



PCR KLIINISESSÄ BAKTE- RIOLOGIASSA

Kliinisen bakteriologian PCR-menetelmäpohjaiset tutki-
mukset

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Anna Airas	
Työn nimi PCR kliinisessä bakteriologiassa – Kliinisen bakteriologian PCR-menetelmäpohjaiset tutkimukset	
Päiväys	31.10.2013
Sivumäärä/Liitteet	57/1
Ohjaaja(t) Marko Björn	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Savonia-ammattikorkeakoulu	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Molekyylibiologiset menetelmät kehittyvät jatkuvasti ja uusia menetelmiä otetaan käyttöön kliinisessä rutiinidiagnostiikassa. Polymeraasiketjureaktio eli PCR on geenitekniikan menetelmä, jolla voidaan monistaa haluttua nukleinihappojaksoa. Kliinisen bakteriologian käyttöön on kehitetty monia erilaisia PCR-tekniikkaan pohjautuvia tutkimusmenetelmiä. PCR-tekniikoilla voidaan tunnistaa bakteereja, tyyppittää ne eri bakteerikantoihin kuuluviksi, tunnistaa bakteerien tiettyjä, esimerkiksi resistenssi- ja virulenssiominaisuuksiin vaikuttavia geenejä sekä selvittää bakteerien aiheuttamia epidemioita. PCR-tekniikkaan perustuvan tutkimusmenetelmän käyttö voi nopeuttaa diagnoosin tekoa huomattavasti perinteisiin menetelmiin verrattuna. PCR-tekniikat diagnostiikassa voivat olla erityisen tärkeitä tutkittaessa hidaskasvuisia (esim. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>) tai vaikeasti viljeltäviä bakteereja (esim. <i>Bordetella pertussis</i>).</p> <p>Opinnäytetyö on kehittämistyö, jonka tuotoksena on teoreettisesti tiedonhaun ja tiedon koostamisen pohjalta tehty posterit PCR:stä ja sen hyödyntämisestä kliinisessä bakteriologiassa. Opinnäytetyön tarkoituksena on ollut muodostaa yhteenveto käytössä olevista molekyylibiologian PCR-tekniikkaan pohjautuvista kliinisen bakteriologian laboratoriotutkimuksista ja tutkimusmenetelmistä. Opinnäytetyön raportissa PCR:ää, kliinistä bakteriologiaa ja PCR:n käyttöä kliinisessä bakteriologiassa käsitellään posteria laajemmin. Työn tavoitteena on ollut saada tietoa helposti saavutettavaan ja omaksuttavaan muotoon sekä lisätä opiskelijoiden tietoa PCR:stä ja sen hyödyntämisestä kliinisessä bakteriologiassa. Posterit tulevat esille työn toimeksiantajan Savonia-ammattikorkeakoulun tiloihin, missä opiskelijat ja henkilökunta voivat helposti saada tietoa aiheesta. Posterista on pyritty tekemään selkeää ja ymmärrettävää jokaiselle, alaan perehtymättömällekin lukijalle.</p>	
Avainsanat polymeraasiketjureaktio, pcr, bakteriologia	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Anna Airas			
Title of Thesis PCR in clinical bacteriology – PCR-method based laboratory tests in clinical bacteriology			
Date	31.10.2013	Pages/Appendices	57/1
Supervisor(s) Marko Björn			
Client Organisation /Partners Savonia university of applied sciences			
<p>Abstract</p> <p>Molecylebiological methods are developing all the time and new methods are being used in routine clinical diagnostics. Polymerase chain reaction (PCR) is a gencechnological method for nucleic acid amplification. Many different PCR-based methods have been developed for clinical bacteriology. With the PCR methods it is possible to identify bacteria species, type those to different bacterial populations, identify specific genes that are influential in resistance or virulence and resolve epidemics caused by bacteria. The PCR methods could speed up the diagnosis significantly compared to traditional methods. The PCR methods can be especially important when examining slow-growing bacteria such as <i>Mycobacterium tuberculosis</i> or laboriously cultured bacteria such as <i>Bordetella pertussis</i>.</p> <p>The purpose of the thesis is to develop a poster about PCR and its use in clinical bacteriology based on theoretic information retrieval and information gathering. The purpose of the thesis is to form a summary about PCR-based molecylebiological laboratory tests and methods used in clinical bacteriology. PCR, clinical bacteriology and the use of PCR have been discussed in the thesis report more than in the poster. The aim of the thesis is to get information in an easily achieved and understandable form and to increase students' knowledge about PCR and its use in clinical bacteriology. The poster is coming to be seen in a room at Savonia University of Applied Sciences where students and staff can easily get information about the subject. I have tried to make the poster clear and understandable for every reader, also to those who have not been familiar with the subject before.</p>			
Keywords polymerase chain reaction, pcr, bacteriology			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	KESKEISIÄ KÄSITTEITÄ JA LYHENTEITÄ	7
3	KLIININEN BAKTERIOLOGIA.....	8
3.1	Bakteriologian historia	8
3.2	Bakteeri	9
3.2.1	Bakteerin rakenne ja toiminta.....	9
3.2.2	Bakteerigenetiikka.....	10
3.2.3	Bakteerien luokittelu ja tyypitys.....	12
3.3	Bakteriologian tutkimusmenetelmät.....	14
3.3.1	Mikroskopointi ja värjäys	14
3.3.2	Viljely ja herkkyysmääritykset.....	15
3.3.3	Geeniteknologiset sekä muut uudet menetelmät.....	17
4	POLYMEERAASIKETJUREAKTIO ELI PCR.....	19
4.1	Alukkeiden suunnittelu.....	21
4.2	PCR:n optimointi	22
4.3	PCR-tuotteen jatkokäsittely	23
4.4	Erilaisia PCR sovelluksia	24
5	KLIINISESTI MERKITTÄVIÄ PCR-MENETELMÄLLÄ TUTKITTAVIA BAKTEEREJA	26
5.1	<i>Bordetella pertussis</i>	26
5.1.1	Infektio.....	26
5.1.2	Diagnostiikka ja hoito	27
5.1.3	PCR-diagnostiikka	27
5.2	<i>Borrelia burgdorferi</i>	28
5.2.1	Infektio.....	29
5.2.2	Diagnostiikka ja hoito	29
5.2.3	PCR-diagnostiikka	30
5.3	<i>Chlamydia trachomatis</i>	31
5.3.1	Infektio.....	31
5.3.2	Diagnostiikka ja hoito	32
5.3.3	PCR-diagnostiikka	32

