaisessa tilanteessa pitää käyttää sellaisia menetelmiä, jotka perustuvat bakteerin perimän tunnistukseen. Yksi tällainen menetelmä on pneumokokin nukleiinihapon osoitus geenimonistusmenetelmän (Polymeraasiketjureaktio, PCR) avulla. PCR-menetelmä vaikka on tarkka ja luotettava tutkimusmenetelmä, mutta ei ole nopea ja se on työläs. PCR-tutkimuksen teko vaatii ennako-suunnittelua, joten

sitä ei aina voi tehdä samana päivänä, kun sitä tarvitaan. Tällä tavalla pneumokokin tunnistaminen ja eristäminen veriviljelystä on pitkä prosessi, jossa jokaista näytettä pitää seurata erikseen. Korvaavaksi menetelmäksi on ajateltu Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmää, sillä se on nopea perimän tutkimukseen perustuva menetelmä ja helppo tehdä. Työssä määritän tämän uuden menetelmän spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä perinteiseen- ja PCR-menetelmän verrattuna ja myös pohdin sen kykyä erottaa pneumokokkia muista bakteereista.

2 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Streptococcus pneumoniae (Pneumokokki) on alfa-hemolyttinen streptokokki (kuvio 1). Pneumokokki on kapselillinen kokkibakteeri, joka esiintyy pareina tai lyhyinä ketjuina. Se esiintyy usein pareittain, mistä syystä sille on annettu myös nimi diplokokki. Paksu peptidoglykaanikerros on luonteenomainen grampositiivisen bakteerin soluseinälle, kun gramnegatiivisilla on ohut peptidoglykaanikerros. (Huovinen ym. 2005: 120, 62.)



KUVIO 1. *Streptococcus pneumoniae* alfa-hemolyysi verimaljalla (Bakteriologian osastolla otettu kuva 2009).

Pneumokokki on yleinen tärkeä lasten ja aikuisten taudin aiheuttaja. Pneumokokki leviää pisaratartuntana ja infektion aiheuttava pneumokokki on yleensä peräisin omasta hengitystiefloorasta. Sen aiheuttamat infektiot olivat ennen penisilliinin keksimistä tavallisia kuolinsyitä. Pneumokokilla on keskeinen merkitys tärkeiden infektioiden aiheuttajana. (Huovinen ym. 2005: 120.)

Pneumokokki aiheuttaa lieviä ylähengitysteiden tulehduksia kuten poskiontelotulehduksia ja lapsilla yleisiä välikorvan tulehduksia. Usein pneumokokin aiheuttamia hengitystieinfektioita edeltää virusinfektio, joka vaurioittaessaan limakalvoa antaa pneumokokkil-

le mahdollisuuden tunkeutua ympäröiviin kudoksiin. Pneumokokki aiheuttaa myös vakavia invasiivisia infektioita, joissa bakteeri voidaan viljellä normaalisti steriilistä näytteestä esimerkiksi verestä ja aivo-selkäydinnesteestä. (Huovinen ym. 2005:120–121.)

2.1 Streptokokit

Streptococcus pneumoniae kuuluu streptokokkien sukuun. Streptokokit ovat saaneet nimensä siitä, että ne ovat ketjuissa (strepto) kasvavia grampositiivisia kokkibakteereita ja muodoltaan pyöreitä. Streptokokit ovat katalaasi- ja oksidaasinegatiivisia kokkibakteereita. (Hänninen – Huovinen 1991: 14–15.)

Streptokokit jaotellaan niiden aiheuttaman hemolyysin perusteella beeta-, alfa- ja non-hemolyyttisiin streptokokkeihin. Hemolyysi havaitaan vertasisältävällä verimaljalla bakteeripesäkkeiden ympärillä punasolujen hajoamisena. Beeta-hemolyysi on kirkas, punasolujen totaalinen hajoaminen, alfa-hemolyysi on epätäydellinen hajoaminen ja nonhemolyysi on tilanne, jossa streptokokit eivät hajota verta lainkaan. (Hänninen – Huovinen 1991: 13.)

Streptokokit jaotellaan lisäksi soluseinämän rakenteiden perusteella Lancefieldin ryhmiin. Ryhmitys perustuu streptokokkien soluseinän antigeenisen ryhmäspesifiseen polysakkaridiin, jonka perusteella streptokokit jaetaan serologisiin ryhmiin. Lancefieldin ryhmistä käytetään erityisesti beeta-hemolyyttisiä streptokokkeja luokiteltaessa, A-, B-, C-, D-, G- ja F-ryhmiä. (Hänninen – Huovinen 1991: 13.)

Viridansryhmän-streptokokit myös kuuluvat streptokokkien sukuun. Viridansstreptokokit hajottavat punasoluja verimaljalla joko niin, että ne ovat alfa-hemolyyttisiä kuten pneumokokit tai niillä ei ole lainkaan hemolyysiä eli ne ovat nonhemolyyttisiä. Viridansstreptokokit ovat suuontelon, suoliston, emättimen ja osin ihonkin normaali-flooraa. Niiden taudinaiheuttamiskyky on varsin heikko. Kuitenkin ne voivat aiheuttaa endokardiitteja ja neutropeenisilla potilailla sepsiksiä. Kansanterveyslaitoksen sairaalainfektio-ohjelmassa peräti 22 % veriviljelyistä eristetyistä viridansstreptokokeista oli resistenttejä penisilliinille. (Huovinen ym. 2005: 127–128.) Viridansstreptokokit ja pneumokokit ovat lähisukuisia. Tällöin niiden erottaminen toisistaan tulee joskus hankalaksi. Tässä työssä tarkistan AccuProbe-menetelmän spesifisyyden viridansstreptokokin erottamiseksi pneumokokista.

2.2 Streptococcus pneumoniaen virulenssitekijät

Virulenssitekijät antavat bakteereille ominaisuuksia, joiden avulla ne voivat aiheuttaa taudin. Pneumokokilla oletetaan olevan lukuisia virulenssitekijöitä. Osa virulenssitekijöistä on bakteerisolun pinnalla ja osa vapautuu aktivoituessaan solun sisältä. Kaikki pneumokokkikannat eivät ole patogeenisia, sillä useilta kannoilta puuttuu yksi tai useampi virulenssitekijä. (Ahola 2001.)

Tärkeimpänä virulenssitekijänä pidetään bakteerin polysakkaridikapselia, joka suojaaa bakteeria isännän fagosytoosilta. Pneumokokilla on 90 erilaista kapselipolysakkaridityyppiä, joista vain osa yleisiä taudinaiheuttajia. (Huovinen ym. 2005: 120.) Kapseli koostuu muun muassa suuren molekyylipainon omaavista oligosakkaridipolymeereistä, jotka sisältävät toistuvasti kahdesta kahdeksaan monosakkaridiyksikköä. Kapselin polysakkaridiketjut ovat isäntäsoluille tunnistuskohteita, ja näin polysakkaridiketjut saavat aikaan isäntäsoluissa vasta-aineen tuotantoa. (Ahola 2001.)

Pneumokokin soluseinä koostuu pääosin peptidoglykaanista sekä pieneltä osin teikkohapoista, soluseinään kiinnittyneistä polysakkaridiketjuista ja koliiniasitovista proteiineista. Soluseinän polysakkaridit reagoivat akuutin vaiheen proteiinin CRP:n (C-reaktiivinen proteiini) kanssa, ja reaktio johtaa komplementin aktivoitumiseen. Soluseinä osallistuu kapselittoman pneumokokin kiinnittymiseen isännän epiteelisoluihin. Peptidoglykaanin johdosta grampositiiviset bakteerit ovat herkkiä penisilliinille ja sen johdannaisille. (Ahola 2001; Huovinen ym. 2005: 120, 965.)

Streptococcus pneumoniaen tuottama IgA1 -proteaasi on bakteerin kolonisaatiota edistävä sinkkimetalloproteaasi, jonka tehtävänä on pilkkoa spesifisesti isäntäsolujen immunoglobuliini-A1-proteiinien peptidisidoksia. Bakteeri ei juutu isäntäsolujen tuottamaan IgA:n ja musiinin (lima-aine) muodostamaan kompleksiin, jolloin isännän immunivaste heikkenee. (Ahola 2001.)

Pneumolysiini kuuluu grampositiivisten bakteerien patogeenisten proteiinien suureen ryhmään, sytolysiineihin. Pneumolysiini on solunsisäinen proteiini, joka vapautuu vain pneumokokkisolun hajotessa, eli bakteeri ei eritä sitä aktiivisesti. Pneumolysiini ei esiinny solun pinnassa, vaan solun sisällä, sytoplasmassa. Pneumolysiinin tuhoavat vaikutukset kohdistuvat muun muassa keuhkoihin. (Skyttä 2002: 4.) Pneumolysiini korkei-

na pitoisuuksina aiheuttaa isäntäsolun membraaniin reikiä, minkä seurauksena kohdesolu hajoaa. Pienempinä pitoisuuksina pneumolysiini saa aikaan sytokiinien tuotantoa. Pneumolysiini-negatiivisten pneumokokkikantojen on todettu olevan vähemmän virulenteja kuin pneumolysiini-positiivisten. (Ahola 2001.)

Autolysiinit kuuluvat laajaan entsyymien ryhmään, joilla on kyky pilkkoa bakteerien soluseinämän peptidoglykaanikerrosta. Autolysiinientsyymit sijaitsevat solun pintaosissa ja niiden katsotaan liittyvän moniin solun fysiologisiin toimintoihin, kuten soluseinän kasvuun, aineenvaihduntaan ja solun jakautumiseen. Sen täydellistä merkitystä bakteerisolulle ei kuitenkaan vielä tunneta, mutta fysiologisten toimintojen lisäksi se liittyy pneumokokin patogeneesiin. (Skyttä 2002: 4.)

Pneumokokilla resistenssi penisilliinille perustuu penisilliiniä sitovien proteiinien (PBP) muutokseen. Penisilliiniä sitovien proteiinien heikentynyt affiniteetti antibiooteille tekee pneumokokista resistentin. Penisilliiniä sitovat proteiinit sijaitsevat bakteerisolun soluseinässä. Pneumokokin penisilliiniresistenttyyden on osoitettu johtuvan viiden kromosomaalisen, penisilliiniä sitovan proteiinin (1A, 1B, 2A, 2X ja 2B) sekvenssin vaihteluista, jossa *pbp2b*-geenin merkitys on havaittu erityisen tärkeäksi. Diagnostiikassa *pbp2b*-geeniä voidaan hyödyntää erottamaan herkät ja resistentit kannat toisistaan. (Skyttä 2002: 5.)

3 VERIVILJELY

Veriviljelytutkimuksilla pyritään osoittamaan verenkierrossa olevia bakteereita ja hiivoja sekä tekemään niille herkkyysmäärityksiä. Näyte tulee ottaa mielellään ennen antibiootihoidon aloittamista. Käynnissä oleva antibioottihoito ei kuitenkaan ole este veriviljelyn ottamiselle. Kaksi veriviljelynäytettä 15–60 minuutin välein on yleensä riittävä määrä. Kiireellisissä tapauksissa ne voidaan ottaa samanaikaisesti molemmista käsistä. Endokardiittiepäilyssä otetaan neljä veriviljelynäytettä vuorokauden kuluessa. (Näytteenoton asiantuntijaryhmä 2006; Kauppila 2007.)

Suomessa ja muuallakin maailmassa yleisin sepsiksen (verenmyrkytys) aiheuttaja mikrobi on *Escherichia coli*. Seuraavaksi tavallisimpia ovat voimakkaasti yleistyvät koagulaasinegatiiviset staphylokokit, kuten *Staphylococcus epidermidis*, sekä määrältään mel-

ko vakaina pysyneet *Staphylococcus aureus* ja *Streptococcus pneumoniae*. Tyypillinen avohoidosta saatu sepsis on pneumokokkisepsis. Pneumokokkisepsiksen syntyyn vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa tupakointi, alkoholismi, HIV-infektio ja pernan poisto. (Meri ym. 2005: 503–504.)

Veriviljelyprosessi koostuu 1) näytteenotosta, 2) mikrobien kasvatuksesta (lisääntymisestä ravinneliemessä), 3) mikrobin kasvun osoituksesta ja 4) mikrobin tunnistuksesta (Kauppila 2007).

3.1 Näytteenotto

Näytteenotto tulee ehdottomasti suorittaa steriilisti, koska pienikin määrä mikrobia iholta ravinnerikkaaseen veriviljelypulloon päästyään alkaa kasvaa voimakkaasti ja voi johtaa väärään positiiviseen tulokseen. Ihon pistosalue ja viljelypullojen päät puhdistetaan steriilillä sidetaitoksella, joka kostutetaan 0.5 % klooriheksidiinisprihin. Veriviljely suositellaan otettavaksi alueelta, josta ei aikaisemmin ole otettu verinäytteitä. Muut laboratoriotekniikat otetaan veriviljelyn jälkeen. Veriviljelynäyte otetaan ensin aerobipulloon ja sitten anaerobipulloon, sillä neulassa oleva ilma tyhjentyy aerobipulloon. Aikuisilta otetaan näytettä 5–10 ml kumpaankin pulloon. Lapsilla näytemäärä tulee suhteuttaa lapsen painoon. Veriviljelynäytteenoton ohjeen mukaan lapsilta näytettä otetaan anaerobiseen veriviljelypulloon 5–8 ml ja lasten aerobiseen veriviljelypulloon 1–4 ml. Pulloja käännetään muutaman kerran. (Näytteenoton asiantuntijaryhmä 2006.)

Veriviljelypulloon laitetun veren tilavuus voi vaikuttaa tuloksen herkkyyteen. Jos on vähemmän verta, vähentää se viljelyn herkkyyttä, kun taas suurempi määrä verta ei välttämättä lisää herkkyyttä, koska useamman potilaan veressä olevat tekijät ja käytetyt mikrobilääkkeet lisääntyvät, seurauksena ne voivat vahingoittaa soluja eli mikrobilyysi. (XIANG 2006: 3.) Veriviljelyautomaattiin käytetään kolmea erilaista pulloa, muun muassa aerobi- ja anaerobi-pullot sekä lasten pullot, kullekin laitevalmistajalle omansa. Veriviljelypullot toimitetaan näytteenoton jälkeen välittömästi veriviljelyautomaattiin. Mikäli tämä ei ole mahdollista, pullot tulee säilyttää kuljetusta odottaessa huoneenlämmössä vaakasuorassa asennossa. (Näytteenoton asiantuntijaryhmä 2006; Huovinen ym. 2005: 30.)

3.2 Mikrobin kasvatus

Eri mikrobit ovat ravinne- ja happivaatimuksiltaan erilaisia. Suurin osa merkittävistä patogeeneistä kasvaa kuitenkin hyvin nykyisissä kaupallisissa veriviljelyelatusaineissa. Mykobakteereita varten on kehitetty oma elatusaineensa, samoin joillakin kaupallisilla valmistajilla on erityiselatusaineet sienille. Suurin osa merkittävistä patogeenisistä hii-voista kasvaa kuitenkin hyvin tavallisissa aerobiveriviljelypulloissa. (Kauppila 2007.)

Veressä on monia mikrobin kasvua estäviä tai haittaavia tekijöitä esimerkiksi leukosyytit, vasta-aineet ja muut immuunipuolustuksen osatekijät. Lisäksi potilasta voidaan hoitaa antibiooteilla tai sytostaateilla, jotka voivat estää mikrobin kasvua veriviljelyssä. Näiden tekijöiden eliminoimiseksi tai pitoisuuksien alentamiseksi on joihinkin veriviljelypulloihin lisätty erilaisia aineita, muun muassa SPS (sodium polyanetholsulfonate) ja aktiivihiihtä. SPS on monipuolinen tekijä veriviljelyelatusaineissa, sillä SPS:llä on antikoagulantti-, antikomplementti- ja antifagosyyttiominaisuus. Se myös inaktivoi lysosyytimejä, aminoglykosideja, ja polymeysiiniä. (Pien ym. 2007.)

Viljely tapahtuu +35–37 °C:een lämpötilassa, jossa valtaosa mikrobeista kasvaa optimaalisesti. Täytyy muistaa, että mikrobin kasvu alkaa heti, kun näyte saadaan pulloon, eikä vasta siinä vaiheessa kun pullo laitetaan inkubaattoriin. Automatisoiduilla systeemeillä saadaan joskus vääriä negatiivisia tuloksia, kun pullon asentaminen automaattiin viivästyy esimerkiksi pitkän kuljetusmatkan vuoksi. Tällöin mikrobi on ehtinyt kasvuun stationaariseen vaiheeseen ennen pullon asentamista automaattiin, eikä automaatti enää tunnista mikrobien lisääntymistä pullossa. Yleinen suositus on, että pullo tulisi laittaa automaattiin viipymättä, ja mikäli kuljetus automaatille kestää kauan, kuljetus ja säilytys ennen kuljetusta tapahtuisivat enintään huoneenlämmössä, jolloin mikrobin kasvu on hitaampaa. (Kauppila 2007.)

3.3 Veriviljelykasvun osoitus

Veriviljelykasvun osoittamista varten potilaan verinäyte viljellään veriviljelypullossa. Manuaalisissa systeemeissä mikrobikasvu voidaan todeta vain mikroskopoimalla ja viljelemällä pullon sisältö maljoille. (Kauppila 2007.) Automatisoidut systeemit hälyttävät havaitessaan pullossa mikrobikasvua esimerkiksi hiilidioksidin tuoton perusteella. Au-

tomatisoiduissa systeemeissä väärin positiivisten määrä on 1–10 %. (Karahan ym. 2005.)

Ajankohta, jolloin veriviljelmä havaitaan positiiviseksi, riippuu mikrobilajista sekä sen alkuperäisestä määrästä veressä. Suurin osa tavallisimmista veriviljelyllä löytyvistä merkittävistä bakteereista esimerkiksi *E. coli* ja *S. aureus* voidaan osoittaa ensimmäisen 12 tunnin sisällä näytteenotosta. Sienet, anaerobibakteerit ja jotkut hidaskasvuisemmat aerobiset bakteerit voivat vaatia 2–3 vuorokauden kasvatuksen, ennen kuin kasvu on osoitettavissa. (Kauppila 2007.)

Kasvu aika voi olla pitkä myös, jos mikrobia on päässyt pulloon hyvin pieni määrä iho-kontaminaationa. Tätä tietoa voidaan käyttää hyväksi silloin, kun arvioidaan veriviljelylöydöksen merkittävyyttä kliinisiin oireisiin nähden. (Kauppila 2007.) Veriviljelyn näytteenottoon liittyvät kontaminaatiot ovat varsin yleisiä (10–20 % kaikista positiivista vastauksista). Erityisesti koagulaasinegatiivinen stafylokokki vain yhdessä veriviljelynäytteessä aikaisemmin terveellä potilaalla on usein kontaminaatio. Grampositiiviset sauvabakteerit aikaisemmin terveellä potilaalla ovat usein myös peräisin potilaan iholta. (Hautala 2007.)