5.4	<i>Clostridium difficile</i>	34
5.4.1	Infektio.....	34
5.4.2	Diagnostiikka ja hoito	35
5.4.3	PCR-diagnostiikka	35
5.5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37
5.5.1	Infektio.....	38
5.5.2	Diagnostiikka ja hoito	38
5.5.3	PCR-diagnostiikka	40
5.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	41
5.6.1	Infektio.....	41
5.6.2	Diagnostiikka.....	41
5.6.3	MRSA eli metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>	42
5.6.4	PCR-diagnostiikka	43
6	TYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	45
7	TYÖN TOTEUTUS	46
7.1	Ideointi, suunnittelu ja tiedonhaku	46
7.2	Posterin koostaminen	48
8	POHDINTA.....	50
	LÄHTEET	53
	LIITE 1	58

1 JOHDANTO

Molekyylibiologisten menetelmien hyödyntäminen kliinisen mikrobiologian diagnostiikassa on lisääntynyt paljon viime vuosina menetelmien kehittymisen ja uusien menetelmien keksimisen myötä (Didelot, Bowden, Wilson, Peto & Crook 2012). Polymeerasiketjureaktiolla eli PCR:llä voidaan monistaa haluttua tunnettua nukleiinihappojaksoa (Brown 2010, 147). Kliinisessä bakteriologiassa pystytään PCR:n avulla tunnistamaan bakteereja, havaisemaan niiden tiettyjä ominaisuuksia tuottavia geenejä sekä tunnistamaan ja tyyppittämään eri bakteerikantoja (Carlson & Koskela 2011). Tunnistamalla ja tyyppittämällä bakteerikantoja voidaan selvittää bakteerien aiheuttamien epidemioiden tartuntareittejä ja leviämistä (Valve ym. 2011). Tutkimalla epidemioiden leviämistä voidaan entistä paremmin tutkia bakteerien leviämisreittejä ja estää uusien vakavien epidemioiden syntyä.

Valitsin opinnäytetyöni aiheeksi "PCR kliinisessä bakteriologiassa". Opinnäytetyöni tarkoituksena on ollut muodostaa yhteenveto käytössä olevista molekyylibiologian PCR-tekniikkaan pohjautuvista kliinisen bakteriologian laboratoriotutkimuksista ja tutkimusmenetelmistä. Tältä aihealueelta ei ole aikaisemmin juurikaan tehty opinnäytetöitä ja aiheeseen liittyvää tietoa erityisesti suomen kielellä on hyvin rajallisesti saatavissa, minkä vuoksi otin tämän aiheen. Käsittelen tässä työssä polymeerasiketjureaktiota eli PCR:ää ja sen hyödyntämistä kliinisen mikrobiologian bakteriologisissa tutkimuksissa. Käsittelen aihetta teoreettisesti lähdeaineistojen pohjalta. Olen käsitellyt työssä yleisesti kliinistä bakteriologiaa ja polymeerasiketjureaktiota molekyylibiologisena tutkimusmenetelmänä. Lisäksi olen käsitellyt tarkemmin voitakin bakteereja, joiden diagnostiikassa hyödynnetään PCR-menetelmiä suomalaisissa laboratorioissa. Käsittelyyn valitsin bakteereja, jotka ovat kliinisesti merkittäviä. Kliinistä merkittävyyttä arvioin tartuntatautilastojen valossa (Jaakola ym. 2013). Olen pyrkinyt tekemään työn, joka käsittelee kattavasti erilaisia käytössä olevia tutkimuksia ja menetelmiä. Olen halunnut tehdä työstäni helposti ymmärrettävän, jotta se voisi palvella muita opiskelijoita tiedonhaussa.

Työni on kehittämistyö, eli laadin lähdeaineistojen pohjalta posterin polymeerasiketjureaktiosta ja sen hyödyntämisestä kliinisessä bakteriologiassa. Työni tavoitteena on ollut saada tietoa helposti saavutettavaan ja omaksuttavaan muotoon posterille sekä lisätä posterin välityksellä opiskelijoiden tietoa PCR:stä ja sen hyödyntämisestä kliinisessä bakteriologiassa. Tämä posterit asetetaan nähtäväksi Savonia-ammattikorkeakoulun Kuopion terveystalon yksikköön siten, että erityisesti bioanalytiikan ja muut terveystalon opiskelijat voivat tutustua posterin sisältöön ja oppia perusteita PCR:stä ja sen käytöstä. Työni toimeksiantajana on Savonia-ammattikorkeakoulu.

2 KESKEISIÄ KÄSITTEITÄ JA LYHENTEITÄ

bakteeri

Bakteerit ovat yksisoluisia, alkeistumallisia eli prokaryootteja, jakaantumalla lisääntyviä eliöitä. Monet bakteereista ovat patogeenisia ihmiselle. (Heikkilä & Meurman 2005a, 31-32.)

DNA eli deoksiribonukleiinihappo

Deoksiribonukleiinihappomolekyyli sisältää geneettistä informaatiota pakattuna kemialliseen muotoon. Bakteerien perimäaines on DNA:ta. DNA-molekyyli sisältää geenejä, jotka sisältävät koodin proteiinien valmistusta varten. Koodaavien geenien lisäksi DNA-molekyyli sisältää koodaamatonta aluetta, jonka tarkoitusta ei täysin tunneta. DNA on rakenteeltaan pitkä kaksoiskierteinen kahdesta nukleotidijuosteesta muodostunut molekyyli. Juosteet muodostuvat ketjuksi liittyneistä nukleotideista, jotka sisältävät emäsosan, joka on adeniini, tymiini, sytosiini tai guaniini, sokeriosan eli deoksiriboosin ja fosfaattiosan. (Strachan & Read 2011, 2-4.)

kliininen bakteriologia

Yksi kliinisen mikrobiologian osa-alue on kliininen bakteriologia. Kliininen bakteriologia tutkii bakteereja, jotka aiheuttavat ihmisille infektioitauteja. (Heikkilä 2005, 9.)

kliininen mikrobiologia

Mikrobiologia tutkii pieneliöitä, joita ei pysty havaitsemaan paljain silmin. Kliininen mikrobiologia on yleismikrobiologian osa-alue, joka on keskittynyt tutkimaan ihmisille infektioitauteja aiheuttavia pieneliöitä eli mikrobeja sekä elimistön puolustusmekanismeja, infektioautien syntyä, diagnostiikkaa, hoitoa ja ehkäisykeinoja. (Heikkilä 2005, 9.)

PCR eli polymeerasiketjureaktio

PCR:n avulla voi monistaa haluttua nukleiinihappojaksoa. PCR perustuu nukleiinihapon emästen selektiiviseen pariutumiseen monistettavalla alueella. PCR:ssä toistetaan syklistesti kolme vaihetta, joiden avulla saadaan nukleiinihapon määrä moninkertaistettua. Polymeerasiketjureaktioon tarvitaan kohdenukleiinihapon lisäksi polymeerasientsyymi, alukkeina toimivat oligonukleotidit sekä vapaita nukleotideja. (Brown 2010, 147-148.)

RNA eli ribonukleiinihappo

RNA on yleensä yksijuosteinen molekyyli, joka on DNA:n tapaan muodostunut ketjuksi liittyneistä nukleotideista, jotka sisältävät emäsosan, joka on adeniini, urasiili, sytosiini tai guaniini, sokeriosan eli riboosin ja fosfaattiosan. RNA:n merkittävimpinä tehtävinä solussa on olla ribosomin rakennusaineena (rRNA), toimia geneettisen informaation välittäjänä proteiinisynteesissä (mRNA eli lähetti-RNA) ja aminohappojen siirtäjänä aminohappojen kuljetuksessa proteiinisynteesissä (tRNA). (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010, 29.)

3 KLIININEN BAKTERIOLOGIA

Kliininen bakteriologia on yksi kliinisen mikrobiologian osa-alueista. Kliininen mikrobiologia on yleis-mikrobiologian alue, joka on keskittynyt tutkimaan ihmisille infektioita aiheuttavia pieneliöitä eli mikrobeja. Kliininen mikrobiologia tutkii taudinaiheuttajaeliöiden ohella elimistön puolustusmekanismeja sekä infektioitausten syntyä, diagnostiikkaa, hoitoa ja ehkäisykeinoja. Kliininen bakteriologia tutkii ihmisille infektioita aiheuttavia bakteereja. Kliinisen bakteriologian merkitys infektioiden torjunnassa on suuri. (Heikkilä 2005, 9.)

3.1 Bakteriologian historia

Mikrobiologian ja bakteriologian historian voidaan ajatella ulottuvan vuosisatojen taakse. Mikrobeja on osattu käyttää hyödyksi jo ennen kuin niitä oli varsinaisesti nähty. Viiniä osattiin valmistaa, vaikkei tiedetty, että alkoholikäyminen oli hiivan aikaansaamaa. Tiedettiin myös, että ruuan säilyvyyttä voitiin parantaa suolaamalla, kuivaamalla ja hapattamalla sitä sekä säilyttämällä sitä kylmässä. Näin siis hidastettiin ja estettiin mikrobien kasvua. (Salkinoja-Salonen 2002a, 8.)

Bakteriologian kehittyminen alkoi mikroskoopin keksimisestä. Ensimmäiset mikroskooppiset havainnot tehtiin 1600-luvulla. Havaintojen tekijöinä olivat Antonie van Leeuwenhoek, Robert Hooke ja Galileo Galilei. Van Leeuwenhoek oli luultavimmin ensimmäinen bakteereja nähnyt ihminen. Vuonna 1684 hän oli rakentanut jopa 300-kertaisesti suuremman mikroskoopin. Tällä hän oli tutkinut hampaidensa plakkia ja havainnut siinä erikokoisia ja muotoisia bakteereja, jotka hän oli sitten kuvannut kirjeessään. Van Leeuwenhoekin kuoltua mikrobiologian kehitys oli pitkään pysähdyksissä. (Salkinoja-Salonen 2002a, 8-9.)

Kun mikrobeja oli havaittu, kiisteltiin pitkään siitä, syntyvätkö mikrobit elävistä soluista vai voiko niitä muodostua itsestään. Lopulta 1800-luvulla ranskalainen kemisti Louis Pasteur osoitti kokeillaan luotettavasti sen, että ilmassa todella on pieneliöitä, mutta että niitä ei voi syntyä tyhjästä. Pasteur myös osoitti kaikkien pilaantumis- ja käymisprosessien olevan mikrobien aiheuttamia. (Salkinoja-Salonen 2002a, 10-13.)

Kliinisen mikrobiologian pohjana voidaan pitää ymmärrystä tautien tarttuvuudesta. On tiedetty, että sairas henkilö voi tartuttaa toisen henkilön suoran tai välillisen kosketuksen kautta. Vanhoissa kirjoituksissa, kuten Raamatussa, on tautien leviämisen ehkäisemiseen pyrkiviä määräyksiä. Ymmärrettiin, että potilaan eristäminen ehkäisee taudin leviämistä, vaikka mikrobien olemassaoloa ei vielä ymmärrettykään. 1864 englantilainen kirurgi Joseph Lister ymmärsi tulehduksia aiheuttavien bakteerien leviävän leikkauksissa instrumenttien välityksellä, minkä vuoksi hän alkoi käsitellä instrumenttinsa lysolilla ennen leikkauksia. Häntä pidetään desinfioidin keksijänä. (Salkinoja-Salonen 2002a, 14-15.)

Merkittävä vaikuttaja oli myös lääkäri Robert Koch, joka teki tutkimuksia pernarutosta. Hän osoitti, että tauti voi tarttua bakteeri-itiöiden välityksellä ja että kaikki bakteerit eivät ole tautia aiheuttavia.