Hiilidioksidipitoisuuden nousu pullossa voi johtua muusta kuin mikrobikasvusta. Tavallisin väärin positiivisten tulosten syynä on voimakkaasti jakautuvien leukosyyttien aineenvaihdunta hematologista malignoomaa sairastavilla potilailla. (Kauppila 2007.)

3.4 Veriviljelykasvun tunnistus

Automaatin positiivisiksi toteamat pulloet tutkitaan perinteisillä tutkimusmenetelmillä. Positiivisen pullon näyte värjätään gramvärjäyksellä. Mikäli värjäystulos on epäselvä, tehdään toinen preparaatti, joka värjätään akridiinioransivärjäyksellä. Niistä tehdään maljaviljelmät mikrobittunnistusta ja antibioottiherkkyyttä varten. Positiivisesta pullosta tehdään värjäystä ja viljellään suklaamaljalla ja FAA-maljalla. Selvän värjäyksen perusteella tehdään jatkotutkimuksia ja viljelyjä. (Hautala 2007.) Mikäli perinteisillä menetelmillä ei voi tunnistaa bakteerilajin esimerkiksi kun värjäys ei ole selvä eikä maljoilla ole mitään kasvua, silloin selvitetään bakteerilaji PCR-menetelmällä. (Veriviljelypisteen työohje 2009.)

3.5 Automaattinen veriviljelyjärjestelmä

Nopea mikro-organismien havaitseminen verestä on yksi tärkeimmistä tehtävistä diagnostiikkaa tekevissä mikrobiologian laboratorioissa. Automaattinen veriviljelyjärjestelmä toteuttaa tämän tärkeän tehtävän vähentämällä tarvittavan positiivisen veriviljelyn osoittamiseen kestävää aikaa ja vähentämällä kasvatusmaljan käsittelyä. (Karahan ym. 2005.)

Automaattisia veriviljelyjärjestelmiä on kaksi BACTEC 9000 (Becton Dickinson) ja BacT/ALERT (Biomé'rieux), jotka ovat laajalti käytössä. Molemmat systeemit ovat täysin automaattisia. Molemmissa laitteissa organismien kasvun seuranta toteutuu mittaamalla CO₂:n tuotantoa. BacT/ALERT 3D -systeemissä on käytössä kolorimetriset anturit (colorimetric sensor) ja BACTEC-systeemissä CO₂ kasvu mitataan fluoresensianturin avulla (fluorescent sensor). (Karahan ym. 2005; Koneman ym. 2005: 104.)

BacT/ALERT on ensimmäinen veriviljelyyn tarkoitettu automaattianalysaattori, joka on kehitetty Yhdysvalloissa (Koneman ym. 2005: 104). BacT/ALERT on käytössä monissa kliinisissä laboratorioissa Suomessa, muun muassa HUSLAB Bakteriologian osaston veriviljely-yksikössä.

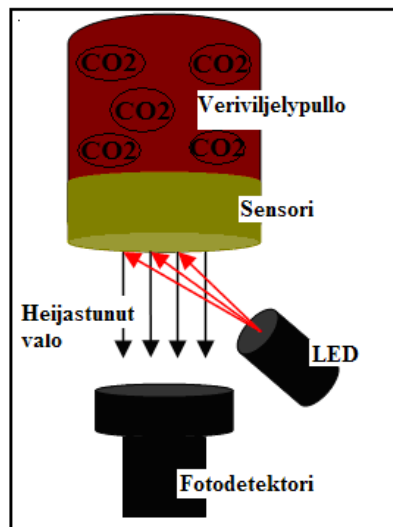
3.6 BacT/ALERT 3D -veriviljelylaite

BacT/ALERT 3D on uuden sukupolven veriviljelylaitteisto, joka on suorituskykynsä ja ominaisuuksiensa vuoksi Suomessa laajasti käytössä. Järjestelmä on non-invasiivinen, eli kun näytepullo on laitettu inkuboitumaan, käyttäjän ei tarvitse siihen puuttua, ennen kuin järjestelmä ilmoittaa pullon positiiviseksi tai lopullisesti negatiiviseksi. (BacT/ALERT 3D 2002.)

BacT/ALERT 3D -veriviljelylaitteiston toimintaperiaatteessa mikrobikasvu todetaan mittaamalla mikrobien aineenvaihduntatuotteita. Jos viljeltävässä näytteessä on mikrobeja, ne tuottavat hiilidioksidia metaboloidessaan ravintoliemen substraatteja. CO₂-tuoton seurauksena pullon pohjassa oleva sensori alkaa muuttaa väriään sinivihreästä vaaleampaan keltaiseen. Laitteen jokaisessa solussa on reflektometri, joka seuraa jatkuvasti tunnistimen värin vaihteluja. Valolähde (LED) lähettää valoa jatkuvasti pullon pohjaan, ja vastaavasti fotodetektorilla mitataan jatkuvasti pohjasta heijastunutta valoa (ku-

vio 2). Mitä suurempi CO₂-tuotto, sitä enemmän valoa heijastuu. (BacT/ALERT 3D 2002.)

Positiivinen pullo havaitaan kolmella eri tavalla: 1) mikrobien lisääntyessä CO₂-pitoisuuden muutos on kiihtyvää, 2) CO₂-pitoisuus on suurempi kuin laitteeseen asetettu positiivisuuden raja tai 3) CO₂-pitoisuus lisääntyy jyrkästi (kasvukäyrän kulmakerroin suurempi kuin koneelle ohjelmoitu). Ellei CO₂-taso nouse tai ei ole kiihtyvää kasvatuksen aikana, ilmoitetaan pullo negatiiviseksi käytetyn viljelyajan loputtua. (BacT/ALERT 3D 2002.)

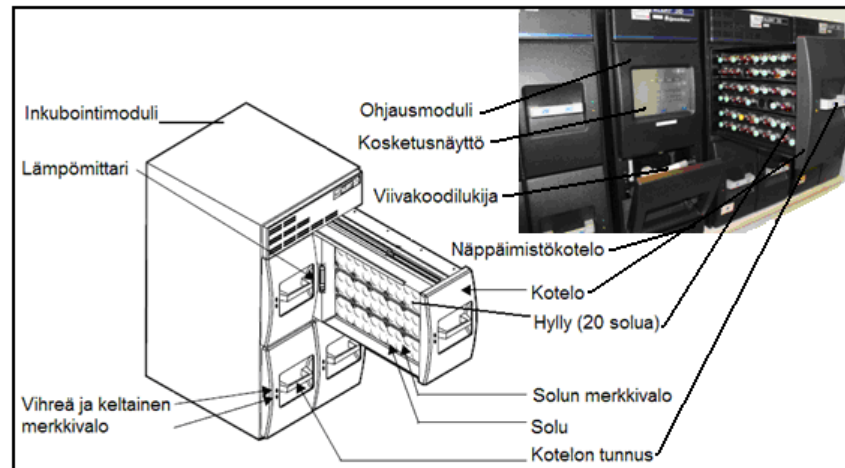


KUVIO 2. BacT/ALERT 3D -veriviljelylaitteiston reflektometrin toimintaperiaate.

Pulloja inkuboidaan automaattisesti yhteensä 5,5 vuorokautta tai kunnes automaatti ilmoittaa, että näyte on positiivinen. Kasvatusaika muutetaan jos lähettäjä ilmoittaa jonkin syyn poikkeavaan kasvatusaikaan, esimerkiksi jos potilaalla epäillään endokardiittia tai brucella-infektiota. (Veriviljelypisteen työohje 2009.)

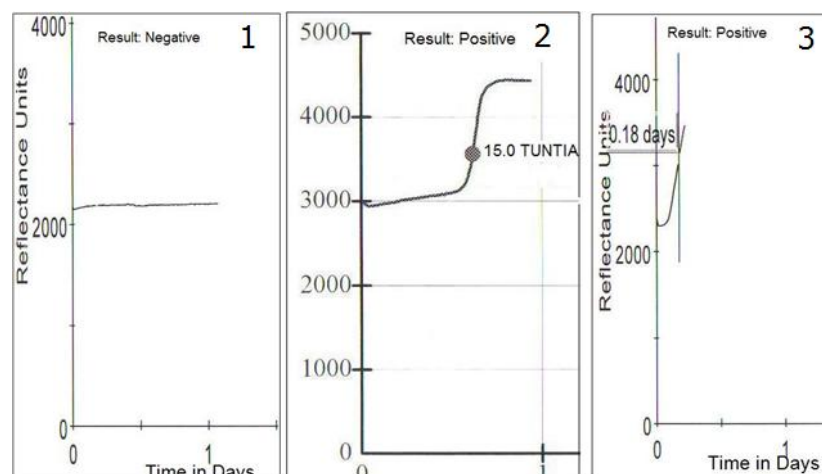
BacT/ALERT 3D -järjestelmään kuuluu ohjausmoduli ja vähintään yksi inkubointimoduli. Yhden inkubointimodulin kapasiteetti on 240 pulloa. Ohjausmoduliin voidaan kytkeä kuusi inkubointimodulia. Inkubointimoduli sisältää neljä koteloa. Kussakin kotelossa on kolme hyllyä, joka sisältää 20 solua eli yhden kotelon kapasiteetti on 60 pulloa (kuvio 3). Solussa on solun sisäkalvo, joka tunnistaa pullon olevan solussa. Järjestelmä ei vaadi ulkoista tietokonetta, mutta tietokoneen käyttö yhdessä observa-ohjelmiston kanssa parantaa merkittävästi tietokantaominaisuuksia. (BacT/ALERT 3D 2002.)

BacT/ALERT 3D -laitteessa ei ole tarpeellista kalibroida soluja systemaattisesti. Solu pitää kalibroida ainoastaan silloin, kun laite ilmoittaa solusta, jonka sisäinen kontrolli on epäonnistunut. Solu, jonka sisäinen kontrolli tai kalibrointi on epäonnistunut, ei mittaa solussa olevaa pulloa, siksi on välttämätöntä, että viallinen solu kalibroidaan tai sammutetaan. (BacT/ALERT 3D 2002.)



KUVIO 3. BacT/ALERT 3D -veriviljelylaitteisto (BacT/ALERT 3D 2002).

Pullon pohjan tunnistimen värin vaihtelussa mittaustulokset (reflektanssilukemat) näkyvät tietokoneelta kasvukäyränä. Kasvukäyrän Y-akselin oletusarvo on 0 – 5000 RU (Reflectance units) eli heijastumisen valon yksikkö ja X-akselin 0 – Maksimi testiaika (päivä tai tunti). Jos pullo on määritetty positiiviseksi, tällöin yksi piste ja toteamiseen käytetty aika näkyvät kyseessä olevassa kohdassa käyrällä. (BacT/ALERT 3D 2002.) Kuviossa 4. esitetty kaksi positiivista ja yksi negatiivinen käyrä. Ensimmäinen on negatiivinen käyrä. Toinen on positiivinen käyrä, jossa veriviljelypullo on tullut positiiviseksi 15 tunnissa. Kolmas on positiivinen käyrä, jossa veriviljelypullo on tullut positiiviseksi nopeasti 0,18 päivässä eli noin neljä ja puoli tunnissa.



KUVIO 4. Veriviljelyautomatin kasvukäyrä (potilaiden veriviljelytulospäiväkäyriä 2009).

4 PNEUMOKOKIN PERINTEISET TUNNISTUSMENETEMÄT

Positiivisesta veriviljelypullosta tehdään perinteisiä tutkimusmenetelmiä bakteerin tunnistamista varten. Pneumokokin perinteiset tunnistusmenetelmät ovat fysiologisia ja biokemiallisia menetelmiä. Näitä ovat pesäkkeen morfologia, värjäys (Gram- ja Akriidiinioranssivärjäys), katalaasikoe, alfa-hemolyysi verimaljalla, optokiiniherkkyys, sappiliukoisuus sekä antigeeniosoistus (latex). (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

4.1 Pesäkemorfologia ja alfa-hemolyysi

Verimaljalla yli yön kasvanut pneumokokkipesäke on muodoltaan säännöllisen pyöreä, keskellä on laakea syvennys ja reunoilla matalat vallit. Pesäkettä ympäröi vihertävä alfa-hemolyysi. (Huovinen ym. 2005:123.) Pneumokokki on alfa-hemolyyttinen streptokokki (kuvio 1). Alfa-hemolyysi havaitaan vertasisältävällä verimaljalla bakteeripesäkkeiden ympärillä punasolujen epätäydellisenä hajoamisena. (Hänninen – Huovinen 1991: 13.) Viridans-streptokokit myös hajottavat punasoluja verimaljalla joko osittain eli alfa-hemolyysi tai ei lainkaan eli nonhemolyysi (Huovinen ym. 2005: 128).

4.2 Gramvärjäys

Gramvärjäys on kliinisen bakteriologian yksinkertaisin, halvin ja tärkein pikatesti. Gramvärjäys erottelee bakteerit soluseinän rakenteen perusteella kahteen eri luokkaan muun muassa grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin. Värjäys perustuu grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteerien soluseinän perusrakenteen eroon. (Meri ym. 2005: 21–22.)

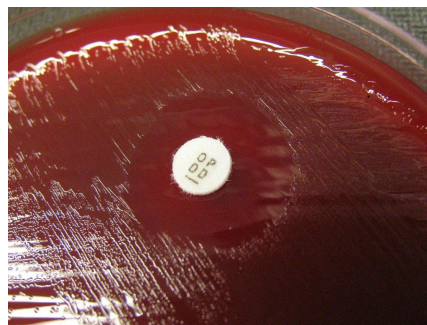
Gramvärjäyksessä objektilasille kiinnitetään bakteerinäyte esimerkiksi kuumentamalla, värjätään ensin emäksisellä kristallivioletilla. Seuraavaksi väri kiinnitetään jodikaliumjodidiliuoksella. Tämän jälkeen näyte huuhdellaan asetoni-alkoholiseoksella. Grampositiiviset bakteerit säilyttävät tällöin violetin värinsä, mutta gramnegatiivisista se huuhtoutuu pois. Lopuksi näyte värjätään punaisella safraniinilla, joka saa gramnegatiiviset bakteerit näkyviin punaisina. Grampositiivisten bakteerien soluseinässä on useita kymmeniä päällekkäisiä peptidoglykaanikerroksia, kun gramnegatiivisilla bakteereilla kerroksia on vain yksi. Grampositiiviset bakteerit näkyvät mikroskoopissa sinisen violetteina, gramnegatiiviset punaisina. (Meri ym. 2005: 22.)

4.3 Akridiinioranssivärjäys

Gramväreillä heikosti värjäytyvät bakteerit saadaan akridiinioranssilla näkyviin. Akridiinioranssivärjäyksen tärkein käyttöalue on bakteerien ja hiivojen nopea osoittaminen etenkin normaalisti kehon eritteistä ja steriileistä nesteistä, kuten verestä tai nivelnesteestä. Menetelmän etuna on suuri herkkyys ja lisäksi akridiinioranssivärjäys auttaa gramvärjäystä paremmin erottamaan mikrobit esimerkiksi runsaan kuolleen kudoksen seasta. Väriaine sitoutuu happamassa liuoksessa DNA:han. Bakteerit ja hiivat hohtavat akridiinioranssivalmisteen fluoresenssimikroskopiassa kirkkaan oransseina, kun taas nisäkäsperäinen DNA kuten märkänäytteessä leukosyytin tuma näyttää vihreältä tai kellertävältä. (Meri ym. 2005: 22.)

4.4 Optokiinitesti ja katalaasikoe

Optokiinitestin periaatteena on optokiinin (etyylihydrokupraanihydrokloriidi) kyky estää pneumokokin kasvua hyvin pieninä pitoisuuksina (Keski-Vinkka 1999: 10). Optokiinitestissä viljellään tunnistettavasta pesäkkeestä bakteerimassa tasaiseksi matoksi verimaljalle ja viljelmän päälle laitetaan optokiiniekko. Pneumokokkia epäiltäessä veressä herkkyysmääritys tehdään suoraan veriviljelypullon näytteestä ja optokiiniekko verimaljalle. (Veriviljelypisteen työohje 2009.) Maljaa inkuboidaan yli yön +35 °C:ssa CO₂ –atmosfäärissä, minkä jälkeen muodostuneen estorengaan halkaisija mitataan. Jos estorengas on tiettyä rajaa suurempi, kyseessä on pneumokokki. (kuvio 5) Estorengaan halkaisija on riippuvainen käytetyn kiekon optokiinipitoisuudesta. (Skyttä 2002: 8.)



KUVIO 5. Pneumokokin optokiinitesti verimaljalla (Bakteriologian osastolla otettu kuva 2009).

Optokiiniresistenttejä pneumokokkeja esiintyy, mutta ne ovat harvinaisia. Optokiini saattaa myös ehkäistä joidenkin viridans-streptokokkien kasvua, mutta paljon suurempina pitoisuuksina. Joillakin viridans-streptokokeilla voi olla kapea estovyöhyke. Tä-

män takia on kiinnitettävä huomiota myös pesäkkeen ulkonäköön ja muihin pneumokokin tunnistustestien tuloksiin. (Keski-Vinkka 1999: 10.)

Katalaasikokeen avulla todetaan, tuottaako bakteeri katalaasientsyymiä. Katalaasi hajottaa vetyperoksidin vedeksi ja hapeksi. Happi todetaan kaasukuplien muodostumisena. Katalaasikoetta käytetään grampositiivisten kokkibakteerien erottelussa. Enterokokit ja streptokokit eivät tuotaa katalaasia, mutta stafylokokit tuottavat. Pneumokokki on siis katalaasinegatiivinen bakteeri. (Katalaasikoe 1999.)

4.5 Lateksiagglutinaatiokoe

Pneumokokin kapselipolysakkaridiantigenejä sekä pneumokokeille yhteistä C-polysakkaridia voidaan osoittaa immunokemiallisesti. Antigeenin osoituksen herkkyys viljelyyn verrattuna on 80–90 % menetelmän mukaan. Lisäksi antigeenin osoitus voi antaa positiivisen tuloksen potilailla, joilla antibioottihoito on aloitettu ennen näytteenottoa. Sairaalahoitoon otetuilta keuhkokuumepotilailta tulisi aina ottaa veriviljelynäyte ja etsiä virtsan pneumokokkiantigeneja. (Huovinen 2005: 123.)