Kochin postulaattien mukaan sairaasta yksilöstä tulee löytyä mikrobi, josta voidaan valmistaa laboratoriossa puhtasviljelmä. Viljellyillä mikrobeilla tulee olla edelleen taudinaiheuttamiskyky uudessa yksilössä, josta voidaan sitten uudelleen eristää tämä sama mikrobi. Kochin jälkeen kliinisen mikrobiologian tutkimus alkoi edetä räjähdysmäisesti. (Salkinoja-Salonen 2002a, 15-17.)

Uusi harppaus kliinisen bakteriologian tutkimuksessa tuli deoksiribonukleiinihapon löytämisen ja 1950-luvulla sen rakenteen selvittämisen myötä. 1970-luvun lopulla kehitettiin menetelmä DNA:n pilkkomiseksi ja sen emäsjärjestyksen selvittämiseksi. Vuonna 1995 julkaistiin ensimmäisenä *Hae-mophilus influenzae* -bakteerin koko sekvensoitu genomi, minkä jälkeen on sekvensoitu vuoden 2008 elokuuhun mennessä 687 bakteerin genomi ja miltei 1200 genomien sekvensointi oli työn alla. (Salkinoja-Salonen 2002a, 21-22; Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 18.)

3.2 Bakteeri

Bakteerit ovat yksisoluisia, jakaantumalla tai itiöiden avulla lisääntyviä eliöitä, jotka saadaan kasvaamaan laboratoriossa sopivassa kasvuympäristössä pesäkkeinä. Bakteerit ovat esitumallisia eli prokaryootteja. Niiden perintöaines ei siis ole pakkautuneena tumakalvon rajaamaan tumaan, vaan se on vapaana sytoplasmassa. (Heikkilä & Meurman 2005a; Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 14-16.)

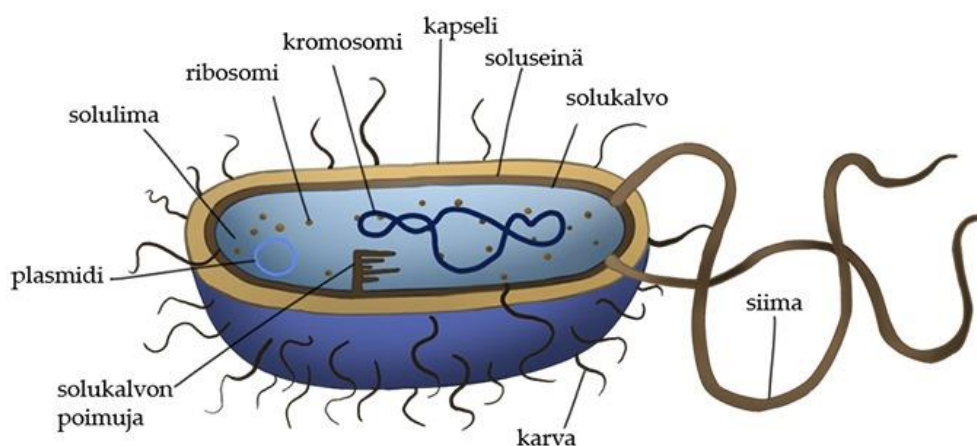
3.2.1 Bakterin rakenne ja toiminta

Bakterin perusrakenne on esitetty kuvassa 1. Kaikissa bakteereissa ei ole aina kaikkia kuvassa esiintyviä rakenteita. Aina ei esimerkiksi ole plasmideja, karvoja eli fimbrioita tai siimoja eli flagelloja. Bakterisolussa on aina DNA:ta, RNA:ta, proteiinia, hiilihydraatteja ja solukalvo. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 15.)

Bakterisolua rajaa solukalvo eli sytoplasmisen membraani, joka sulkee sisäänsä soluliman eli sytoplaskan. Membraani koostuu ohuesta kaksoislipidikerroksesta, jonka kautta solu voi olla valikoivassa vuorovaikutuksessa ympäristönsä kanssa. Solukalvo muodostuu pääasiassa fosfolipideistä ja proteiineista. Kalvorakenne on dynaaminen ja jotkin proteiinit voivat melko vapaasti liikkua kalvon tasossa, toiset proteiinit ovat paikoillaan kalvossa. Solun kemialliset reaktiot tapahtuvat sytoplasmassa tai plasmamembraanissa. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 18-21.)

Useimmilla bakteereilla on soluseinä, joka antaa solun rakenteelle jäykkyyttä. Soluseinä antaa bakteereille niiden tyypillisen muodon. Soluseinän rakenne on bakteereille usein ominainen, mikä luo perustan useimpien antibioottien toimivuudelle. Bakteereja jaotellaan perinteisesti niiden gramvärjäytyvyyden perusteella tumman sinivioleteiksi värjäytyviin grampositiivisiin ja vaaleanpunaisiksi värjäytyviin gramnegatiivisiin bakteereihin. Gramvärjäys perustuu bakteerien erilaiseen soluseinän rakenteeseen. Grampositiivisilla bakteereilla on ylimääräinen ulkomembraani soluseinässään ja gramnegatiivisilla soluseinä on paksumpi. Molemmilla soluseinä koostuu suurilta osin polymeerirakenteisesta peptidoglykaanista. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 21-22.)

Bakteerien rakenteessa on monia seikkoja, jotka vaikuttavat oleellisesti niiden taudinaiheuttamiskykyyn. Fimbrioidensa avulla bakteeri pystyy tarttumaan esimerkiksi limakalvoille. Monilla bakteereilla on soluseinän ulkopuolella kapseli, jonka tuottaman liman avulla bakteeri voi myös tarrautua paremmin kohteeseensa. Monet bakteerit voivat liikkua ympäristössään aktiivisesti flagellojen avulla hakeutuen kasvuolosuhteiltaan edulliseen paikkaan. Jotkin bakteerit, kuten *Clostridium difficile*, pystyvät kehittämään sisälleen itiön, joka pystyy selviytymään epäedullisissakin olosuhteissa. Itiöt voivat kestää bakteereja paremmin muun muassa kuivuutta, kuumuutta ja säteilyä. Itiö on metabolisesti inaktiivinen, mutta voi sopivissa oloissa herätä pitkienkin aikojen kuluttua. Itiön koko ja muoto sekä syntyipaikka bakteerin sisällä ovat kullekin bakteerilajille luonteenomaisia. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 14, 30-33; Salkinoja-Salonen & Lounatmaa 2002, 128-131.)