Lateksiagglutinaatiokokeessa vasta-aineen (tai antigeenin) esiintymistä tutkitaan antigeenilla (tai vasta-aineella) päällystettyjen lateksipartikkeleiden tarttumisella toisiinsa (Huovinen ym. 2005: 958). Testiä käytetään pneumokokin tunnistamiseen. Testin periaatteena on pneumokokkisuspension sakkauttaminen pneumokokkiantiseerumilla päällystetyillä latex-partikkeleilla. Latex-partikkelit kiinnittyvät Pneumokokin kapselipolysakkaridiantigeneihin, jolloin syntyy sakka eli agglutinaatio. (Keski-Vinkka 1999: 11.) Pikatestin käyttöohjeen mukaan voi käyttää suoraan sekä veriviljelynäytettä että pesäkettä. Testipakkauksessa on positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Väärä positiivinen tulos voidaan joskus nähdä testissä, jos näytteessä oli muita bakteerilajeja, muun muassa C-ryhmän *streptokokit*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* ja *Streptococcus milleri*. (Slidex pneumo-Kit 2004.)

4.6 Sappiliukoisuustesti

Pneumokokin erottamiseen muista alfa-hemolyttisistä streptokokeista käytetään myös sappiliukoisuustestiä. Pneumokokki liukenee sapon (10 % natriumdeoksikolaati) läsnä

ollessa autolyyttisen entsyymin toiminnan tuloksena. Pneumokokki on sappiliukoinen, mutta muut alfa-hemolyyttiset bakteerit eivät pääsääntöisesti liukene sappeen. (Skyttä 2002: 8.) Menetelmä ei ole tarpeeksi spesifinen, sillä joidenkin kantojen pneumokokki-bakteerit eivät antaa positiivisia sappiliukoisuustuloksia ja toisaalta on myös sellaisia viridas-streptokokkia, jotka liukenevat sappeen. Tämän takia on huomioitava myös muihin testientuloksiin. (Cheesbrough 2006.)

Koeputkimenetelmässä otetaan steriiliin silmukkaan runsaasti bakteerimassa tunnistettavasta pesäkkeistöstä. Suspensoidaan se 2 ml steriiliä keittosuola putkessa. Jaetaan seos kahteen putkeen. Toiseen putkeen (testiputki) tiputetaan 2 tippaa sappi reagenssia ja toiseen putkeen (negatiivinen kontrolli) 2 tippa steriilivettä. Sekoitetaan putket kevyesti ja inkuboidaan putkea 10 – 15 minuuttia 35 – 37 °C. Mikäli testiputken sameus hävisi kontrollin vertailemalla, on tunnistettava bakteeri sappiliukoinen. Sappi liukoisuustesti voidaan suorittaa myös tiputtamalla sappireagenssi suoraan pesäkkeille. Mikäli inkubaation aikana pesäkkeet hajoavat, on tunnistettava bakteeri sappiliukoinen. (Cheesbrough 2006.)

5 GEENITUNNISTUSMENETELMÄT

Suurin osa mikro-organismeista voidaan tunnistaa kliinisen mikrobiologian laboratoriossa perinteisiä tunnistusmenetelmiä käyttäen. Kuitenkin perinteisillä tunnistusmenetelmillä eli viljelyyn perustuvalla menettelytavalla voi kestää kauan tunnistaa hidaskasvuisia bakteereita. Perinteisellä menetelmällä ei voi tunnistaa niitä, joita ei voi viljellä. Nukleiinihappokoettimeen perustuva tutkimusmenetelmä tarjoaa nopean keinon havaitsemaan niitä mikro-organismeja. Geneettiset tutkimusmenetelmät, joissa on käytössä nukleiinihappokoettimia, voidaan käyttää tunnistamassa mikro-organismeja muun muassa suoraan maljoilta, viljelystä tai formaliinilla kiinnitetyistä ja parafiiniin valetuista kudoksenäytteistä. (Hong 2006: 134.)

5.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Polymeraasiketjureaktiolla monistetaan DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden oligonukleotidialukkeen välissä. Oligonukleotidi on lyhyt, synteettinen DNA-molekyyli, joka koostuu maksimissaan noin 150 nukleotidista. Monistettavan DNA-jakson pituus voi

vaihdella alle sadasta emäsparista tuhansiin emäspareihin. PCR-menetelmässä käytetään kahta aluketta, jotka sitoutuvat kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin, mutta eivät kuitenkaan samaan kohtaan, vaan monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso on se, jota monistetaan. Kaksijuosteinen DNA toimii templaattina. Alukkeet sitoutuvat templaattiin, sitten kun ensin denaturoidaan DNA kaksoisjuosteet toisistaan kuumennuskäsittelyllä. Alukkeet kiinnittyvät templaattiin, kun lämpötilaa lasketaan hetkellisesti eli tehdään lyhyt annealing-reaktio. Kun alukkeet ovat saaneet vähän aikaa kiinnittyä, nostetaan taas lämpötilaa (noin 72 °C:seen, riippuu hieman käytetystä entsyymistä), jolloin DNA-polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukseen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaan. Tätä vaihetta kutsutaan pidennysreaktioksi. Templaatin kummallekin nauhalle syntyy vastinnauha, toinen toisen alukseen avulla ja toinen toisen alukseen avulla. Nauhan synteesi on valmis parin minuutin kuluttua. Nostetaan taas lämpötila noin 90 °C:seen, eli kaikki nauhat irrotetaan toisistaan. (Suominen – Ollikka 2004: 107–108.)

Sarjaa denaturointi-annealing-pidennys kutsutaan sykliksi. PCR-menetelmän tuloksena, yleensä 15–40 syklin jälkeen saadaan alun perin hyvin pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistettua suuri määrä tarkalleen määrätyn pituisia DNA-jaksoja. PCR-tekniikalla monistetut näytteet analysoidaan useimmiten elektroforeesin avulla, jolla saadaan tuntemattoman DNA-jakson koko. Agarosigeelielektroforeesin käytössä DNA-kokostandardin avulla, kun standardin pilkkoutumistuotteiden koot tunnetaan tarkalleen, löydetään tuntemattoman DNA-jakson koko. (Suominen – Ollikka 2004: 107–108, 72–76.)

PCR-menetelmän avulla monistetaan mikrobin genomista kiinnostava geeni tai geenin osa. Monistetun osan emäsjärjestyksen eli sekvenssin perusteella voidaan päätellä mikrobin laji, mikrobilääkeresistenssi ja virulenssi. Ribosomaalisesta DNA:sta löytyy alueita, jotka ovat yhteisiä kaikille bakteereille. Käyttämällä näitä alueita PCR alukkeiden sitoutumiskohtina, voidaan monistaa minkä tahansa bakteerin geeni ja selvittää sisältääkö näyte esimerkiksi bakteereita vai ei. (Viljanen 1995.)

Ribosomaalinen DNA (rDNA) on ribosomaalista RNA:ta koodaava geeni. Ribosomaalinen DNA-sekvenssit ovat evoluution aikana säilyneet lähes muuttumattomina. Monistamalla näitä geenialueita PCR-menetelmällä voidaan näytteestä tunnistaa bakteereita, joiden tunnistaminen perinteisellä menetelmällä on hankalaa, hidasta tai mahdotonta.

Tutkimus soveltuu muuten steriileiltä alueilta otettuihin näytteisiin, jos on epäily bakteeri-infektiosta, erityisesti jos bakteeriviljely on negatiivinen esimerkiksi antibiootihoidon tai näytteessä mahdollisesti esiintyvän bakteerin vaikean viljeltävyyden vuoksi. (Bakteerin nukleiinihapon osoitus 2007.) Esimerkiksi pneumokokki on erittäin herkkä pienillekin bakteerilääkepitoisuuksille. Pneumokokin nukleiinihapon osoituksen PCR-menetelmällä on viimeaikaisissa tutkimuksissa osoitettu toimivan hyvin muun muassa korvamärkänäytteistä ja sepsispotilaiden verestä tehtynä. (Huovinen ym. 2005:123.)

PCR-menetelmän käyttöönoton jälkeen ja sen pohjalta on kehitetty useita muita nukleiinihappomonistustekniikoita, kuten ligaasiketjureaktio (ligase chain reaction, LCR) ja reaaliaikainen PCR. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä fluoresoivaa koetinta käyttämällä voidaan monistusta seurata reaaliajassa koeputkea avaamatta. Näin voidaan muun muassa vähentää geenimonistukseen liittyviä vääriä positiivisia tuloksia. (Nikkari 2002.) Reaktiossa on mukana DNA:han sitoutuvia fluoresoivia detektoreita. Mittaamalla fluoresenssia joka syklin jälkeen voidaan seurata tuotteen monistumista PCR-reaktion aikana. (Pihlaja 2009.) Tällä menetelmällä osoitetaan bakteerille ominainen geeni. Esimerkiksi *Streptococcus pneumoniae* tunnistamisessa Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä alukkeilla monistuu autolysiini (lyt A)-geeni. (Tarkka – Haverinen 2008.)

Yleisbakteeri-PCR-menetelmä tehdään silloin kun epäillään steriilin alueen bakteeri-infektiota, varsinkin bakteeriviljelyn jäädessä negatiiviseksi. Yleisbakteeri-PCR perustuu alukkeisiin, jotka tunnistavat 16S rRNA-geenialueen konservoituja alueita. Monistuva fragmentti sisältää myös muuttuvaa geenialuetta, jota voidaan käyttää apuna bakteerien lajitunnistuksessa sekvensoinnilla. Menetelmää voidaan käyttää bakteeripuhdasviljelmän lajitunnistukseen sekä bakteerien osoittamiseen ja tunnistamiseen steriilin alueen näytteestä. Tällä menetelmällä pystytään toteamaan lähes kaikki bakteerilajit. Tarvittaessa voidaan sekvenssikirjastosta varmistaa alukkeiden sopivuus, mikäli näytteestä etsitään jotain tiettyä harvinaista bakteeria. (Tarkka – Haverinen 2008.) Tämä menetelmä ei kuitenkaan erottele pneumokokkia riittävän hyvin lähisukuisista viridansryhmän streptokokeista ja siksi pneumokokin tunnistamiseen käytetään HUSLABissa autolysiinigeenin osoittamista. (Tarkka 2009.)

5.2 Nukleiinihappojen hybridisaatiotekniikat

Hybridisaatio perustuu siihen, että eri lähteistä peräisin olevat yksinauhaiset tai esimerkiksi kuumennuskäsittelyllä yksinauhaiseksi denaturoidut nukleiinihapot pystyvät liittymään toisiinsa eli hybridisoitumaan, mutta vain jos yhteenliittyvät ovat toisilleen komplementaariset. Jos toinen hybridisoituvista nauhoista on leimattu radioaktiivisesti, syntynyt hybridi voidaan havaita leimatun nauhan lähettämän säteilyn avulla. Leimattua nauhaa kutsutaan koettimeksi (probe). Nukleiinihappojen leimaukseen on olemassa myös useita menetelmiä, joilla hybridin havaitseminen tapahtuu esimerkiksi valo- tai värireaktion tai leiman aiheuttaman fluoresenssin perusteella. Hybridi voi koostua kahdesta DNA-molekyylisestä, kahdesta RNA-molekyylisestä tai yhdestä DNA- ja yhdestä RNA-molekyylisestä. (Suominen – Ollikka 2004: 114.)

Hybridisaatio-olot valitaan siten, että koetin sitoutuisi mahdollisimman tehokkaasti ja spesifisesti. Hybridisoitumiseen vaikuttavat muun muassa lämpötila, hybridisaatiopuskurin ionivahvuus, tutkittavan alueen ja koettimien pituus, sekä GC-pitoisuus. Adeniini-tyymiiniemäsparin välillä on kaksi vetysidosta ($A=T$), kun guaniini-sytosiiniemäsparin välillä niitä on kolme ($G=C$). Emästen välisidosten määrän perusteella A-T-parin emäkset irtoavat toisistaan helpommin kuin G-C-parin. Hybridisaatiossa käytetään usein myös formamidia, jonka avulla voidaan alentaa muuten hankalan korkeita hybridisaatio- lämpötiloja. (Suominen – Ollikka 2004: 114 – 115, 20.)

5.2.1 Hybridisaatiomenetelmän muodot

Nukleiinihapon hybridisaatiomenetelmä voidaan suorittaa muutamissa muodoissa. Liuoshybridisaatio on menetelmä, jossa koetin ja tutkittava juoste ovat vapaasti vuorovaikutuksessa (solution hybridization), tai koettimet ovat vapaita ja tutkittavat nukleiinihapot sitoutuvat kiinteään pintaan (solid-support hybridization). In situ hybridisaatiomenetelmässä (in situ hybridization) näytteenä on ehjä solu tai kudoksenäyte, joista voidaan suoraan havaita nukleiinihappoja. (Hong 2006: 135.)

Kova-kiinnitys hybridisaatiomenetelmässä (solid-support hybridization) leimattua koetin-DNA:ta tai RNA:ta käytetään detektoimaan (havaitsemaan) kalvolle sitoutuneet, koettimelle komplementaariset DNA- tai RNA-alueet. Tällaisessa menetelmässä epäkomplementaariset hybridisaatiot pestään pois. (Suominen – Ollikka 2004: 114–115.)

In situ hybridisaatio -menetelmää (ISH) käytetään nukleiinihappojaksojen tunnistamiseen parafiinileikkeistä patologian laboratorioissa. Menetelmä, jossa koetin on leimattu fluoresoivalla merkkiaineella, on fluoresenssi in situ hybridisaatio -menetelmä (FISH). Koetin voidaan leimata esimerkiksi digoksinin- tai biotin -molekyylillä, jotka tunnistetaan näyteleikkeessä immunohistokemiallisesti. Tällöin puhutaan kromogeenisestä in situ hybridisaatio-menetelmästä. (CISH). (Jumppanen 2007.)

Liuoshybridisaatio -menetelmä suoritetaan alusta loppuun asti nestemäisessä liuoksessa. Varsinaisen hybridisaation jälkeen sitoutumattomat koettimet poistetaan. Gen-Probe menetelmässä sitoutumattomat koettimet poistetaan lisäämällä hydrolysoiva reagenssi. Gen-Probe liuoshybridisaatio -menetelmässä käytetään ns. HPA (Hybridization Protection Assay) -menetelmää koettimen havaitsemiseen. HPA systeemi on lisännyt hyvin Gen-Probe menetelmän sensitiivisyyttä, mikä antaa mahdollisuuden käyttää korkeaa kemiluminosenssi-signaalia. (Hill 1996.)

5.2.2 Ribosomaalinen RNA tärkeänä kohteena mikrobilajin määrittämisessä

Ribosomit ovat hyvin säilyneitä ja välttämätön soluelin, joka on vastuussa proteiinisynteesistä. Bakteerin ribosomi koostuu useista ribosomi-proteiineista ja kolmesta ribosomiRNA:sta 23s rRNA, 16S rRNA ja 5S rRNA. Kasvavissa bakteerissa löytyy jopa 104 – 105 kappaletta 5S, 16S, ja 23s rRNA:ta. (Hong 2006: 134–135.)

16S ja 23s rRNA molekyylit koostuvat muuttuvasta sekvenssistä, joka heijastaa alkupe räisiä fylogeneettisiä eli perinnöllisiä ominaisuuksia. Sekvenssien vaihtelu mahdollistaa koettimien suunnittelun erilaisia mikrobilajeja kohtaan niiden tunnistamista varten. (Hong 2006: 134–135.)

Ribosomaalisen RNA:n 16S-yksikköä koodittava geeni eli 16S rDNA on tunnetuin ja ylivoimaisesti eniten käytetty geeni bakteereiden luokittelussa. Luokittelun tarkoitus on jaotella bakteerit käytännöllisiin ryhmiin, joilla on yhteyttä bakteereiden lajinkehitykseen. Tämän geenin sekvenssien erot eri lajien välillä korreloivat hämmästyttävän hyvin lajien väliseen DNA-homologiaan. (Huovinen ym. 2005: 90 – 94.) Kullakin bakteerilajilla on ainutlaatuinen 16S rDNA sekvenssi. Nämä ominaisuudet tekevät siitä hyvän merkkiaineen bakteerien tunnistamiseen. Mitä pitempi 16S rDNA:n sekvenssi määritetään, sitä tarkempi on tunnistaminen. Yleensä vähintään 200 bp (emäspari) tarvitaan,

jotta saadaan mielekkäitä tuloksia. Kattava ja tarkka tietokanta on välttämätöntä bakteerin tarkkaan tunnistamiseen. (XIANG 2006: 324.)

On useita julkisia ja yksityisiä tietokantoja käytettävissä, kuten GenBank, Ribosomal Database Project (RDP), Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM), ja muut. Niiden kautta löytyy esimerkiksi kohteena olevan organismin ainutlaatuinen sekvenssi. (XIANG 2006: 324.)

Joidenkin bakteerilajien yhden suvun tai jopa eri sukujen 16S rDNA sekvenssit voivat olla samanlaisia, jotka tekevät ainoastaan sekvensointianalyysiin perustuvan kantojen erottamisen vaikeaksi, esimerkiksi, *E. coli* ja *Shigella flexneri*. Niillä on sama 16S rDNA sekvenssi ja korkea koko genomien samankaltaisuus. Näin ollen samanlaisten 16S rDNA-sekvenssisten bakteerien läsnäolossa kannattaa tehdä lopullinen tunnistus viljelyn- ja fenotyypityksen ominaisuuksien perusteella. (XIANG 2006: 328.) Samaa ongelmaa esiintyy myös viridans-streptokokin ja pneumokokin erottelussa, siksi AccuProbe-menetelmällä esiin tulleet ristiin menevät tulokset eivät ole yllättäviä (Tarkka 2009). Yli 99 % *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* ja *Streptococcus oralis* 16S rRNA sekvenssistä on samanlaista (Richter ym. 2008).

5.2.3 Koettimet

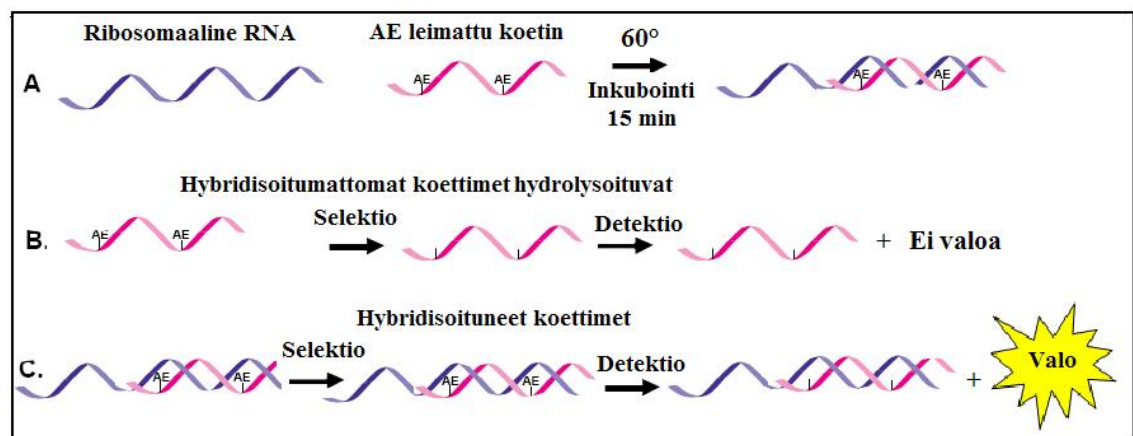
Koettimena voi toimia joko DNA tai RNA. DNA-koettimen koko voi vaihdella noin 15 nukleotidin pituisesta synteettisestä oligonukleotidista aina useiden satojen nukleotidien pituisiin DNA-jaksoihin. Koettimena voi toimia myös lyhyehkö synteettinen oligonukleotidi. Oligonukleotidikoetin suunnitellaan siten, että se on komplementaarinen tarkoin tunnetulle kohdalle, esimerkiksi tutkittavassa DNA:ssa tai mRNA:ssa. (Suominen – Ollikka 2004:115; Hong 2006: 135.)