Kuva 1 Bakteerin perusrakenne (Salomaa & e-Oppi Oy 2013.)

3.2.2 Bakterigenetiikka

Bakterigenetiikan ymmärrys on tärkeää, jotta voidaan ymmärtää mihin perustuu bakteerien taudinaiheuttamiskyky ja muutokset taudinaiheuttamisessa. Bakteerien tietty kanta voi aiheuttaa taudin, kun taas toinen kanta ei kykene aiheuttamaan tautia. Jotkin bakteerikannat pystyvät kehittämään itselleen kyvyn sietää tiettyjä antibiootteja. Esimerkiksi *Staphylococcus aureus*-bakteerista on olemassa vaikeasti hoidettavia metisilliinille resistenttejä kantoja (MRSA).

Bakteerien genomi muodostuu yhdestä tai joillain ryhmillä kahdesta tai jopa useammasta yleisimmin rengasmaisesta DNA-molekyylistä. Kromosomin lisäksi bakteereissa voi olla pieniä perimäainesta sisältäviä plasmideja. Useiden bakteerien genomi on sekvensoitu kokonaan. Esimerkiksi *Escherichia coli*-bakteerin koko genomi koostuu $4,64 \times 10^6$ emäsparista ja genomista on tunnistettavissa noin 5000 erillistä geeniä. Bakteerit lisääntyvät jakautumalla, mitä ennen DNA kahdentuu (replikaatio). Bakteereilla DNA kahdennetaan kokonaisena kerralla. Transkriptio tarkoittaa DNA:n emäsjärjestyksen kopiointia RNA:ksi. Lähetti-RNA:n avulla geneettinen informaatio siirtyy eteenpäin proteiinisynteesiä varten. Bakteereilla transkriptiossa muodostuva lähetti-RNA-molekyyli on heti valmis toimimaan ilman eukariotissoluissa vaadittavaa esilähetti-RNA:n silmukointia. Lähetti-RNA:n translaatio

eli proteiinisynteesi alkaa ribosomeilla heti RNA-molekyylin valmistuessa. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010, 18-19; Salkinoja-Salonen 2002b, 299-301.)

Bakteerigenetiikassa on kaksi erilaista lähestymistapaa, klassinen ja molekylaarinen bakteerigenetiikka. Klassisessa bakteerigenetiikassa bakteeripopulaatiolle tehdään mutageneesikäsittely, jossa jokin ominaisuus saadaan muuttumaan tai puuttumaan. Erilaisilla kokeilla voidaan sitten selvittää montako geeniä kyseiseen ominaisuuteen vaikuttaa, ja mitkä ovat kunkin geenin tehtävät. Molekylaarissa genetiikassa lähtökohtana on geeni, johon aiheutetaan mutaatioita laboratoriossa. Mutatoitu geeni liitetään sitten elävään organismiin ja katsotaan, minkälaisia vaikutuksia mutaatiolla on. (Skurnik 2010, 41.)

Bakteerit ovat suhteellisen yksinkertaisten ominaisuuksiensa vuoksi hyvä genetiikan tutkimuskohde. Ne ovat kooltaan pieniä ja lisääntyvät nopeasti ja suvuttomasti muodostaen suuria populaatioita. Bakteerit muodostavat kiinteällä alustalla yhdestä yksilöstä lähtöisin olevia pesäkkeitä. Bakteerien lukumäärä on helppo määrittää. Mutantit on helppo erotella selektiolla. Selektiivisenä eli erottelavana tekijänä voidaan käyttää esimerkiksi bakteerin genomiin siirrettyä antibioottiresistenssigeeniä, jolloin antibiootikäsittelyllä saadaan eroteltua mutantit. Mutantti on siis bakteerikanta, jonka genomiin on aiheutettu mutaatio. Mutaatio genomissa ei välttämättä näy bakteerin ilmiasussa. Geenien siirto bakteerikantojen välillä on helppoa esimerkiksi virusvektoreiden välityksellä ja kantoja on helppo säilyttää pakastettuna tai kylmäkuivattuna. (Skurnik 2010, 41-42.)

Genetiikan perusyksikkönä on geeni eli DNA:ssa oleva alue joka koodaa tiettyä geenituotetta, usein proteiinia. Ilmentyäkseen geeni tarvitsee promoottorin eli DNA:ssa olevan jakson, johon RNA-polymeraasi kiinnittyy. Polymeraasi aloittaa transkription, jonka lopetukseen tarvitaan lopetussignaali eli terminaattori. Promoottorin lähellä on yleensä geenin toimintaa ja ilmentymistä sääteleviä sääteilyalueita. Bakteereilla kopioidaan tyypillisesti useita genejä yhdeksi lähetti-RNA:ksi. Tällaista usean geenin yksikköä, josta muodostetaan yksi pitkä lähetti-RNA, kutsutaan operoniksi. Yhden operonin alueella olevat eri geenien lopussa olevat lopetuskodonit huomioidaan vasta ribosomilla proteiinia koodattaessa. Kullakin operonilla on yksi promoottori- ja yksi terminaattori- eli lopetusalue sekä yksi koko operonin toimintaa säätelevä alue eli operaattori. (Skurnik 2010, 41-42; Salkinoja-Salonen 2002b, 301-303.)

Bakteerien geeneihin voidaan aiheuttaa keinotekoisesti mutaatioita mutageeneilla, joita voivat olla esimerkiksi kemialliset yhdisteet, ionisoiva säteily tai transposonit eli hyppivät geenit. Mutaatiossa voi hävitä, tulla lisää tai vaihtua yksi tai useampi emäs DNA:sta, minkä seurauksena proteiiniin saatetaan synteesissä valita väärä aminohappo ja tuloksena voi olla liian lyhyt tai muuten muuttunut lopputuote. DNA:ssa tapahtuvan mutaation vaikutukset riippuvat siitä onko se koodaavalla vai ei-koodaavalla alueella. Jos mutaatio on ei-koodaavalla alueella, mutaatiolla ei välttämättä ole mitään vaikutuksia, tai se voi vaikuttaa geenien säätelyyn ja siten niiden ilmenemiseen. Koodaavalla alueella mutaatio saa usein aikaan virheellisen, toimimattoman geenituotteen. Mutaatio voi siten vaikuttaa solun toimintaan. Joskus pistemutaatio voi kuitenkin olla hiljainen eli vaikka emäs muuttuu, niin välittava aminohappo on silti sama. (Skurnik 2010, 43-46.)