Koetin pitää ennen hybridisaatiota leimata jollakin merkkiaineella, jotta hybridisaatiossa syntyneet kohde-koetinhybridit voidaan havaita. Moniin tarkoituksiin on tarjolla sekä radioaktiivisia että ei-radioaktiivisia leimausmenetelmiä. Radioaktiivisista leimoista käytetyin on fosforin radioaktiivinen isotooppi 32 (^{32}P). Ei-radioaktiivisia leimausmenetelmiä ovat muun muassa fluoresenssi ja kemiluminosenssi. Ei-radioaktiiviset leimausmenetelmät perustuvat siihen, että johonkin leimausreaktiossa substraattina käytettävään nukleotidiin on liitetty kovalenttisesti jokin havaitsemisen mahdollistava merk-

kiaine. Leimoina voidaan käyttää esimerkiksi biotiinilla leimattuja nukleotideja. Nämä leimat detektoidaan useimmiten sellaisten valo- tai värireaktioiden avulla, joita katalysoivat tietyt entsyymit. (Suominen – Ollikka 2004: 114 – 115, 117.) Suosituin kaupallisen koettimeen perustuva määrittäminen on Gen-Probe AccuProbe, jossa käytetään kemiluminesenssilla leimattua koetinta ja hybridit havaitaan käyttämällä luminometriä. Valon intensiteetti korreloi hybridisoituneiden koettimen määrän kanssa. (Hong 2006: 136.)

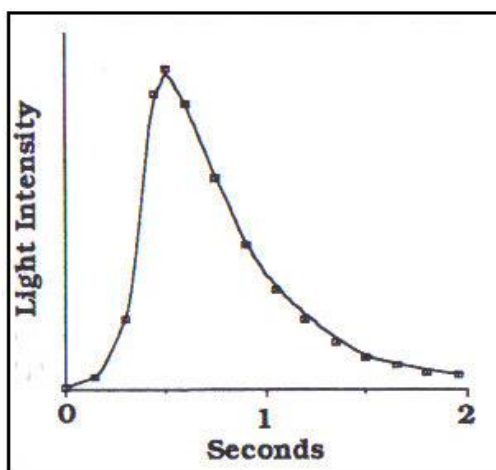
5.3 Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä

Accu-Probe *Streptococcus pneumoniae* Culture Identification Test -tunnistustesti on nopea nukleinihapon hybridisaatioon perustuva testi viljelystä eristetyn *Streptococcus pneumoniae* tunnistamista varten. Menetelmä pystyy havaitsemaan pneumokokille ominaisen ribosomaalisen RNA sekvenssin, spesifisen koettimen avulla. AccuProbe-systeemi käyttää kemiluminesenssilla leimattuja yksijuosteisia DNA koettimia. Leimana on käytetty akridiniumesteriä. Koettimen ja rRNA:n hybridisaatiossa acridiniumesteri jää koettimen ja rRNA:n väliin, silloin muodostuu double helix. Tämän takia joskus AccuProbe-menetelmää kutsutaan sandwich hybridisaatiomenetelmäksi ja tämä vaikuttaa niin, että akridinium esterit ei hajoa seuraavassa selektiovaiheessa, jossa hajotetaan hybridisoitumattomien koettimien leimat. Akridiniumesteri on liitetty DNA koettimeen kovalenttisen sidoksen avulla. Tämän sidoksen hydrolyysi vaikuttaa akridiniumiin niin, että se ei voi antaa säteilyä pysyvästi. Hybridisoituneen kemiluminesenssi mitataan Gen-Proben Leader I Luminometrillä. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007; Hong 2006: 136–137; Hybridization Protection Assay (HPA) 1989.) Menetelmän periaate on esitetty kuviossa 6.



KUVIO 6. Koettimen detektio HPA-menetelmällä (Hill 1996).

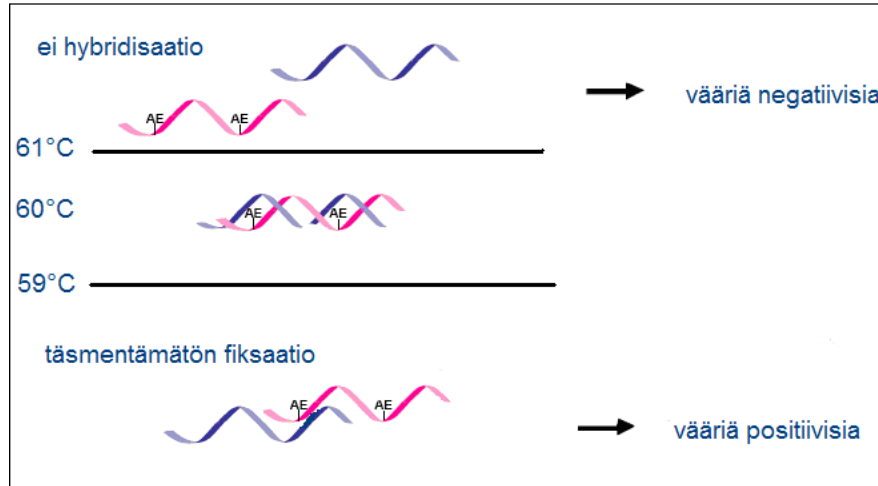
Koettimen detektio HPA-menetelmällä on esitetty kuviossa 6. kolmessa vaiheessa A) Akridiniumesterillä (AE) leimattu DNA koetin hybridisoituu rRNA:n määrätyn sekvenssin kanssa. B) Hybridisoitumattoman koettimen akridiniumesteri hydrolysoidaan selektioreagenssilla, jolloin hydrolysoituneet AE:t eivät voi antaa valoa detektiovaiheessa. C) Acridiniumesteri jää koettimen ja rRNA:n väliin, jolloin akridiniumesteri ei hajoa seuraavassa selektiovaiheessa ja detektiovaiheessa antaa vaao. Luminometrillä voidaan näin mitata koettimesta emittoituva valo. (Hill 1996.)



KUVIO 7. Akridiniumesterireaktion suoritus kestää kaksi sekuntia (Hybridization Protection Assay (HPA) 1989).

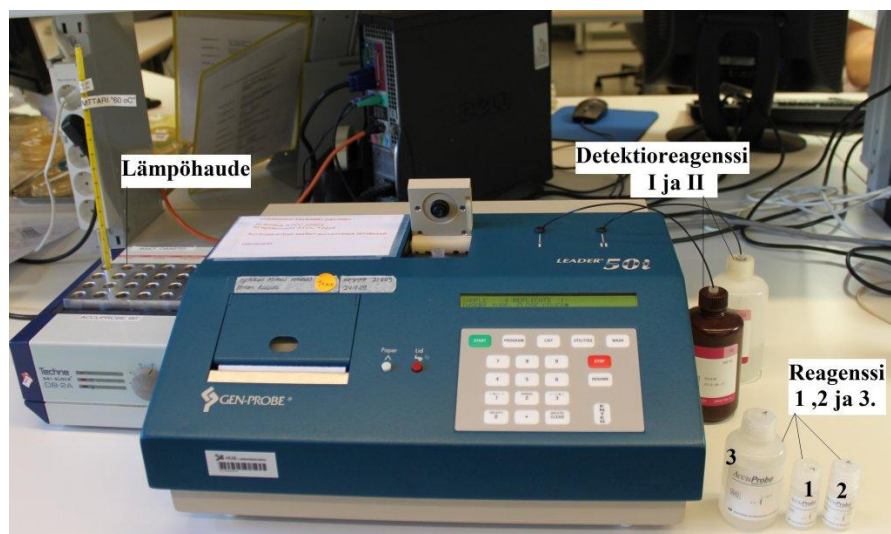
AccuProbe-testin alkureaktiovaiheessa ribosomaalinen RNA on ensin vapautettava lyy-sireagenssin avulla (Reagent 1). Ribosomaalinen RNA vapautumisen jälkeen seuraavassa reaktiovaiheessa hybridisoituu DNA-koettimen kanssa ja muodostaa stabiilin DNA-RNA-hybridin. Hybridisaatiopuskuri (reagenssi 2), joka on puskuriliuos, luo 60 °C:ssa sopivan olosuhteen hybridisaation onnistumiselle. Tässä vaiheessa seoksen sisältävä putki inkuboidaan 15 minuuttia 60 °C lämpöhauteella ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), jossa täsmällinen fiksaatio tapahtuu (kuvio 8). Seuraavassa reaktiovaiheessa selektioreagenssi (reagenssi 3) erottelee hybridisoituneen DNA-koettimen ja hybridisoitumattoman DNA-koettimen. Selektioreagenssi hydrolysoi sitoutumattomat koettimet, näin vältetään kaikki signaalit, jotka muodostuvat ei-hybridisoituneista koettimesta. Selektioreagenssi sisältää natriumboraattia (Millipore Oy). Näin jäljelle jää vain akridiniumesterillä leimatut koettimet, jotka ovat sitoutuneet kohteeseensa. Tuloksen havaitsemista varten on lisättävä vielä kaksi reagenssia seokseen: Detektioreagenssi I (sisältää 0,1 % vetyperoksidia 0,001N typpihapossa) ja Detektioreagenssi II (1 N natriumhydroksidi). Gen-Probe Leader 50i Luminometeri lisää automaattisesti nämä detektioreagenssit mittausvaiheessa putkeen (kuvio 9). Detektioreagenssissa oleva vetyperoksidi reagoi koettimen akridiniumesterin kanssa ja pikaisesti syntyy valoa, joka havaitaan luminometrillä. Akridiniumesterin ke-

miluminosenssireaktio loppuu kokonaan kahdessa sekunnissa (kuvio 7). Menetelmä ei vaadi erillisiä pesuja, mikä vähentää ristikontaminaatiota eli näytteen saastumista toisella näytteellä ja näin vääriä positiivisia tuloksia. (Hybridization Protection Assay (HPA) 1989; Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)



KUVIO 8. Lämpöhauteen sopivin lämpötila ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), jossa täsmällinen kiinnittymisen (fiksaatio) tapahtuu (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007; Keinänen 2009).

Gen-Proben AccuProben valmistajan ohjeen mukaan pitää rutiininomaisesti kunkin laboratoriotestin yhteydessä olla sekä positiivinen että negatiivinen kanta. Positiivisena kontrollina voidaan käyttää *Streptococcus pneumoniae* esim. American Type Culture Collection, ATCC # 33400 -kantoja ja negatiivisena kontrollina *Streptococcus bovis* esim. ATCC # 33317 -kantoja. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)



KUVIO 9. GenProbe AccuProbe-hybridisaatiolaite (Bakteriologian osastolla otettu kuva 2009).

5.3.1 Cut off -raja

Cut-off -raja on määritelty raja, joka käytetään tutkimusten tuloksia tulkittaessa. Tutkimuksen tulos lasketaan positiiviseksi, jos tuloksen pitoisuus on suurempi tai yhtäsuuri kuin cut off -raja. Tulos on negatiivinen jos se on alle määrittelyn cut off -raja. GenProbe-valmistajan ohjeen mukaan 50 000 RLU lasketaan cut off -rajaksi ja välillä 40 000–49 999 RLU oleville tuloksille testi on toistettava. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

Gen-Probe Leader 50i Luminometeri ilmoittaa positiivisen tuloksen raja-arvoksi 50 000 RLU:ta, mutta HUSLAB bakteriologian osaston kokemuksen mukaan tavallisesti positiivisen näytteen antamat lukemat ovat huomattavasti korkeampia. Noin 100 000 RLU suuruusluokkaa olevat tulokset on vielä tulkittava negatiivisiksi. Mataliin positiivisiin tuloksiin on syytä suhtautua varauksella. Lähellä raja-arvoa olevan positiivisen ja negatiivisen tuloksen luotettavuutta on tutkittava muilla testimenetelmällä. (Tarkka 2007.)

5.3.2 Hybridisaation spesifisyys ja sensitiivisyys

Hybridisaatio on erittäin spesifinen, mikäli koetin on hyvin valittu. Hybridisaatiossa käytetään juuri tietyille organismille spesifistä sekvenssiä, jolloin positiivinen tulos osoittaa, että kyseessä olevaa organismia on näytteessä. Gen-Probissa on käytössä ribosomaalista RNA:ta kohdemolekyylinä, joka lisää tämän menetelmän sensitiivisyyttä. Ribosomaalista RNA esiintyy solussa useita tuhansia kopioita, todennäköisyys on suurempi kuin yhtenä kappaleena DNA kohdemolekyylinä. Gen-Proben sensitiivisyyttä lisää vielä HPA-menetelmän (Hybridisaation Protection Assay) käyttö, joka perustuu erittäin sensitiivisen kemiluminesenssisignaaliin. Menetelmässä kaikki reaktiot tapahtuvat samassa näyteputkessa ilman pesuvaihetta ja hybridisoitumattomat koettimet poistetaan reagenssilyysillä, mikä nopeuttaa tutkimusmenetelmää ja toisaalta vähentää kontaminaatiota. AccuProben valmistajan mukaan menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys on 100 %. (Hill 1996; Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

5.3.3 Varastoinnin ja käsittelyn vaatimukset sekä huomautukset

Näytteen valmistaminen, hybridisaatioreaktio ja valintareaktiot ovat lämpötilariippuvaisia. Siksi on välttämätöntä, että lämpöhauteen lämpötila ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) pysyvästi on mää-

ritetyllä rajalla. Jos lämpöhauteen lämpötila on yli 61°C, rRNA ja koettimet eivät pysty hybridisoitumaan ja saadaan vääriä negatiivisia tuloksia. Toisaalta jos sen lämpötila on alle 59°C, rRNA ja koettimet eivät pysty hybridisoitumaan spesifisesti ja saadaan vääriä positiivisia tuloksia (kuvio 8). (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

Hybridisaatioreaktio ja selektioreaktio ovat riippuvaisia ajasta. Hybridisaatioreaktion inkubointiaika on vähintään 15 minuuttia, mutta enintään 20 minuuttia. Selektiovaiheen inkubointiaika on vähintään 5 minuuttia, mutta ei yli 6 minuuttia. Sekoittajan käyttäminen reaktiovaiheiden välillä on tärkeä, että seos on homogeeninen varsinkin valintavaiheessa reagenssi-3:n lisäämisen jälkeen. Jos bakteerisoluja ei ole riittävästi, viljelmä (agarmalja) on vanha tai bakteereiden jättäminen reagenssi-1:ssä yli 30 minuuttia ennen kuin lisätään reagenssi-2, voi vaikuttaa niin, että positiivinen tulos on alhainen. Tulos on luotettava, jos hybridisaatioreaktio aloitetaan 30 minuutin kuluessa reagenssi 1:n ja näytteen sekoituksesta. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.) Tuloksen lukemisessa pyyhitään näyteputki ulkopuolelta veteen kostutetulla selluloosavanulla ja laitetaan näyteputki laitteeseen (HUSLAB kliinisen mikrobiologian työohje). Kostutettua sidetaitosta käytetään kuivan tilalla, koska kuiva sidetaitos ja muoviputki muodostavat sähkövaraus- ta, joka voi synnyttää häiriöitä (Keinänen 2009).

Probe Reagenssiputket (koettimet) on varastoitava foliopussissaan 2 °C – 8 °C. Avaamattomana pussia saa käyttää viimeiseen vanhenemispäivään saakka. Avatut pussit saa käyttää kahden kuukauden sisällä ennen viimeistä voimassaolopäivää. Muut reagenssit voidaan varastoida 2 °C ja 25 °C välillä ja niitä voi käyttää viimeisen vanhenemispäivään saakka. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

AccuProbe Leader-laitteen optiikka testataan Sys Check Luminometer Calibration Checkillä. Testaus tehdään kahden viikon välein tai tarpeen mukaan. SysCheck seos sisältää acridiniumesteri seoksen, joka sisältää sukkiniaattipuskurin, pesuaineen (detergentti) ja myös säilöntäaineen (parabens). SysCheck reagenssi säilytetään huoneen lämmössä (15 – 30 °C). Optiikkatestauksen periaatteena on, että SysCheck reagenssissa oleva acridiniumesteri säteilee fotonivaloa, yhdistyessään havaitsemisreagenssin kanssa. Syntyneet säteilyvalot mitataan käyttämällä valomonistinputkia (PMT) ja raportoitu RLU (Relative Light Units) yksikkönä. RLU on riippuvainen acridiniumesterin suuruudesta (kvantiteetti), havaitsemis-reagenssista ja PMT:n toiminnasta. SysCheck arvioi tehokkaasti havaitsemisjärjestelmän yleissuorituskykyä. (SysChec 2007.)

6 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET AIHEESTA

Streptococcus pneumoniae tunnistamista Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmällä on tutkittu ja käsitelty useassa tutkimuksessa (Taulukko 1).

AccuProben valmistaja on tutkinut Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän soveltuvuutta Pneumokokin tunnistamisessa. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 662 näytettä, jotka oli viljelty verimaljoille. Näytteistä 305 oli pneumokokkia, 185 oli muita *Streptococcus* lajeja, 172 oli muita mikrobilajeja, jotka edustivat 25 sukua. AccuProbe-menetelmän pneumokokin tunnistustestitulosta verrattiin standardisoituihin viljelytunnistusmenetelmiin (perinteiset tunnistusmenetelmät). Standardisoituihin tunnistusmenetelmiin sisältyvät Gram-värjäys, morfologia, katalaasikoe, hemolyyttinen toiminta, optokiinitesti ja sappiliukoisuustesti. Kaikki pneumokokin AccuProbe-testitulokset tuottivat positiivisen tuloksen ja muiden bakteerien tulokset negatiivisen tuloksen. Tutkimuksessaan 50 000 RLU on laskettu cut off -rajana. Herkkyysprosentti, spesifisyysprosentti, ja yhdenmukaisuusprosentti olivat 100 %. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

Laura Lindholm ja Hannu Sarkkinen (2004) tutkivat Päijät-Hämeen keskussairaalassa AccuProbe-tutkimusmenetelmän käyttöä pneumokokin tunnistamisessa. Tutkimuksessaan he kertovat kuuden vuoden laboratoriokokemuksistaan *S. aureuksen*, *S. pneumoniae*, enterokokkien ja A- ja B-ryhmän streptokokkien tunnistamisesta positiivisista veriviljelypulloista suoraan käyttäen AccuProben menetelmää. Tutkimuksessa oli mukana kaikki laboratorioon saadut veriviljelyt kesäkuun 1997 ja heinäkuun 2003 välillä. AccuProben tallennetut luminometrillukemat taulukoitiin ja niitä vertailtiin viljelytulosten kanssa. Jos saman näytteen molemmat veriviljelypullot olivat positiivisia, silloin vain ensimmäisen AccuProben tulossarja otettiin mukaan analyysiin. Keskussairaalan laboratoriossa veriviljelysettien kokonaismäärä (1997–2003) oli 33695 sarjaa (aerobi- ja anaerobipullo). (Lindholm – Sarkkinen 2004.)

Tutkimuksessa tutkittiin 454 veriviljelypositiivista pulloa (yksi/potilas), joissa oli 203 pneumokokki positiivisia ja 281 pneumokokki negatiivisia pulloja. Tutkimustulokset näyttivät, että on neljä väärää negatiivista pneumokokkinäytettä jos cut off -raja on 50 000 RLU ja kolme väärää negatiivista, jos cut off -raja on 30 000 RLU. Tämän tutkimuksen mukaan AccuProbe-testin herkkyys pneumokokin tunnistuksessa on erinomai-

nen. AccuProbe-testin sensitiivisyys pneumokokin tunnistamisessa oli 97,9 % ja sen spesifisyys oli 100 %. (Lindholm – Sarkkinen 2004.)

Thomas E. Davis ja Deanna D. Fuller (1991) tutkimuksessaan arvioivat DNA-koettimen hyödyllisyyttä tunnistettaessa erilaisia bakteereja positiivisista veriviljelypulloista. Tutkimusraportissaan he osoittavat, että he haluavat muuttaa AccuProbeen valmistajan ohjeita ja agarmaljalla olevien bakteerien sijaan ottaa näytteen suoraan positiivisesta veriviljelypullosta. Tutkimuksessa haluttiin arvioida DNA koettimen kykyä tunnistaa mikro-organismeja suoraan veriviljelypulloista. Tutkimuksessa oli testattu 362 positiivista veriviljelynäytettä potilaista. Näytteissä olevien bakteerien tyyppi oli tutkittu heidän standarditutkimusmenetelmien avulla laboratoriossa. Veriviljelypulloissa oli erilaisia bakteereita muun muassa *S. aureus*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae* ja *E. coli*. Tutkimuksessaan 60 000 RLU oli laskettu cut off -rajana, eli sen yli olleet tulokset oli laskettu positiiviseksi. Alle 40 000 RLU oli laskettu negatiiviseksi. 40 000 – 60 000 RLU tulokset oli tutkittu uudelleen. 24 veriviljelynäytteessä oli *S. pneumoniae*, jotka AccuProbe tunnisti oikein niitä ja spesifisyys oli 100 %. (Davis – Fuller 1991.)

Gerald A. Denys ja Robert B. Carey (1992) tutkimuksessaan ovat testanneet 172 *S. pneumoniae* kantaa ja 204 sekalaista bakteerikantaa AccuProbe-testillä. Testikannat oli otettu joko tuoreena tai saatu kuuden kliinisen laboratorion eri maantieteellisiltä alueilta. Näytteet oli varastoitu -70 °C ja tutkimuksessa ne oli viljelty uudestaan agarmaljoille. Näytteet oli otettu verestä, selkäydinnesteestä ja hengitysteistä. Jokaisen näytteen kanssa oli tehty positiivinen ja negatiivinen kontrolli vastaavasti. AccuProbe-testi tunnisti kaikki 172 *S. pneumoniae* -kantaa, mukaan lukien sekä kapselilliset että nonkapselilliset kannat. Positiivisten tulosten RLU -tulosarvo oli 57 768 – 2 872 570 välillä. Kaikki 204 sekalaista bakteerikantaa olivat negatiivisia. Negatiivisten tulosten pienin tulos oli 338 RLU, joka oli *Streptococcus agalactiae*. Suurin negatiivisten RLU tulosarvo oli 23 748 RLU, joka oli viridans-streptokokki. Tutkijoiden mukaan viridans-streptokokit voivat vaikuttaa väärin positiivisten tuloksien ilmentämistä ja tarvittaessa on selvitettävä tulos muilla tutkimuksilla. Cut off -rajana oli käytetty 50 000 RLU. Herkkyys, spesifisyys oli 100 %. (Denys – Carey 1992.)

Virva Keski-Vinkka (1999) opinnäytetyössään teki eri tunnistusmenetelmien vertailun *Streptococcus pneumoniae* diagnostiikassa. Työssään hän on käyttänyt erilaisia mene-

telmiä, muun muassa polymeerasiketjureaktio(PCR)-menetelmää, optokiinittestiä, AccuProbe-menetelmää ja pneumokokkiaglutinaatiotestiä. Tutkimuksessa oli testattu 68 näytettä. Kaikkiaan tutkimuksessa oli 12 näytettä, joiden olisi pitänyt olla kaikilla tunnistusmenetelmillä negatiivisia. Tutkimuksessa AccuProbe-menetelmä antoi paljon oikeita positiivisia tuloksia, mutta PCR-menetelmä oli vielä parempi. Tutkimuksessa AccuProbe testin sensitiivisyys pneumokokin tunnistamisessa oli 83 %, mutta PCR-menetelmän sensitiivisyys oli 98 %. (Keski-Vinkka 1999.)

TAULUKKO 1. Aikaisempien tutkimuksien keskeiset tiedot *Streptococcus pneumoniaen* tunnistamisessa AccuProbe-testin avulla (- = tulosta ei ilmoitettu).

Tutkijat	Näyttemäärä	Kasvatusalustat ja cut off -raja	Sensitiivisyys (%)	Spesifisyys (%)
AccuProben valmistaja	Yhteensä 662 Pneumokokki 305	Agarmalja 50 000 RLU	100 %	100 %
Gerald A. Denys ja Robert B. Carey (1992)	Yhteensä 376 Pneumokokki 172	Agarmalja 50 000 RLU	100 %	100 %
Laura Lindholm ja Hannu Sarkkinen (2004)	Yhteensä 877 Pneumokokki 596	Veriviljelypullo 50 000 RLU	97,9 %	100 %
Thomas E. Davis ja Deanna D. Fuller (1991)	Yhteensä 362 Pneumokokki 24	Veriviljelypullo 60 000 RLU 40 000 – 60 000	-	100 %
Virva Keski-Vinkka (1999)	Yhteensä 68 Pneumokokki 56	Agarmalja - RLU	83 %	-

Kaikissa tutkimuksissa ei ole käytetty suoraan veriviljelypullonäytettä, vaan osaan niissä on käytetty agarmaljan pesäkettä. Tutkimustulosten spesifisyys ja sensitiivisyys eivät ole samanlaisia, mutta suurimmassa osassa tutkimuksista on tullut hyviä tuloksia. Näiden tutkimusten heikkopuoli on myös se, että erilaisten bakteerilajien käytössä ei ole käytetty viridans-streptokokkia. Viridans-streptokokit ja pneumokokit ovat lähisukuisia ja niiden erottaminen on hankalaa ja tutkimusmenetelmän pitää spesifisesti erottaa ne toisistaan. Tutkimuksissa ei ole käytetty samanarvoisia cut off -rajoja.

7 TYÖN TAVOITTEET JA KYSYMYKSET

Työn tarkoituksena on selvittää DNA-tekniikkaan perustuvan Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän soveltuvuus veriviljelyiden pneumokokkiepäilyjen osoittamiseksi suoraan veriviljelypullojen näytteistä. Työssä määritetään Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän spesifisyyttä ja sensitivisyyttä perinteiseen- ja PCR-menetelmään verrattuna. Korvaavaksi menetelmäksi on ajateltu Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmää, sillä se on nopea ja helppo tehdä. Työn toimeksiantaja on HUSLABin mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osasto.

Työ pyrkii löytämään uuden nopean ja luotettavan menetelmän *Streptococcus pneumoniae* tunnistamiseksi. Nopea, suora sekä tarkka menetelmä taudinaiheuttajien tunnistamiseksi positiivisista veriviljelyistä on tämän tutkimuksen päätavoite. Tämän menetelmän onnistuminen voi nopeuttaa pneumokokin tunnistusta.

AccuProben ohjeessa ei ole mainittu veriviljelypullonäytteiden käyttöä suoraan tutkimukseen, vaan ohjeen mukaan voi käyttää bakteerin pesäkettä. HUSLAB Bakteriologian osastossakin näytteen tutkimisessa AccuProbella käytetään vain pesäkettä. Osassa aikaisemmissa tutkimuksissakin aiheesta on käytetty vain pesäkettä. Aikaisemmissa tutkimuksissa aiheesta ei ole käytetty samaa cut off -rajaa, joka vaikuttaa tutkimuksen lopputuloksen spesifisyyteen ja sensitivisyyteen. Näiden tietojen saamista varten ja luotettavan menetelmän valitsemiseksi potilaan hoitoon, haen työssäni vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Voidaanko Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmällä osoittaa suoraan veriviljelypullojen näytteistä pneumokokki?
- Mikä on tutkimuksen cut off -raja, jota suurempi tai yhtäsuuri testitulokset lasketaan positiiviseksi ja pienempi tulos lasketaan negatiiviseksi?
- Mikä on Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän spesifisyys perinteiseen - ja PCR-menetelmään verrattuna?
- Mikä on Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän sensitivisyys perinteiseen - ja PCR-menetelmään verrattuna?

8 TYÖN SUORITTAMINEN

HUSLABin bakteriologian osastossa AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän käytössä veriviljelyn tutkimuksessa näytteenä käytetään vain pesäkettä, ei käytetä suoraan veriviljelypullojen näytteitä. Bakteriologian osastossa positiiviseksi epäilystä veriviljelypullosta tehdään tarvittavat värjäykset ja viljelmät agarmaljoille. Tarvittaessa AccuProbea käytetään bakteerilajin tunnistamiseen maljan pesäkkeistä, jos bakteeri kasvaa maljalla. Päijät-Hämeen Keskussairaalan laboratorion mikrobiologian osastossa tehdään bakteerien osoitusta Gen-Probe Accuprobe-hybridisaatiomenetelmällä suoraan veriviljelypullojen näytteistä. Tähän menetelmään tutustumista varten 1.6.2009 kävin tutustumassa keskussairaalaan mikrobiologian osastolla, jossa tutustuin menetelmän etenemisvaiheisiin alusta loppuun.

8.1 Näytteiden keräys ja käsittely

Näytteiden keruu tapahtui yhteistyössä HUSLABin bakteriologian osaston veriviljelyyksikön kanssa toukokuussa, kun he aloittivat tulevien pneumokokkipositiivisten veriviljelypullojen keräämistä jääkaappiin. Pullot säilytettiin jääkaapissa, sillä pneumokokit normaalisti autolysoituvat helposti ja siellä säilyy paremmin kuin lämpöhuoneessa (37 °C) ja huoneenlämmössä (25 °C).

Näytteiden keruu kesti kymmenen viikkoa, missä ajassa sain tarpeeksi positiivisia veriviljelypulloja. Laboratoriossa näytteet oli analysoitu aikaisemmin olevien perinteisten tunnistustestin avulla ja tarvittaessa PCR-menetelmällä. Samat näytteet analysoin GenProbe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmällä. Tulokset analysoin SPSS-ohjelman avulla, ja niistä tein johtopäätöksiä. Näytteiden tutkimusten tekopäivät on esitetty liitteessä 2.

Tulevien pneumokokkipositiivisten veriviljelypullojen keräys jatkui heinäkuun puoliväliin saakka. Veriviljelypositiivisten pneumokokkien lisäksi keräsin myös muiden bakteerilajien veriviljelypulloja, muun muassa *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus β-hemolyysi G.*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Pseudomonas aeruginosa*.

8.2 Sopivan menetelmän määrittely veriviljelynäytteen alkukäsittelyyn

Veriviljelypullonäytteen suora käyttö AccuProbe-menetelmällä analysoidessa tarvitsee alkukäsittelyä. Veriviljelypullonäytteessä bakteereiden lisäksi on myös muita rakenteita ja aineita, muun muassa verisoluja. Bakteri on erotettava muista rakenteista näytteessä. Veriviljelypullonäyte sentrifugoidaan ennen käyttöä bakteerin erottamista varten. Tiedetään, että pneumokokki autolysoituu herkästi veriviljelypullossa, sen takia on selvitettävä 1) Näytteen sentrifugoimisen jälkeen otetaanko näytteen supernatantti tai sakka käyttöön. 2) Miten voidaan erottaa bakteri tai bakteerin jäljellä olevat rakenteet (DNA, RNA, rRNA) muista rakenteista näytteessä. 3) Mikä veriviljelypullo on paras käyttöön, aerobi tai anaerobi?

Sopivan menetelmän määrittämistä varten valitsin yhden potilaan näytteen alkukäsittelyä varten kolmella eri menetelmällä. Näyte oli veriviljelypositiivinen aerobi- ja anaerobipullo. Gramvärjäyksestä ei ole voitu osoittaa selvää kokkia eikä pystytty kasvattamaan agarmaljalle, jolloin pneumokokki on osoitettu PCR-menetelmällä.

Kolmella menetelmällä käsittelin jokaisen veriviljelypullon, jolloin sain kuusi näytettä tutkittavaksi. AccuProbe-menetelmällä analysoin näytteet. (Taulukko 2.) Näytteiden tulosarvon perusteella valitsin parhaimmat kaksi menetelmää. Niiden kahden menetelmän vertailua varten valitsin kolme veriviljelypulloparia ja yhden aerobiveriviljelypullon. Käsittelin näytteet kahdella menetelmällä ja analysoin näytteet AccuProbe-hybridisaatiomenetelmällä. Kaikissa menetelmissä näytteen otossa AccuProbe-testiin olen käyttänyt yksi mikrollinen silmukka. Lopussa valitsin parhaan menetelmän ja sopivimman veriviljelypullotyypin. (liite 4.)

Ensimmäisessä menetelmässä otetaan pullosta 1,5 ml näytettä (hyvin sekoitetusta veriviljelypullosta) eppendorf-putkeen ja sentrifugoidaan 7 600 rpm (kierrosta minuutissa) 6–7 sekuntia, annetaan kierrosten nousta 7 600 rpm ja sammutetaan välittömästi. Tässä vaiheessa saadaan verisolut pohjaan. Otetaan supernatantti talteen toiseen eppendorf-putkeen ja sentrifugoidaan tätä 7 600 rpm yksi minuutti, bakteerisakka saadaan putken pohjalle. Pipetoidaan supernatantti pois ja käytetään sakka AccuProbe-testiin. Tämä menetelmä on käytetty aikaisemmissa tutkimuksissa aiheesta, joissa on käytetty näytettä suoraan veriviljelypullosta.

Toisessa menetelmässä noudatetaan samoja työtapoja paitsi sitä, että toisen sentrifugivaiheen kesto aika yhden minuutin sijaan on kolme minuuttia. Kolmannessa menetelmässä noudatetaan ensimmäisen menetelmän samoja työtapoja paitsi sitä, että toisen sentrifugin jälkeen ei poisteta supernatanttia vaan käytetään se AccuProbe-testiin.

TAULUKKO 2. Kolmen eri menetelmän veriviljelynäytteiden käsittelyn tulokset AccuProbe-menetelmällä.

Menetelmä	Aerobi/ Anaerobi	AccuProben lukema (RLU)
Ensimmäinen menetelmä (1 min.)	Aerobi	775 786
Ensimmäinen menetelmä (1 min.)	Anaerobi	411 143
Toinen menetelmä (3 min.)	Aerobi	1 105 333
Toinen menetelmä (3 min.)	An aerobi	561 961
Kolmas menetelmä (supernatantti)	Aerobi	29 726
Kolmas menetelmä (supernatantti)	Anaerobi	7 319

AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän tulokset näyttävät, että supernatantti ei ole hyvä näyte testaamaan, sillä sen tulosarvot ovat tosi pieniä. Ensimmäisen ja toisen menetelmän tulosarvot ovat korkeita ja aerobipullon tulosarvot ovat korkeampia ja parempia kuin anaerobisen. Tulokset näyttävät myös sitä, että AccuProbe-menetelmällä on mahdollista testata näytteitä, joissa bakteerit ovat autolysoituneet. (Taulukko 2.)

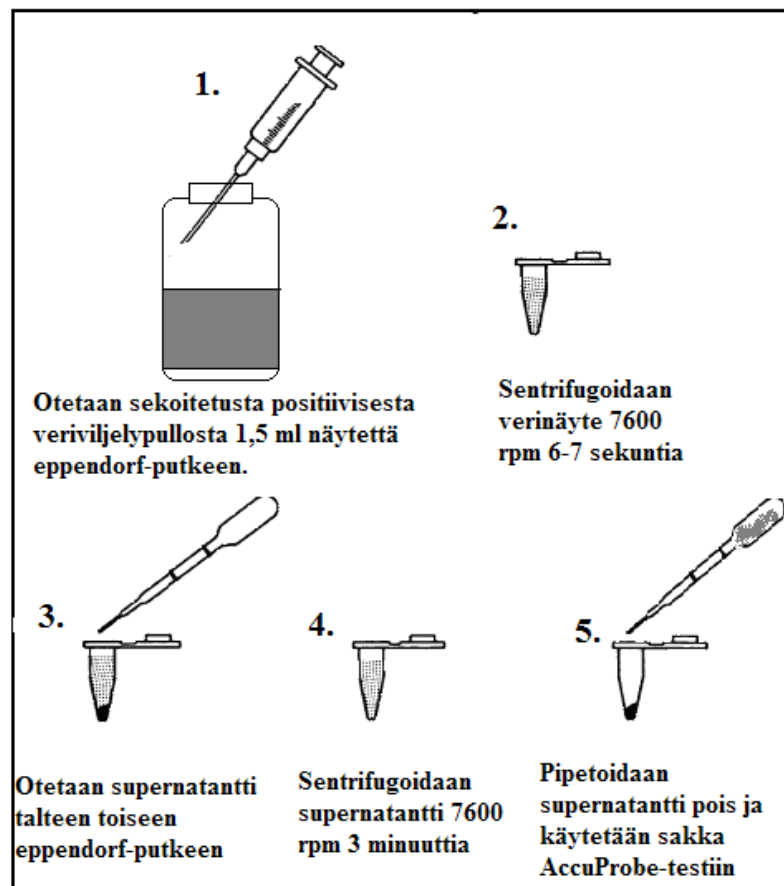
Ensimmäisen ja toisen menetelmän arvot ovat hyvin korkeita ja toisen menetelmän arvot ovat korkeampia kuin ensimmäisen (Taulukko 2). Lisävarmuuden vuoksi niiden kahden menetelmän välillä testasin vielä neljä näytettä, joista pneumokokki oli tunnistettu. Ensimmäisen ja toisen näytteen bakteerilaji oli tunnistettu PCR-menetelmällä, mutta kolmas ja neljäs perinteisillä menetelmillä. Niistä kolme näytettä on aerobi- ja anaerobipulloja, mutta neljäs on vain aerobipullo. Tavoitteena on tarkemman menetelmän valinta käyttöön.