Keinotekoisten tai itsesyntyisten mutaatioiden lisäksi bakteerien genomi voi muuttua siten että geenejä siirtyy perimään esimerkiksi viruksista tai toisista bakteereista. Geenejä voidaan siirtää solusta toiseen plasmidin avulla. Plasmidi voidaan siirtää keinotekoisesti tai se voi siirtyä bakteerista toiseen konjugaatiossa. Konjugaatio on perinnöllisen materiaalin siirtymistä luovuttajasolusta vastaanottajasoluun solu-solukontaktissa. Konjugaatiossa voi siirtyä kokonaisia plasmideja tai pienempiä jaksoja DNA:ta. Useat antibioottiresistenttiseen siirtyvät solulta toiselle plasmidien välityksellä. Transformaatioissa perimäaineksen siirtymiseen ei tarvita solukontaktia, vaan perimää siirretään luovuttajalta vastaanottajalle paljaan DNA:n avulla. Luonnossa esiintyy joitakin luonnollisesti transformoituvia eli kompetentteja bakteerilajeja. Muille bakteereille kompetenssi voidaan saada aikaan lyhyeksi ajaksi voimakkaan sähköpulssein avulla. Transformaatioissa siirtyvät DNA:jaksot ovat lyhyitä. Transduktiossa perimää siirtyy bakteriofagien välityksellä. Jotta siirtynyt DNA jäisi pysyvästi osaksi isäntäsolun DNA:ta, transduktiossa siirtyneen DNA:n tulee liittyä osaksi bakteerisolun DNA:ta, mikä tapahtuu usein kahden homologisen rekombinaation välityksellä, jolloin osa vastaanottajan DNA:sta korvautuu luovuttajan DNA:lla. (Skurnik 2010, 47-50.)

3.2.3 Bakteerien luokittelu ja tyyppitys

Bakteerien taksonomia eli luokittelu ja luokitukseen käytettävät periaatteet ja menetelmät ovat muuttuneet paljon ajan kuluessa. 1900-luvun alussa bakteerien luokittelu ja tunnistus perustui ainoastaan solujen morfologisiin ominaisuuksiin. Bakteereja luokiteltiin niiden gramvärjäytyvyyden, pintarakenteiden, liikkuvuuden, itiöiden ja varastohiukkasten olemassaolon perusteella. Tarkoituksena ei ollut luokitella bakteereja taksonomisesti niiden sukulaisuuden eli fylogenen perusteella vaan kehittää järjestelmä, minkä perusteella bakteerit pystyttiin tunnistamaan. Pelkästään morfologisiin ominaisuuksiin perustuva tunnistaminen ei ollut riittävää, vaan lisäksi tarvittiin biokemiallisiin ja fyysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten bakteerin vaatimat kasvuolosuhteet, perustuvaa luokitusta. 1970-luvulla luokituksen perusteiksi oletettiin myös kemotaksonomiset menetelmät, kuten erot soluseinän fosfolipideissä ja rasvahapoissa sekä DNA:n GC- %:n määrittäminen. (Lindholm & Eerola 2010, 56-57; Salkinoja-Salonen 2002c, 358.)

Nykyisin käytössä oleva taksonominen luokitus on mahdollistunut molekyylibiologisten menetelmien kehityksen myötä. Nykyisen luokituksen kehittyminen mahdollistui 1970-luvulla, kun sekvensointitekniikat kehittyivät. 1970-luvulla Carl Woese tutkimukset osoittivat, että ribosomin pienen alayksikön RNA (*16S-rRNA*) on käyttökelpoinen bakteerien fylogeneettisenä merkkimolekyylinä ja sen perusteella bakteerit voidaan luokitella luonnollisten sukulaisuussuhteiden perusteella. Bakteerien *16S-rDNA:n* emäsjärjestykseen perustuva fylogeneettinen luokitus otettiin käyttöön ja julkaistiin vuonna 2001 *Bergey's Manual on Systematic Bacteriology* -teoksessa. Bakteerien katsotaan todennäköisesti kuuluvan samaan lajiin, kun niiden *16S-rDNA*-sekvenssien samankaltaisuus on yli 97 %. Vuoden 2008 alussa jo noin 170000 bakteerikannan *16S-rDNA*-sekvenssit oli tallennettu tietopankkeihin. (Lindholm & Eerola 2010, 56-59; Salkinoja-Salonen 2002c, 359.)

Luokituksen apuna voidaan käyttää myös DNA-DNA-hybridisaatiota. Hybridisaatio kertoo bakteerien DNA:n samankaltaisuudesta ja siten myös epäsuorasti bakteerien fylogeniasta eli sukulaisuudesta. Hybridisaatioissa eri bakteereista eristetyt DNA:t ensin denaturoidaan kuumentamalla ja sitten liitetään toisiinsa laskemalla lämpötilaa. Muodostuneiden hybridijuosteiden sulamispiste kertoo DNA-jaksojen samankaltaisuuden. Jos samankaltaisuus on yli 70 %, katsotaan kyseessä olevan sama laji. (Lindholm & Eerola 2010, 57.)

Kaikki eliöt kuuluvat taksonomisesti kolmeen eri evolutionääriseen päähaaraan, joita ovat bakteerit, arkit ja eukaryootit. Taksonomisessa luokittelussa bakteerien domeeni koostuu 24 pääjaksosta eli phylumista. Pääjaksot on jaettu edelleen luokkiin, lahkoihin, heimoihin, sukuihin, lajeihin ja alalajeihin, joka on alin virallinen taksonominen taso. Alalajit voidaan kuitenkin jakaa edelleen esimerkiksi käytännön bakteeritunnistuksessa merkityksellisiksi bio-, sero-, ja patotyypeiksi. (Lindholm & Eerola 2010, 59.)