Veriviljelynäytteet tutkin AccuProbe-menetelmällä ja taulukoin tulokset analysoitavaksi (liite 4). Tulokset näyttävät, että suurimman osan aerobipullojen tulosarvoista ovat korkeampia anaerobisiin verrattuna. Menetelmien tulosten välillä ei ole paljon eroja. Toisen menetelmän tulokset ovat suurempia ensimmäiseen menetelmään verrattuna.

Lopussa päätiin ottaa käyttöön toisen menetelmän eli menetelmän, jossa toisen kerran sentrifugointi on kolme minuuttia. Tämän menetelmän tulokset ovat korkeampia toiseen verrattuna, ja toisaalta tällä menetelmällä saadaan suurempi sakkatilavuus käyttöön AccuProbe-testille.

8.3 AccuProbe-testin suoritus

Veriviljelypulloja käsitellään tartuntavaarallisuutensa vuoksi laminaarivirtauskaapissa suojakäsineet kädessä. Jatkotoimenpiteet myös, joissa käsitellään verta, suoritetaan laminaarivirtauskaapissa. Erityistä varovaisuutta on noudatettava ruiskua ja neulaa käsiteltäessä pisto-onnettomuuksien välttämiseksi. Ruiskut ja neulat on ehdottomasti hävitettävä ohjeiden mukaisesti omiin roskeisiin. (Veriviljelypisteen työohje 2009.)



KUVIO 10. Veriviljelypullonäytteen alkukäsittelyvaiheet.

Pullon korkki puhdistetaan pyyhkimällä se hyvin etanoliin kostutetulla sidetaiteksella. Pullosta imetään 2 ml ruiskulla noin 1,5 ml näytettä (hyvin sekoitusta veriviljelypullosta) eppendorf-putkeen. Sentrifugoidaan putki 7 600 rpm (kierrosta minuutissa) 6–7 sekuntia, annetaan kierrosten nousta 7 600 rpm ja sammutetaan välittömästi. Tässä vai-

heessa saadaan verisolut pohjaan. Supernatantti otetaan talteen toiseen eppendorf-putkeen ja sentrifugoidaan tätä 7 600 rpm kolme minuuttia, bakteerisakka saadaan putken pohjalle. Pipetoidaan supernatantti pois ja käytetään sakka AccuProbe-testiin, josta otetaan yksi mikrosilmukallista näytettä. (kuvio 10.)

AccuProbe-testin suorituksessa otetaan tarvittava määrä putkia, jotka sisältävät pneumokokkikoettimia. Pipetoidaan putkeen 50 µl reagenssia 1 (lysisreagenssi) ja sekoitetaan vorteksoimalla. Otetaan 1 µl silmukallinen näytettä (sakka) ja suspensoidaan ne lysisreagenssiin. Lisätään putkeen 50 µl reagenssia 2 (hybridisaatiopuskuri) ja sekoitetaan vorteksoimalla. Inkuboidaan putkea 15 minuuttia 60 °C lämpöhauteella. Nostetaan putki lämpöhauteelta. Korkki avataan ja pipetoidaan putkeen 300 µl reagenssia 3 (selektioreagenssi). Suljetaan putki uudelleen ja sekoitetaan putkea vorteksoimalla. Inkuboidaan putkea 5 minuuttia 60 °C lämpöhauteella. Putki nostetaan lämpöhauteelta ja annetaan jäähtyä huoneenlämpöön vähintään 5 minuutin ajan. Luetaan tulos luminometrillä 30 minuutin kuluessa näytteen käsittelystä.

8.4 Tutkimusmenetelmän kontrollointi

Gen-Proben AccuProben valmistajan ohjeen mukaan pitää rutiininomaisesti kunkin laboratoriotestin yhteydessä olla sekä positiivinen että negatiivinen kanta. Positiivisena kontrollina voidaan käyttää *Streptococcus pneumoniae* (esimerkiksi American Type Culture Collection, ATCC # 33400) -kantoja ja negatiivisena kontrollina *Streptococcus bovis* (esimerkiksi ATCC # 33317) -kantoja. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

Bakteriologian osaston laboratoriossa AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä kontrolloidaan rutiininomaisesti viikoittain ensimmäisen tutkimustekokerran yhteydessä. Kontrollikannat ovat *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) ja *Streptococcus mitis* (NCTC 12261).

Tässä työssä testit on kontrolloitu usealla tavalla. Veriviljelynäytteet, jotka on käytetty tässä työssä, on aikaisemmin tutkittu muilla menetelmillä ja vastaus on saatu. Niiden takia on pystytty arvioimaan saman tien AccuProbe-hybridisaation tutkimustulosten oikeellisuus ja virheellisyys. Tarvittaessa tulosten ristiriitaisessa tilanteessa on yritetty selvittää tuloksen oikeellisuus PCR-menetelmällä. Toisaalta pneumokokki positiivisten näytteiden lisäksi on testattu veriviljelynäytteitä, joissa on muita bakteerilajeja.

9 TULOKSET

Työn otoksena oli 74 veriviljelypulloa, joissa oli kahdeksan anaerobipulloa ja 66 aerobipulloa. Jokaisen potilaan kahdesta pullosta on otettu tutkimukseen yksi pullo. Yhdeksästä potilaasta on otettu kaksi aerobipulloa työn otokseen (liite 3). Veriviljelypulloista olen yrittänyt valita aerobipullon tutkimukseen, mutta joskus vain anaerobipullo on ollut positiivinen, silloin olen ottanut sen. Työn otos (74 pulloa) on tutkittu aiemmin perinteisillä menetelmillä ja tarvittaessa PCR-menetelmällä potilaan hoidossa. Tällöin tunnistettu, että 39 veriviljelypullossa on pneumokokki, 18 pullossa viridans-streptokokki, yksi pullo on negatiivinen (ilman bakteeria) ja 16 pulloa sisältää muita bakteereja. Liitteessä 3 on esitetty työssä tutkittujen näytteiden bakteerilajit, näytteiden määrä ja niiden prosenttiosuus.

Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä havaitsi kaikki 39 pneumokokkiveriviljelynäytettä positiivisiksi. AccuProben tuloslukeman positiivisten minimi- ja maksimiarvon väli oli 379 563 – 1 242 288 RLU. AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän tulokset näkyvät ensimmäisessä liitteessä, jossa tulosarvot (RLU) on järjestetty suurimmasta pienimpään.

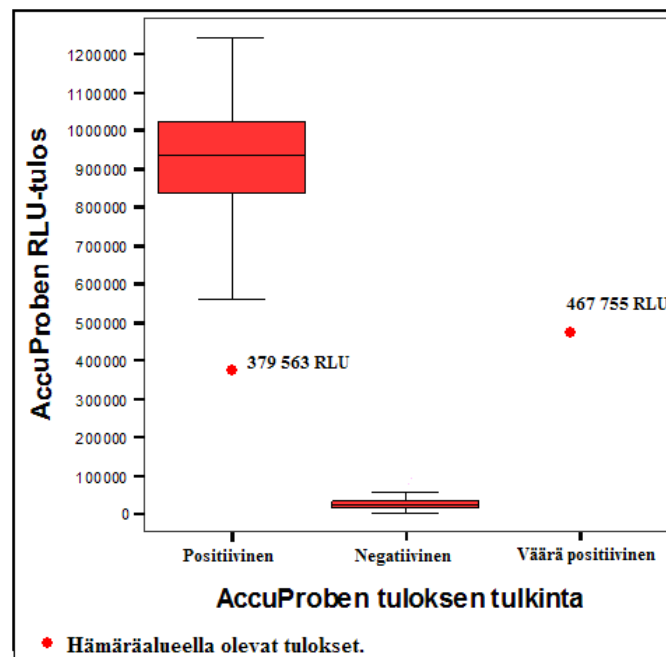
Vääriä positiivisia AccuProbe-tuloksia oli yksi ja kaikki muut testatut näytteet osoittautuivat negatiivisiksi. Negatiivisten näytteiden maksimiarvo (vääriä positiivista näytettä laskematta) oli viridans-streptokokki, sen tulosarvo oli 92 233 RLU ja minimiarvo oli *Pseudomonas aeruginosa* 3 593 RLU. Väärä positiivinen veriviljelynäytebakteeri oli viridans-streptokokki, jonka tulosarvo oli 467 455 RLU. (liite 2.)

Viridans-streptokokit ovat pneumokokin lähisukuisia, sen takia niiden erottaminen toisistaan on joskus hankalaa. AccuProbe-hybridisaatio menetelmän kykyä erottaa niitä toisistaan on tutkittava. Tämän takia olen testannut 18 veriviljelynäytettä, joissa viridans-streptokokki on havaittu muilla perinteisillä menetelmillä tai PCR-menetelmällä. Tästä joukosta kaksi näytettä tuli positiiviseksi, vaikka niiden pitäisi olla negatiivisia. Saadakseni lisävarmuutta näitä kahta näytettä tutkittiin PCR-menetelmällä, jolloin toisessa oli pneumokokki ja toisessa oli viridans-streptokokki, ja tällöin saatiin yksi väärä positiivinen tulos.

9.1 AccuProbe-menetelmän cut off -rajan määrittäminen

Pneumokokkipositiivisista veriviljelypulloista (39 pullosta) 38 veriviljelypullon minimi ja maksimiarvo on 560 176–1 242 288 RLU, ja viimeisen positiivisen tulosarvo on 379 563 RLU. Väärä positiivinen tulos on viridans-streptokokki, jonka tulosarvo on 467 455 RLU. Muiden 17 negatiivisen viridans-streptokokkinäytteen tulosarvon maksimi ja minimi on 10 892 – 92 233 RLU. Muiden negatiivisten veriviljelynäytteiden, joissa oli muita bakteerilajeja, RLU-tulosarvo oli vielä pienempi. (kuvio 11.)

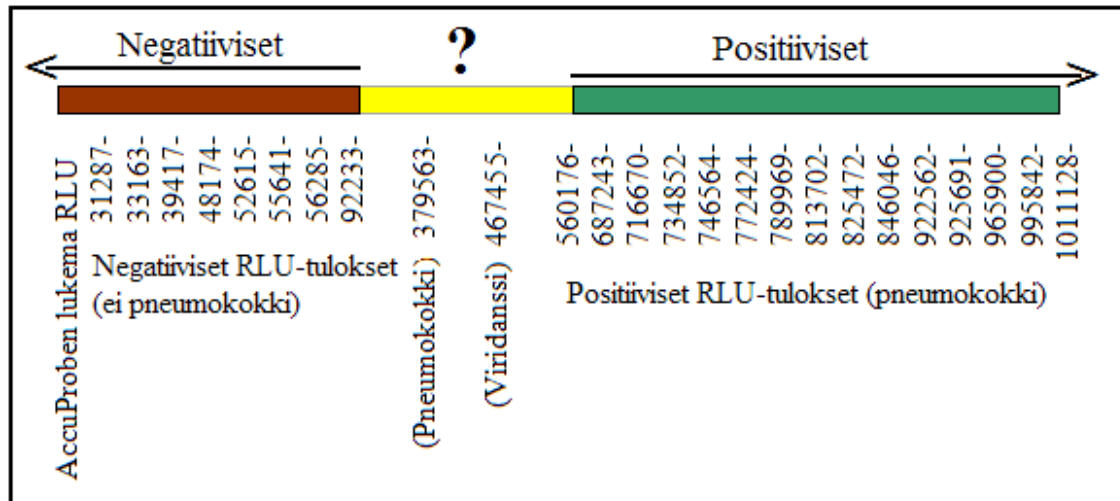
Tutkimustulosten analyysin perusteella voidaan havaita, että tulokset, jotka ovat suurempia tai yhtäsuuria kuin 560 176 RLU ($\geq 560\ 176$ RLU) ovat pneumokokkeja (positiivinen). RLU-tulosarvoja, jotka ovat yhtäsuuria tai pienempiä kuin 92 233 RLU ($\leq 92\ 233$ RLU), ei lasketa pneumokokeiksi (negatiivinen). Näiden kahden RLU-arvon välillä (92 233 – 560 176 RLU) tulosarvot eivät ole täysin luotettavia. Tällä hämäräalueella on tullut kaksi tulosta, muun muassa pneumokokin RLU-arvo 379 563 ja viridans-streptokokki 467 455, jossa viridans-streptokokin tulos on suurempi kuin pneumokokin. (kuvio 12.) Nämä kaksi tulosta on varmistettu myös PCR-menetelmällä.



KUVIO 11. Tulosten positiivisuuden, negatiivisuuden ja väärän positiivisuuden osuus erilaisten AccuProben RLU-tulosarvossa.

Työn tulosten perusteella voidaan laskea 379 563 RLU cut off -rajaksi, sillä sen alle ei jäänyt yhtään positiivista näytettä. Tämän cut off -rajan yli on jäänyt yksi väärä positiiv-

vinen tulos, viridans-streptokokki 467 455 RLU. Toisaalta voidaan laskea 560 176 RLU cut off -rajaksi, jonka yli ei tullut yhtään väärää positiivista ja sen alle tuli vain yksi väärä neagtiivinen tulos. Kolmas vaihtoehto on analysaattorin valmistajan määrittämä cut off -raja eli 50 000 RLU. Näiden kolmen vaihtoehdon cut-off rajan perusteella analysoin hybridisaatiomenetelmän spesifisyyden ja sensitiivisyyden pneumokokin tunnistamisessa. (Taulukko 3.)



KUVIO 12. AccuProbe-menetelmän tutkimustulosten analysointi.

9.2 AccuProbe-tulosten spesifisyys ja sensitiivisyys

Spesifisyys ja sensitiivisyys ovat merkittäviä tekijöitä valittaessa menetelmää bakteerien tunnistamiseen. Spesifisyydellä tutkitaan, kuinka hyvin menetelmä tunnistaa juuri tietyn bakteerin. Sensitiivisyys ilmaisee, kuinka hyvin menetelmä havaitsee pienetkin bakteerimäärät. (Helimäki – Laari 2003: 38.)

Sensitiivisyys lasketaan kaavalla: $\text{sensitiivisyys} = a / (a + c) \times 100$ ja spesifisyys kaavalla: $\text{spesifisyys} = d / (b + d) \times 100$, joissa a on oikeat positiiviset, b on väärät positiiviset, c on väärät negatiiviset ja d on oikeat negatiiviset tulokset. Vastaukset saadaan prosenttilukuna. (Helimäki – Laari 2003: 38.) Kolmen cut off -rajan vaihtoehtojen a-, b-, c- ja d-arvot on esitetty liitteessä neljä. AccuProbe-menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys pneumokokin tunnistamisessa suoraan veriviljelypullosta kolmen cut off -rajan mukaan on esitetty taulukossa 3.

Taulukossa 3. näkyy, että ensimmäisessä ja toisessa cut off -rajan vaihtoehdossa sensitiivisyys ja spesifisyys pienenevät saman verran. Ensimmäisessä tilanteessa sensitiivi-

syys on pienennyt ja väärin negatiivisten määrä lisääntyy, mutta toisessa vaihtoehdossa väärin positiivisten määrä voi lisääntyä. Viimeisessä vaihtoehdossa valmistajan cut off -rajan mukaan sensitiivisyys on erinomaista, mutta spesifisyys on pienennyt paljon ja väärät positiiviset lisääntyvät paljon. Taulukossa näkyy myös, että väärät positiiviset bakteerit ovat viridans-streptokokkeja.

TAULUKKO 3. AccuProbe-menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys pneumokokin tunnistamisesta erilaisten cut off -rajojen perusteella.

	AccuProben cut off - arvo (RLU)	Vääräpositiiviset	Sensitiivisyys (%)	Spesifisyys (%)
1	560 000 RLU	Väärä pos. = 0	97 %	100 %
2	379 563 RLU	Väärä pos. = 1 (viridanssi)	100 %	97 %
3	50 000 RLU	Väärä pos. = 5 (viridanssi)	100 %	85,7 %

Työn otoksen lisäämistä varten saman potilaan neljästä veriviljelypullosta on otettu kaksi aerobiveriviljelypulloa otokseen (liite 3). Vaikka näitä näytteitä ei ole otettu samasta pullosta, ne on otettu samasta potilaasta. Tällöin voidaan käsitellä tuloksia toistettavuuden ja yhdenmukaisuuden kannalta, vertailemalla saman potilaan kahden eri veriviljelypullon tuloksia keskenään. Tulosten välillä näkyy eroja, mutta ero ei ole vaikuttanut tutkimuksen lopputuloksen tulkintaan, koska molemmista tuloksista on tulkittaessa saatu sama vastaus, joko pneumokokkipositiivinen tai -negatiivinen. Poikkeavat tilanteet koskevat kahta tutkimustulosta, jotka ovat hämäräalueella (92 233 – 560 176 RLU-arvon välialue). Näiden potilaiden toisen pullon tulos on hämäräalueen ulkopuolella. Potilaan toisesta pullosta on saatu hämäräalueella matala, positiivinen pneumokokki tulos 379 563 RLU, mutta toisesta pullosta on saatu korkea, pneumokokkipositiivinen tulos (825 472 RLU). Toinen on väärä positiivinen, korkea tulos (467 455 RLU), mutta toisesta pullosta on saatu hyvin matala negatiivinen arvo (24 339 RLU). Korkeita tuloksia voi johtua siitä, että pulloihin laitettu enemmän verinäytettä muihin verrattuna. Tämän takia saman potilaan eri pulloista on saatu korkeita tuloseroja. Nämä tutkimukset on tehty 15–19.6.2009, mutta lisävarmuuden vuoksi tutkin näytteet vielä kerran 11.9.2009 (liite 4). Tulokset olivat melkein samankaltaisia mutta näytteiden vanhenemisen takia tulokset olivat matalampia.

10 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tulosten mukaan Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmällä voidaan osoittaa suoraan veriviljelypullojen näytteistä pneumokokki, vaikka AccuProbe-valmistajan ohjeen mukaan voi käyttää bakteerien pesäkettä. Veriviljelypullosta imetään sopiva määrä näytettä eppendorf-putkeen. Eppendorf-putki sentrifugoidaan kaksi kertaa. Ensimmäisessä sentrifugivaiheessa näytteestä poistuvat verisolut ja toisessa vaiheessa saadaan bakteerisakka putken pohjalle. Eppendorfputken pohjassa olevaa bakteerisakkaa voi käyttää luotettavasti AccuProbe-hybridisaatiomenetelmässä pneumokokin tunnistukseen. Työssäni olen käyttänyt yleensä aerobiveriviljelypulloja, sillä ne antavat korkeampia RLU-arvoja kuin anaerobi, mutta anaerobipullojakin voi käyttää luotettavasti.

Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä on nopea, helppo ja luotettava menetelmä *Streptococcus pneumoniae* tunnistamiseen. Menetelmä pystyy parhaiten erottamaan *Streptococcus pneumoniae* muista bakteereista ja tunnistaa pneumokokit korkealla spesifisyydellä ja sensitiivisyydellä. Työssä otos on 74 veriviljelypulloa, joissa oli 39 pneumokokki-pulloa, 34 muiden bakteerien pulloa ja yksi bakteeriton veriviljelypullo. AccuProbe-menetelmä tunnistoi kaikki pneumokokkinäytteet ja laski muut veriviljelynäytteet negatiivisiksi. Vain yksi oli väärä positiivinen, joka oli viridansstreptokokki.

Tässä työssä tuli esiin sellainen viridansstreptokokki, joka erottuu vaikeasti pneumokokista. Sen tulosarvo oli 467 455 RLU. Toisaalta myös oli sellaisia viridansstreptokokkia, joka antoi pienemmän tulosarvon, 92 233 RLU ja alaspäin. Tällaisten viridansstreptokokkien erottaminen pneumokokista AccuProbe-menetelmällä oli helppoa.

AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä voi käsitellä cut off -rajan perusteella. Tutkimustulosten ja sen käsittelyn perusteella paras cut off -arvo käyttöön on 560 000 RLU. Tässä tapauksessa spesifisyys on täydellistä 100 %, mutta sensitiivisyys on vähän pienennyt 97 %, joten väärät negatiiviset tulokset lisääntyvät. Tämän tilanteen kontrolloimista varten työn tulosten perusteella on muodostunut hämäräalue, jossa tulos ei ole tarpeeksi korkea eikä negatiivisen matala, tällöin tulos on tarkistettava muilla tutkimuskeinoilla. Tämä hämäräalue on 92 000 – 560 000 RLU-arvon

välialue. Näin meneteltäessä saataisiin myös sensitiivisyys nostettua lähemmäksi 100 %.

Tässä työssä tutkittu otos muodostuu potilaiden näytteistä, joissa infektiobakteeri on aiemmin tunnistettu perinteisellä- ja tarvittaessa PCR-menetelmällä potilaan hoidon aikana. Pneumokokin perinteiset tunnistusmenetelmät ovat fysiologisia ja biokemiallisia menetelmiä. Näitä ovat pesäkkeen morfologia, värjäys (Gram- ja Akridiinioranssivärjäys), katalaasitesti, alfa-hemolyysin muodostaminen, optokiiniherkkyys, antigeeniosoitus (latex) sekä sappi-liukoisuustesti. (Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007.)

Mikrobidiagnostiikassa PCR on kuitenkin säilyttänyt asemansa tärkeimpänä ja käytetyimpänä luotettavampana menetelmänä. PCR on menetelmä, johon muiden menetelmien tuloksia voi verrata luotettavasti. PCR-menetelmä on luotettavampi ja tarkempi kuin AccuProbe-menetelmä, sillä PCR-menetelmällä voidaan tunnistaa pneumokokki rDNA-geenin lisäksi myös autolysiini (lyt A)-geenin avulla. Autolysiinientsyymin koodaava-geeni on parempi kuin rDNA, sillä se on ainutlaatuinen pneumokille ja sen avulla voidaan parempi tunnistaa pneumokokki.

Bakteriologian laboratoriossa veriviljelynäytteessä infektiobakteeri tunnistetaan PCR-menetelmällä vain silloin, jos perinteisillä menetelmillä bakteerilajia ei voi tunnistaa. Tässä työssä on pyritty löytämään nopea ja luotettava menetelmä pneumokokin tunnistamiseksi. PCR-menetelmä on tarkka ja luotettava menetelmä, mutta se ei ole nopea ja se on työläs. PCR-tutkimuksen teko vaatii ennakko-suunnittelua, joten sitä ei aina voi tehdä samana päivänä, kun sitä tarvitaan. AccuProbe-menetelmä on nopeampi kuin PCR-menetelmä, mutta se ei ole sensitiivisempi eikä spesifisempi.

Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys ovat parempia kuin perinteiset tunnistusmenetelmät. Joitakin näytteitä ei voida tutkia perinteisillä menetelmillä ja ne joudutaan tunnistamaan pneumokokin PCR-menetelmällä. Tässä työssä AccuProbe-menetelmä pystyi tunnistamaan pneumokokkibakteereita kaikissa näytteissä, joista sitä piti löytyä. Toisaalta AccuProbe tunnsti veriviljelynäytteessä pneumokokin, kun perinteiset tunnistusmenetelmät tunnstivat sen viridansstreptokokiksi. Varmuuden vuoksi myöhemmin PCR-menetelmällä tutkittiin sama näyte ja saatiin sama tulos AccuProben tuloksen (pneumokokki) kanssa.

Työn tuloksen perusteella yhteenvedossa ja johtopäätöksessä työn tavoitteet tulivat selvästi esille. Työn tavoitteet ja vastaukset tavoitteissa asettamiini kysymyksiin on esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Työn tavoitteet ja vastaukset tavoitteissa asettamiini kysymyksiin.

Työn tavoitteen kysymykset	Vastaukset työtuloksen perusteella
Voitaneeko Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmällä osoittaa suoraan veriviljelypullojen näytteistä pneumokokki?	Kyllä voidaan osoittaa menetelmällä suoraan veriviljelypullojen näytteistä pneumokokki.
Mikä on tutkimuksen cut off -raja, jota suurempi tai yhtäsuuri testituloksella lasketaan positiiviseksi ja pienempi tulos lasketaan negatiiviseksi?	<ol style="list-style-type: none"> 1. 560 000 RLU (yksi väärä negatiivinen) 2. 379 563 RLU (yksi väärä positiivinen) 3. 50 000 RLU (viisi väärä positiivinen) <p>Hämäräalue on 92 000 – 560 000 RLU-arvon välialue, jossa tulos ei ole tarpeeksi korkea eikä negatiivisen matala!</p>
Mikä on Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän spesifisyys perinteiseen - ja PCR-menetelmään verrattuna?	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100 % 2. 97 % 3. 85,7 % <p>PCR on spesifisempi. AccuProbe-menetelmän spesifisyys on parempi kuin perinteinen menetelmä.</p>
Mikä on Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatiomenetelmän sensitiivisyys perinteiseen - ja PCR-menetelmään verrattuna?	<ol style="list-style-type: none"> 1. 97 % 2. 100 % 3. 100 % <p>PCR on sensitiivisempi. AccuProbe-menetelmän sensitiivisyys on parempi kuin perinteinen menetelmä.</p>

11 TYÖN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Opinnäytetyöni on kvantitatiivinen työ. Kvantitatiivisen työn luotettavuutta voidaan tarkastella validiteetin ja reliabiliteetin perusteella. Validiteetti eli pätevyys tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä tutkimuksessa oli tarkoituskin mitata. Validissa tutkimuksessa ja työssä ei ole systemaattista virhettä ja validilla mittarilla suoritettavat tutkimukset ovat keskimäärin oikeita. Mitattavien käsitteiden ja muuttujien täytyy olla tarkoin määritelty, tai muuten mittaustulokset eivät ole valideja.

(Heikkilä 2004, 29 – 30.) Työssäni olen asettanut täsmälliset tavoitteet työhöni, sillä en analysoi vääriä asioita. Tutkimuksessa sain vastaukset tutkimusongelmiin, joten tutkimuksessa on mitattu sitä, mitä oli tarkoitus mitata. Tutkimusta voidaan siis pitää tältä osin validina.

Reliabiliteetilla eli luotettavuudella tarkoitetaan tulosten tarkkuutta ja mittaustulosten toistettavuutta eli tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Tutkimuksen luotettavuus on riippuvainen mittarin luotettavuudesta. Reliaabelius voidaan todeta usealla tavalla, esimerkiksi jos kaksi tutkija päätyy samanlaiseen tulokseen, voidaan tulosta pitää reliaabelina. (Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2004: 216 – 217.) Tässä työssä käytetty veriviljelynäytteet on aikaisemmin testattu laboratorion muilla luotettavalla tutkimusmenetelmällä. AccuProbe-menetelmällä on tutkittu samat näytteet ja on saatu samanaista vastausta. Veriviljelynäytteissä on bakteerilajeja, joita on tarkoitettu tutkia molemmilla menetelmillä. Luotettavuuteen voi kuitenkin vaikuttaa otoskoko. Pieni otoskoko vaikuttaa tutkimuksen luotettavuuteen heikentävästi. Tulokset ovat sitä sattumanvaraisempia mitä pienempi otos on.

Työntulosten paremman luotettavuuden vuoksi olen mahdollisuuksien mukaan yrittänyt saada ison otoksen. Otoksessa tärkeiden bakteerilajien osuus on suuri. Tärkeät bakteerit ovat sellaisia, jotka vaikuttavat menetelmän spesifisyyteen ja sensitiivisyyteen, muun muassa pneumokokki ja viridans-streptokokit. Viridans-streptokokit ja pneumokokit ovat lähisukuisia, sen takia ne erottuvat hankalasti toisistaan. Työn otoksessa 53 % oli pneumokokkipositiivisia ja 24 % positiivisia viridans-streptokokkinäytteitä. Tällöin tärkeät bakteerilajit muodostavat 77 % otoksesta. (liite 3.) Otos jos olisi suurempi, voitaisiin parantaa tulosten tarkkuutta ja saada tarkka cut off -raja. Tämän ongelman ratkaisemista varten olen määrittänyt korkea cut off -raja ja hämäräraja alue, jossa tulos on tarkistettava muilla keinoilla. Tällöin voidaan todeta tulosten luotettavuutta.

Työn luotettavuuden parantamiseksi otoksessa on erilaisia bakteerilajeja, jotka toimivat kontrollina. Toisaalta veriviljelynäytteet, joita on käytetty tässä työssä, on aikaisemmin tutkittu muilla menetelmillä. Niiden takia on pystytty arvioimaan saman tien AccuProbe-hybridisaation tutkimustulosten oikeellisuus ja virheellisyys. Tarvittaessa tulosten ristiriitaisessa tilanteessa on yritetty selvittää tuloksen oikeellisuus PCR-menetelmällä.

Työssä käytetyt veriviljelypullot on säilytetty jääkaapissa, sillä bakteerit siellä säilyvät paremmin kuin lämpöhuoneessa (37 °C) ja huoneenlämmössä (25 °C). Veriviljelypullon käsittely on suoritettu steriilisti, koska pienikin määrä mikrobia päästyään ravinne-rikkaaseen veriviljelypulloon alkaa kasvaa voimakkaasti ja voi johtaa väärään positiiviseen tulokseen. Veriviljelypulloja on käsitelty suojakäsineet kädessä laminaarivirtauskaapissa. Pullon korkki on puhdistettu pyyhkimällä se hyvin etanoliin kostutetulla side-taitoksella ja sen jälkeen pullosta on imetty ruiskulla tarvittava näytemäärä steriiliin eppendorf-putkeen.

Koska AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä on herkkä menetelmä, se on altis monenlaisille virhelähteille. Työskentelyssä on noudatettava tarkkaa järjestystä ja tarkkoja työta-poja. Reagenssien pipetoinnissa on tehty tarkka pipetointi ja sekoitus ohjeen mukaan jokaisen reagenssin lisäämisen jälkeen. Sekoittaminen vorteksilla reaktiovaiheiden vä-lillä on tärkeää, jotta seos on homogeeninen varsinkin valintavaiheessa reagenssi-3:n lisäämisen jälkeen. Eppendorf-putken bakteerisakasta on otettu 1 µl silmukallinen näy-tettä reaktioseokseen, ja samaa menetelmää olen noudattanut kaikkien näytteiden käsit-telyssä. Tarkkaa inkubointiaikaa on noudatettu näytteiden laittamisessa lämpöhauteeseen ja on otettu hyvin huomioon lämpöhauteen lämpötila (60° ± 1 °C). Lämpöhauteen lämpötilan ollessa yli 61 °C hybridisaatio vähenee ja saadaan vääriä negatiivisia tulok-sia. Lämpöhauteen lämpötilan ollessa alle 59 °C, syntyy täsmentämättömiä fiksaatioita ja saadaan vääriä positiivisia tuloksia.

12 POHDINTA

Tuloksista ilmeni, että AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä erottelee hyvin *Streptococ-cus pneumoniae* muista bakteerilajista ja osan lähisukuisista viridans-streptokokista suo-raan veriviljelypullosta. Ongelmana ovat viridas-streptokokit, joiden 16SrRNA sek-venssi on lähes sama kuin pneumokokin. AccuProbe-menetelmän kyky tällaisten viri-dans-streptokokin ja pneumokokin erottamisessa toisistaan on rajallista.

Viridans-streptokokin ja pneumokokin erottaminen yhden cut off -rajan perusteella ei ollut mahdollista. Tulosten perusteella olen ehdottanut käytettäväksi korkea cut off -raja ja hämärätulosalue, jossa tulokset voivat RLU-arvojen perusteella olla pneumokokki tai viridans-streptokokki. Hämäräalue on tulosarvo alue, jossa emme voi spesifisesti erottaa

pneumokokkia viridans-streptokokista. Tämä alue voitaisiin saada kapeammaksi, jos analysoitaisiin suurempi määrä pneumokokki- ja viridans-streptokokki veriviljelynäytteitä. Tarkan cut off -rajan määrittämiseksi tarvitaan lisää tutkimuksia sekä päivittäisten tulosten seuranta.

Tulosten perusteella toimeksiantaja pystyy käyttämään luotettavasti AccuProbe-hybridisaatiomenetelmä veriviljelynäytteiden tutkimisessa. Menetelmä on huomattavasti nopeampi kuin nykyisin käytössä oleva PCR-menetelmä ja perinteinen menetelmä. Pneumokokin tunnistuksessa varsinkin veriviljelyssä perimän tutkimukseen perustuvat menetelmät ovat spesifisempiä ja sensitiivisempiä kuin perinteiset menetelmät. Perinteiset menetelmät eivät joskus voi erottaa lähisukuisia bakteereita toisistaan. Näitä bakteereita ovat muun muassa pneumokokki ja viridanssi-streptokokki. Veriviljelypullossa kun bakteeri hemolysoituu, ei silloin voida tunnistaa sitä perinteisellä menetelmällä ja tunnistusvaihtoehtoksi jää vain perimän tutkimukseen perustuvat menetelmät.

Perimän tutkimukseen perustuvat menetelmät muun muassa AccuProbe-menetelmä ja PCR-menetelmä ovat tarkkoja ja luotettavia. Niiden heikkopuoli perinteisen tunnistusmenetelmän verrattuna on, ettei niiden avulla voi tehdä löydöksen bakteerin herkkyysmäärittystä. Herkkyysmäärittys on aina syytä tehdä perinteisellä menetelmällä ja viljellä bakteeri maljalle.

Työssä selvitin, että voidaan suoraan veriviljelypullojen näytteistä tunnistaa pneumokokki AccuProbe-menetelmällä. Suoraan näytteiden otto veriviljelypullostaa tutkimukseen AccuProbeella ei kuitenkaan ole kovin yksinkertaista pesäkkeen käyttöön verrattuna. Pesäkkeen käytössä poimitaan 1 μ silmukalla yhdestä neljään pesäkettä, pesäkkeen koon mukaan. Suoraan näytteiden otto veriviljelypullostaa ei ole yhtä tarkka. Näytteen otossa silmukalla suoraan veriviljelypullostaa pitää ottaa vain niin, että täyttää 1 μ silmukan renkaan sisäreikä. Tutkimuksen tulos suurene jos näytteen koko on iso ja pienenee jos näytteen koko on pieni. Tällöin esiintyy vääriä positiivisia ja vääriä negatiivisia tuloksia. Tärkeää on, että henkilöt, jotka käyttävät samaa cut off-rajaa, käyttävät myös samaa työtapaa näytteiden esikäsittelyssä ja sen otossa tutkimukseen. Jatko tutkimuksena on hyvää testata ja vertailla pipetin käyttö silmukan tilalla, sillä pipetti on tarkempi kuin silmukka. Pipetti on tarkka väline näytteen ottoon, jolloin pipetin käytössä tutkimusmenetelmässä tulos on tarkempaa ja luotettavampaa kuin silmukan käyttö.

Joihinkin aikaisempiin tutkimuksiin verrattuna aiheesta olen saanut työssäni korkeampia tuloksia. Työssäni matalin positiivinen pneumokokin tulosarvo on 379 563 RLU, mutta Laura Lindholmin ja Hannu Sarkkisen (2004) tutkimuksessa Päijät-Hämeen keskussairaalassa on neljä väärää negatiivista pneumokokkia, cut off -raja ollessa 50 000 RLU. Muissa tutkimuksissakin cut off -raja on matala noin 50 000–60 000 RLU:n välillä. Syynä voi olla se, että työssäni oleva otos aikaisempiin tutkimuksiin verrattuna on pieni. Toisaalta voi olla muissa tutkimuksissa käytetty alle 1 μ silmukallisen näytettä. Aikaisemmissa tutkimuksissa aiheesta, joissa on käytetty suoraan veriviljelynäytettä, näytteidenalkukäsittelyssä näytettä on sentrifugoitu lyhyt aika. Tämän takia vähän bakteeri on kasaantunut käyttöön tutkimukseen, jolloin tulos on matala. Aikaisemmissa tutkimuksissa aiheesta yleisesti ei ole viridans-streptokokki otettu tärkeänä vaikuttavana tekijänä. Viridans-streptokokkinäytteet antavat paljon väärää positiivisia. Työssäni käytäessä 50 000 RLU cut off -rajana, vääräpositiivista on viisi ja ne kaikki ovat viridans-streptokokkeja.