Bakteerien luokittelu teoriassa ja käytännössä ovat eri asioita ja perustuvat usein erilaisiin menetelmiin. Teorettisessa luokittelussa voidaan käyttää hyvin monimutkaisia testejä ja suurta muuttujajoukkoa. Rutiinitunnistuksessa kuitenkin pyritään tunnistusmenetelmien yksinkertaisuuteen, nopeuteen ja hyvään toistettavuuteen. Vaikka taksonomia perustuu bakteerin DNA-rakenteeseen, rutiinidiagnostiikassa tunnistamiseen käytetään pääasiallisesti fenotyypisiä ominaisuuksia. Kliinisesti tärkeät patogeeniset bakteerit ovat melko pieni joukko olemassa olevista bakteerilajeista. Näille patogeenisille bakteereille on kehitetty rutiinikäyttöön soveltuvia tunnistustestejä. Joskus tarvitaan kuitenkin harvinaisempien bakteerien tunnistukseen soveltuvia menetelmiä. Bakteerien yleisluontoiseen tunnistukseen on olemassa universaalimenetelmiä, joilla voidaan tunnistaa bakteeri ilman, että sitä on ensin luokiteltu mihinkään tiettyyn ryhmään kuuluvaksi. Universaalimenetelminä käytetään bakteerien rasvahapporakenteiden kaasukromatografia-analyysia ja 16S-rDNA-geenin sekvensointia. Menetelmillä saatavaa bakteerikannalle ominaista rasvahappoprofiilia tai DNA-sekvenssiä verrataan tietokannoista löytyviin tietoihin, minkä perusteella saadaan selville, mitä bakteeria kyseinen näyte muistuttaa. (Lindholm & Eerola 2010, 63-64.)

Epidemiatilanteissa pyritään selvittämään epidemioita aiheuttavien bakteerien alkuperää. Tutkimuksilla pyritään saamaan selville, että ovatko esimerkiksi eri osastoilla tai sairaaloissa olevat epidemiat saman bakteerikloonin aiheuttamia ja onko tartunnan aiheuttanut klooni jotain jo aiemmin tunnettua bakteerikloonina. Selvittelyyn käytettävät menetelmät pystyvät erottelamaan saman bakteerilajin eri kloonit bakteerien geneettisen samankaltaisuuden tai erilaisuuden avulla. Menetelmillä mitattava ominaisuus ei saa muuttua epidemian aikana. Tulosten pitäisi myös olla paikasta riippumatta vertailukelpoisia. (Lindholm & Eerola 2010, 64-66.)

Nykyisin tyyppityksiin käytetään miltei ainoastaan bakteerigenomiin perustuvia testejä. Testeillä pyritään eristämään koko bakteerin genomisen DNA tai jokin geenin osa monistetaan PCR-menetelmällä. RFLP-analyysissä PCR:llä tuotettu DNA pilkotaan osiin restriktioentsyymeillä ja ajetaan geielektrofooresilla viivajakaumaksi, jota voidaan verrata toisten näytteiden viivajakaumaan. Viivajakauman viivojen tunnistuksessa voidaan käyttää apuna tiettyjen geenien koettimia. Jos viivakuviot

ovat identtisiä, bakteerien genomit tutkittujen geenien kohdalta ovat samanlaiset. Tällöin voidaan todeta bakteerien olevan samaa klonaalista alkuperää. Tällaisilla menetelmillä on Suomessa tutkittu erityisesti MRSA:n, VRE:n, EHEC:n, *Mycobacterium tuberculosis* ja hypervirulentin *Clostridium difficile*n epidemioita. (Lindholm & Eerola 2010, 66-67.)

3.3 Bakteriologian tutkimusmenetelmät

Kliinisessä bakteriologiassa käytössä olevat tutkimusmenetelmät ovat yhä pääasiassa käsityöhön perustuvia menetelmiä kuten bakteeriviljelyjä. Vain vähän bakteriologisia tutkimusmenetelmiä on pystytty automatisoimaan. Pääasiallisina käytössä olevina menetelminä ovat edelleen mikroskopointi sekä viljely ja siihen läheisesti kuuluvat lääkeaineherkkyysmääritykset. Lääkeaineherkkyysmäärityksiin ja bakteerien tunnistukseen on kehitetty joitakin automaattianalysaattoreita. Näitä perinteisiä menetelmiä täydentämään on kehitetty erilaisia antigeeninosoitus- ja geenimonistusmenetelmiä. (Katila 2004a, 341-342.) Bakteerin elimistössä aikaan saamaa immuunivastetta voidaan tutkia vastaainemäärityksillä tai soluvälitteisen immunitetin avulla. Bakterispesifisiä vasta-aineita voidaan osoittaa esimerkiksi verestä tai selkäydinnesteestä. (Carlson & Koskela 2011.)

Vaikka rutiinidiagnostiikka perustuukin yhä enimmäkseen perinteisiin menetelmiin, uudet nukleiinihappojen tunnistukseen pohjautuvat geenimonistusmenetelmät ovat syrjäyttäneet tai ovat syrjäyttämässä joissain tapauksissa perinteisiä menetelmiä. Niitä käytetään erityisesti vaikeasti osoitettavien tai hidaskasvuisten bakteerien kuten hinkuuskän, tuberkuloosin, borreliosin ja klamydian aiheuttajien diagnostiikassa. Kaupallisia geenitunnistustestejä eli geenikoettimia voidaan käyttää laboratoriossa viljeltyjen bakteerikantojen tunnistamiseen silloin, kun on erityisen tärkeää saada nopeasti määritettyä viljelmältä bakteerin laji. Nämä eivät ole PCR-menetelmiä, vaan perustuvat tiettyihin geeneihin sitoutuviin nukleotidijaksoihin. Näillä testeillä ei monisteta nukleiinihappomolekyyliä, vaan sitoutetaan geenikoetin näytteessä olevaan nukleiinihappoon. Tällaisilla testeillä voidaan tunnistaa esimerkiksi *N. gonorrhoeae* ja *M. tuberculosis*. (Katila 2004b, 346; Katila 2004c, 359-360.)