LÄHTEET

- Ahola, Juhana 2001: *Streptococcus pneumoniae* virulenssitekijät. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti.
<www.mm.helsinki.fi/users/lindstro/Opetus/Opetus_2003/Seminaarityot_2001>
Luettu 3.8.2009.
- BacT/ALERT 3D 2002: Microbial Detection System. Operator Manual. Analysaattorin käyttöohje.
- Bakteerin nukleiinihapon osoitus 2007: Bakteeri-PCR. Bakteriologisten tutkimusten lähete. Turun yliopisto. Verkkodokumentti. < www.med.utu.fi > Luettu 6.8.2009.
- Cheesbrough, Monica 2006: District Laboratory Practice in Tropical Countries, Second edition. Part 2. Cambridge University. 63–64.
- Davis, Thomas E. – Fuller, Deanna D. 1991: Direct Identification of Bacterial Isolates in Blood Cultures by Using a DNA Probe. Wishard Memorial Hospital, Indiana University Medical Center. Journal of clinical microbiology, Oct. 1991.
- Denys, Gerald A. – Carey, Robert B. 1992: Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA Probe. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Methodist Hospital of Indiana, St. Francis Hospital. Journal of clinical microbiology.
- Gen-Probe-valmistajan tutkimus 2007: *Streptococcus pneumoniae* culture identification test. bioMérieux ref. 39204 / Gen-Probe Cat. No. 2865. Verkkodokumentti < <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/102946RevJ.pdf>>. Luettu 15.2.2009.
- Hautala, Timo 2007: Veriviljely vakavien yleisinfektioiden diagnostiikassa, klinikon näkökulma. Moodi 1/2007. 38 – 39.
- Heikkilä, Tarja 2004: Tilastollinen tutkimus. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Helimäki, Satu – Laari, Petra 2003: Gen-Probe AccuProbe-hybridisaatio ja bakteeriviljely. Opinnäytetyö. Helsingin Ammatikorkeakoulu stadia.
- Hill, Craig S. 1996: Gen-Probe Transcription-Mediated Amplification: System Principles. Verkkodokumentti. <http://www.gen-probe.com/pdfs/tma_whiteppr.pdf>
Luettu 7.8.2009.
- Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula 2004: Tutki ja kirjoita. Helsinki. Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Hong, Tao 2006: Probe-Based Microbial Detection and Identification. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. United States. 134–142.
- Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus OY Duodecim.

- Hybridization Protection Assay (HPA) 1989: Gen-Probe. Technical Bulletin. San Diego, California.
- Hänninen, Pentti – Huovinen, Pentti 1991: Infektiotaudit. Helsinki. WSOY.
- Jumppanen, Mervi 2007: In situ hybridisaatio-menetelmä patologian laboratorion työlineenä. Moodi. 1.2007. 45.
- Karahan, Z. Ceren – Mumcuoglu, Ipek – Guriz, Haluk – Tamer, Deniz – Balaban, Neriman – Aysev, Derya – Akar, Nejat 2005: PCR evaluation of false-positive signals from two automated blood-culture systems. Ankara University. Turkey. Journal of Medical Microbiology (2006). 55, 53–57.
- Katalaasikoe1999: Suositus virtsan perustutkimuksia ja bakteeri viljelyä varten. Moodi. Erillisjulkaisu 7/1999. 48.
- Kauppila, Jaana 2007: Veriviljely vaikeiden infektioiden diagnostiikassa-laboratorion näkökulma. Moodi 1/2007. 36–37.
- Keinänen, Arja 2009: Laboratoriohoitaja. Päjäät-hämeen keskussairaalan laboratorio. Suullinen ja kirjallinen tiedonanto. 1.6.2009.
- Keski-Vinkka, Virva 1999: Eri Tunnistusmenetelmien Vertailu *Streptococcus pneumoniae* Diagnostiikassa. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu.
- Koneman, Elmer W. – Gail Baker, Woods – Allen, Stephen – Winn, Washington C. – Janda, William M – Schreckenberger, Paul C. – Procop, Gary 2005: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams and Wilkins.
- Lindholm, Laura – Sarkkinen Hannu 2004: Direct Identification of Gram-Positive Cocci from Routine Blood Cultures by Using AccuProbe Tests. Department of Clinical Microbiology, Päijät-Häme Central Hospital, Lahti, Finland.
- Meri, Seppo – Huovinen, Pentti – Peltola Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen Ville 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet Kirja II. Helsinki. Kustannus Oy Duodecim.
- Millipore Oy: Mycoplasma Tissue Culture Non-Isotopic Rapid Detection - MTC-NI System. Verkkodokumentti. <<http://www.millipore.com/catalogue/module/c10773>> Luettu 12.8.2009.
- Nikkari, Simo 2002: Uusia suuntia mikrobien nukleiinihappodiagnostiikassa. Kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri. MoBiDiag Oy. Verkkodokumentti <<http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/kasikirja/?id=122> > Luettu 31.8.2009.
- Näytteenoton asiantuntijaryhmä 2006: Veriviljelyn näytteenotto. Näytteenotonkäsikirja-erillisohje. Kliininen mikrobiologia. Bakteriologian osasto. HUSLAB.
- Pien, Brian C. – Mirrett, Stanley – Crews, Betty R. – Reller, L. Barth – Woods, Christopher W. 2007: Controlled Clinical Comparison of BacT/ALERT Standard Aerobic and Standard Anaerobic Blood Culture Bottles Inoculated Directly or after

Transport in Sodium Polyanethol Sulfonate Tubes. American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Laboratory, Duke University Medical Center.

Pihlaja Hannele 2009: Reaaliaikainen PCR-menetelmä. Koulu materiaali. Metropolia ammattikorkeakoulu.

Richter, Sandra S. – Heilmann, Kristopher P. – Dohrn, Cassie L. – Riahi, Fathollah – Beekmann, Susan E. – Doern, Gary V. 2008: Accuracy of Phenotypic Methods for Identification of *Streptococcus pneumoniae* Isolates Included in Surveillance Programs. University of Iowa Carver College of Medicine. Journal of clinical microbiology. American Society for Microbiology.

Skyttä, Retta 2002: *Streptococcus pneumoniae*-diagnostiikan kehittäminen geenimonistuksen menetelmän avulla. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia.

Slidex pneumo-Kit 2004: Slidex pneumo-Kit is a rapid latex agglutination test for *S. pneumoniae* strains from cultures. France. bioMerieux ® sa.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2004: Yhdistelmä DNA tekniikan perusteet. Helsinki. Opetushallitus.

SysChec 2007: Gen-Probe SysChec. Verkkodokumentti. < <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/IN0088-01RevB.pdf>> Luettu 7.8.2009.

Tarkka, Eveliina 2009: Sairaalamikrobiologi, HUSLAB Bakteriologian osasto. Sähköposti tiedonanto. 8.9.2009.

Tarkka, Eveliina 2007: AccuProbe-työohje. Kliininen mikrobiologia. Bakteriologian osasto. HUSLAB.

Tarkka, Eveliina – Haverinen M. 2008: *S. pneumoniae* ja *S. meningitidis* reaaliaika PCR. Yleisbakteeri PCR. Työohje. Kliininen mikrobiologia. Bakteriologian osasto. HUSLAB.

Veriviljelypisteen työohje 2009: B-Bakteeri, Veriviljely. Kliinisen mikrobiologia. Bakteriologian osasto. HUSLAB.

Viljanen, Matti K. 1995: PCR-sekvensointi tulossa mikrobiologiaan. Kansanterveyslehti 8/1995.

XIANG, HAN 2006: Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. United States. 323–332.

1. AccuProbe-hybridisaaatiotestin tulokset.

1 (2)

	Bakteeri	NäyteNo	VeriPullo	AccuP.RLU	TulosTulkin	Tekopäivä
1	Str. pneum	1702	Aerobi	1242288	Positiivi	40609
2	Str. pneum	322	Aerobi	1179073	Positiivi	90609
3	Str. pneum	1294	Aerobi	1159372	Positiivi	90609
4	Str. pneum	1658	Aerobi	1105333	Positiivi	220509
5	Str. pneum	1603	Aerobi	1103920	Positiivi	40609
6	Str. pneum	1955	Aerobi	1075587	Positiivi	250609
7	Str. pneum	720	Anaerobi	1059187	Positiivi	90609
8	Str. pneum	2000	Aerobi	1047092	Positiivi	260609
9	Str. pneum	321	Aerobi	1047088	Positiivi	90609
10	Str. pneum	2011	Aerobi	1034413	Positiivi	260609
11	Str. pneum	1275	Aerobi	1012536	Positiivi	90609
12	Str. pneum	1954	Aerobi	1011128	Positiivi	250609
13	Str. pneum	1272	Aerobi	995842	Positiivi	90609
14	Str. pneum	2324	Aerobi	972674	Positiivi	170709
15	Str. pneum	1890	Aerobi	970745	Positiivi	250609
16	Str. pneum	2097	Aerobi	957701	Positiivi	170709
17	Str. pneum	746	Aerobi	954718	Positiivi	150609
18	Str. pneum	1701	Aerobi	943368	Positiivi	40609
19	Str. pneum	343	Aerobi	942287	Positiivi	90609
20	Str. pneum	2348	Aerobi	931077	Positiivi	170709
21	Str. pneum	2138	Aerobi	927702	Positiivi	170709
22	Str. pneum	747	Aerobi	925691	Positiivi	150609
23	Str. pneum	342	Aerobi	922562	Positiivi	90609
24	Str. pneum	2147	Aerobi	880338	Positiivi	170709
25	Str. pneum	1987	Anaerobi	858596	Positiivi	250609
26	Str. pneum	1979	Aerobi	858575	Positiivi	250609
27	Str. pneum	2317	Aerobi	856151	Positiivi	170709
28	Str. pneum	325	Aerobi	854358	Positiivi	40609
29	Str. pneum	1293	Aerobi	846046	Positiivi	90609
30	Str. pneum	345	Aerobi	825472	Positiivi	90609
31	Str. pneum	2029	Aerobi	813702	Positiivi	260609
32	Str. pneum	1874	Aerobi	789969	Positiivi	250609
33	Str. pneum	1731	Anaerobi	772424	Positiivi	150609
34	Str. pneum	1827	Aerobi	746564	Positiivi	150609
35	Str. pneum	2318	Aerobi	734852	Positiivi	170709
36	Str. pneum	1969	Aerobi	716670	Positiivi	250609
37	Str. pneum	2023	Aerobi	687243	Positiivi	260609
38	Str. pneum	1990	Aerobi	560176	Positiivi	250609
39	Str. viridan	728	Anaerobi	467455	Väärä posit	150609
40	Str. pneum	344	Aerobi	379563	Positiivi	90609
41	Str. viridan	1980	Aerobi	92233	Negatiivi	250609
42	Str. viridan	2031	Aerobi	56285	Negatiivi	170709

	Bakteeri	NäyteNo	VeriPullo	AccuP.RLU	TulosTulkin	Tekopäivä
43	Str. viridan	1818	Aerobi	55641	Negatiivi	150609
44	Str. viridan	1810	Aerobi	52615	Negatiivi	150609
45	Str. viridan	1861	Aerobi	48174	Negatiivi	250609
46	Str. viridan	1982	Aerobi	39417	Negatiivi	260609
47	Str. pyoge	1736	Aerobi	35883	Negatiivi	150609
48	Str. pyoge	1935	Aerobi	35132	Negatiivi	260609
49	Str. viridan	2155	Aerobi	33163	Negatiivi	170709
50	Str. viridan	1893	Anaerobi	31287	Negatiivi	250609
51	Str. viridan	2288	Anaerobi	30576	Negatiivi	170709
52	Str. viridan	1742	Aerobi	29961	Negatiivi	150609
53	Str. β -hem	1964	Anaerobi	29003	Negatiivi	260609
54	Str. pyoge	2002	Aerobi	27937	Negatiivi	260609
55	E. faecium	717	Aerobi	27914	Negatiivi	150609
56	Str. pyoge	735	Aerobi	26830	Negatiivi	150609
57	Str. viridan	2237	Anaerobi	24494	Negatiivi	170709
58	Str. viridan	727	Aerobi	24339	Negatiivi	150609
59	Str. agalact	719	Aerobi	24216	Negatiivi	150609
60	Str. viridan	2247	Aerobi	23045	Negatiivi	170709
61	Str. β -hem	1842	Aerobi	22267	Negatiivi	150609
62	Str. pyoge	1936	Aerobi	22233	Negatiivi	260609
63	St. aureus	1783	Aerobi	22112	Negatiivi	150609
64	Str. viridan	2162	Aerobi	16557	Negatiivi	170709
65	Str. viridan	2047	Aerobi	16324	Negatiivi	170709
66	Str. bovis	1952	Aerobi	15887	Negatiivi	260609
67	Str. viridan	1850	Aerobi	14628	Negatiivi	250609
68	bakteeriton	750	Aerobi	13370	Negatiivi	150609
69	E. faecalis	1968	Aerobi	11998	Negatiivi	260609
70	E. coli	1768	Aerobi	11337	Negatiivi	150609
71	Str. viridan	1866	Aerobi	10892	Negatiivi	250609
72	Sta. epider	1781	Aerobi	7635	Negatiivi	150609
73	Klebsiella	1836	Aerobi	4508	Negatiivi	150609
74	Ps. aerogin	758	Aerobi	3593	Negatiivi	150609

2. Otoksessa olevat erilaiset bakteerilajit, niiden määrä ja -tulosten maksimi ja

Bakteeri laji	Näyte	Minimi	Maksimi
Str. pneumoniae	Bakteeri laji	39	1
	AccuProben RLU tulos	39	379563
Str. viridans	Bakteeri laji	18	2
	AccuProben RLU tulos	18	10892
St. aureus	Bakteeri laji	1	3
	AccuProben RLU tulos	1	22112
Sta. epidermids	Bakteeri laji	1	4
	AccuProben RLU tulos	1	7635
Str. agalactiae	Bakteeri laji	1	5
	AccuProben RLU tulos	1	24216
Str. pyogenes	Bakteeri laji	5	6
	AccuProben RLU tulos	5	22233
Str. β -hemolyysi G	Bakteeri laji	2	7
	AccuProben RLU tulos	2	22267
Str. bovis	Bakteeri laji	1	8
	AccuProben RLU tulos	1	15887
E. faecalis	Bakteeri laji	1	9
	AccuProben RLU tulos	1	11998
E. faecium	Bakteeri laji	1	10
	AccuProben RLU tulos	1	27914
E. coli	Bakteeri laji	1	11
	AccuProben RLU tulos	1	11337
Klebsiella pneumoniae	Bakteeri laji	1	12
	AccuProben RLU tulos	1	4508
bakteeriton näyte	Bakteeri laji	1	13
	AccuProben RLU tulos	1	13370
Ps. aeruginosa	Bakteeri laji	1	14
	AccuProben RLU tulos	1	3593

3. Näytteiden tutkimisen tekopäivä.

Päivämäärä	Näyte	Prosentti	Kumulatiivinen prosentti
4.6.2009	4	5,4	5,4
9.6.2009	11	14,9	20,3
15.6.2009	20	27,0	47,3
17.7.2009	14	18,9	66,2
22.5.2009	1	1,4	67,6
25.6.2009	13	17,6	85,1
26.6.2009	11	14,9	100,0
Otoksen summa	74	100,0	

4. Erilaisten tulosten näytteiden määrä ja niiden prosentti osuus.

Tulokset	Näyte	Prosentti	Kumulatiivinen prosentti
Positiivi	39	52,7	52,7
Negatiivi	34	45,9	98,6
Väärä positiivinen	1	1,4	100,0
Otoksen summa	74	100,0	

5. Työn otoksessa aerobisen ja anaerobisen määrä ja prosenttiosuus.

1 (1)

Veriviljelypullotyyppi	Näytteiden määrä	Prosentti
Aerobi	66	89,2
Anaerobi	8	10,8
Otoksen summa	74	100,0

6. Työn otoksessa olevat erilaiset bakteerilajit, niiden määrä ja prosenttiosuus.

Bakteeri laji	Näyte (otos)	Prosentti	Kumulatiivinen prosentti
Str. pneumoniae	39	52,7	52,7
Str. viridans	18	24,3	77,0
St. aureus	1	1,4	78,4
Sta. epidermidis	1	1,4	79,7
Str. agalactiae	1	1,4	81,1
Str. pyogenes	5	6,8	87,8
Str. β -hemolyyysi G	2	2,7	90,5
Str. bovis	1	1,4	91,9
E. faecalis	1	1,4	93,2
E. faecium	1	1,4	94,6
E. coli	1	1,4	95,9
Klebsiella pneumoniae	1	1,4	97,3
bakteeriton näyte	1	1,4	98,6
Ps. aeruginosa	1	1,4	100,0
Otoksen summa	74	100,0	

7. Yhdeksän potilaan kahden veriviljelypullon RLU-tulosarvon väliero.

	NäyteNo1	Ensi.RLU	NäyteNo2	ToisenRLU	Ero
1	344	379563	345	825472	-445909,00
2	727	24339	728	467455	-443116,00
3	1293	846046	1294	1159372	-313326,00
4	1701	943368	1702	1242288	-298920,00
5	321	1047088	322	1179073	-131985,00
6	2023	687243	2029	813702	-126459,00
7	1954	1011128	1955	1075587	-64459,00
8	1982	39417	1980	92233	-52816,00
9	342	922562	343	942287	-19725,00

8. Erilaisten cut off -rajojen a,b,c ja d arvot

1(1)

	Cut off -arvo	a= oikeat positiiviset	b= väärät pos.	c= väärät neg.	d=oikeat neg.
1	560 000 RLU	38	0	1	35
2	379 563 RLU	39	1	0	34
3	50 000 RLU	39	5	0	30

9. Kahden erimenetelmän veriviljelynäytteiden käsittelyn tulokset.

Näyttenumero	menetelmän numero	aerobi / anaerobi	AccuProben lukema (RLU)
No. 1	1. menetelmä (1 min.)	Aerobi	921 757
	1. menetelmä (1 min.)	An aerorbi	873 164
	2. menetelmä (3min.)	Aerobi	943 368
	2. menetelmä (3min.)	An aerorbi	778 545
No. 2	1. menetelmä (1 min.)	Aerobi	1 233 971
	2. menetelmä (3min.)	Aerobi	1 242 288
No. 3	1. menetelmä (1 min.)	Aerobei	1 157 938
	1. menetelmä (1 min.)	An aerobi	791 661
	2. menetelmä (3min.)	Aerobi	1 103 920
	2. menetelmä (3min.)	An aerobi	772 643
No. 4	1. menetelmä (1 min.)	Aerobi	842 731
	1. menetelmä (1 min.)	Anaerobi	856 734
	2. menetelmä (3min.)	Aerobi	854 358
	2. menetelmä (3min.)	Anaerobi	675 765

10. Näytteiden tutkimuksen toistaminen

	Näytteen tunnusnumero	Tulos 15 – 19.6.2009	Tulos 11.9.2009
1	VT 727	24 339 RLU	37 858 RLU
2	VT 728	467 455 RLU	näyte ei löydy
3	VT 344	379 563 RLU	135 829 RLU
4	VT 345	825 472 RLU	570 538 RLU