Kullekin infektiotaudille on määritelty ensisijaiset laboratoriotutkimusmenetelmät taudinaiheuttajan osoittamiseksi ja taudin diagnoosin varmistamiseksi. Näiden ensisijaisten tutkimusmenetelmien joukosta löytyy myös useita PCR-menetelmään perustuvia tutkimusmenetelmiä. Tällaisia tutkimuksia on muun muassa *Mycoplasma pneumoniae* -, *Bordetella pertussis* -, *Mycobacterium tuberculosis* -, *Borrelia burgdorferi* -, *Toxoplasma* - ja tularemia -monistustestit sekä difteriatoksiinigeenin monistustesti. (Katila 2004b, 342-343.)

3.3.1 Mikroskopointi ja värjäys

Varhaisimpia bakteerien tutkimusmenetelmiä on mikroskopointi. Erilaisia mikroskooppeja on perinteinen valomikroskooppi, joita on käytössä kirkkaan kentän-, faasikontrasti- ja fluoresenssimikroskooppeja, sekä erotuskyvyltään huomattavasti valomikroskooppia parempi elektronimikroskooppi. Lämpäiselektronimikroskoopilla pystytään tarkastelemaan solujen sisärakenteita ja pyyhkäiselektronimikroskoopilla pystytään tarkastelemaan kolmiulotteisesti solujen pintarakenteita. Pyyhkäiselekt-

ronimikroskoopin suurennuskyky on 15–100 000 -kertainen. Perinteistä valomikroskopointia varten valmistetaan objektilasille levityspreparaatti. Bakteriliuosta siirrostetaan puhtaalle objektilasille, joka kuivataan ja kiinnitetään. (Puhakka & Salkinoja-Salonen 2002a 74-77.)

Erotuskyvyn ja bakteerien tunnistamisen parantamiseksi voidaan preparaatti värjätä. Tärkeimpänä bakteerien ryhmittelyn perusteena käytetään gramvärjäystä, jonka perusteella bakteerit jaotellaan sinivioleteiksi värjäytyviin grampositiivisiin ja vaaleanpunaisiksi värjäytyviin gramnegatiivisiin bakteereihin. Ero värjäytymisessä perustuu bakteerin soluseinän erilaiseen rakenteeseen. Gramvärjäyksessä bakteeripreparaatti värjätään ensin kristallivioletilla, Lugolin jodiliuoksella, kiinnitetään alkoholilla ja sitten jälkivärjätään punaisella safraniinilla. (Puhakka & Salkinoja-Salonen 2002b, 99-100.)

Värjäystä näytteestä katsoen bakteerit jaotellaan muodon perusteella pyöreisiin kokkeihin ja pitkänomaisiin sauvoihin. Bakteerien ryhmittymistä voidaan myös tarkastella. Voidaan katsoa esiintyvätkö bakteerit tyypillisesti yksitellen, pareina, ryhmissä vai ketjuina. Jaottelemalla bakteerit mikroskopoinnilla tehdyn tutkimuksen perusteella grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin kokkeihin ja sauvoihin, voidaan usein jo näiden tietojen ja kliinisten oireiden perusteella valita oikea lääke bakteerin aiheuttaman infektioon. Gramvärjäys on käyttökelpoisin menetelmä, kun tutkitaan normaalisti steriilejä näytteitä, kuten likvoria tai nivelnestettä. Tällöin mikä tahansa löytyvä bakteeri on merkittävä löydös. (Heikkilä & Meurman 2005b, 94.)

Gramvärjäyksen lisäksi voidaan käyttää myös muita värjäyksiä. Joillekin näytteille voidaan käyttää fluoresenssivärjäystä. Tuberkuloosidiagnostiikassa voidaan käyttää auramiini- ja akridiinioranssivärjäystä. Värjäykseen liittyvä happokäsittely tuhoaa muut kuin mykobakteerit, joten yskösnäytteessä olevat ihmisen normaaliflooran bakteerit eivät häiritse tuberkuloosivärjäyksen tulkintaa. (Heikkilä & Meurman 2005b, 94.)

3.3.2 Viljely ja herkkyysmääritykset

Bakteereja voidaan viljellä laboratoriossa sekä kiinteillä elatusalustoilla että nestemäisessä elatusliuoksessa. Nestemäisiä elatusaineita voidaan käyttää etenkin jos halutaan rikastaa jotain tiettyä tai ominaisuuksiltaan tietynlaisia bakteereja näytteestä, jossa on paljon useiden eri lajien bakteereja. Tällöin valitaan ominaisuuksiltaan sopiva elatusaine ja kasvuolosuhteet. Bakteereja voidaan rikastaa esimerkiksi liuoksessa, joka sisältää tietylle bakteerille sopivaa ja muille bakteereille myrkyllistä ainetta. Nestemäisiä elatusaineita on myös veriviljelypulloissa, joissa kasvatetaan mahdollisesti verestä löytyviä bakteereja. Enimmäkseen bakteereja viljellään maljoilla, joilla on jotain hyydytettyä elatusainetta, useimmiten agaria. (Heikkilä & Meurman 2005b, 95; Salkinoja-Salonen 2002d, 58-59.)

Suoraan näytteestä viljellyillä maljoilla kasvaa usein monenlaisia bakteerilajeja ja -kantoja. Jotta ne voidaan erottaa toisistaan, tulee viljelymaljalta poimia yksi haluttu pesäke, josta voidaan sitten valmistaa puhdasviljelmä. Puhdasviljelmässä pyritään saamaan bakteerit kasvamaan puhtaana siten, ettei maljalla kasva usean eri bakteerilajin pesäkkeitä. Hajotusviljelmän avulla bakteeripesäkkeet saadaan kasvamaan erillisinä pesäkkeinä. Hajotusviljelmässä bakteeria levitetään maljalle ensin vain

pienelle alueelle, josta se hajotetaan viljelysauvalla vaiheittain koko maljan alueelle. Maljaa kasvatetaan sopivissa olosuhteissa, jolloin yleensä jo vajaassa vuorokaudessa saadaan maljalle toisistaan erottuvia pesäkkeitä. (Carlson & Koskela 2011.)

Viljelyyn käytetään rutiinidiagnostiikassa useita erilaisia maljoja, joilla kasvavat ominaisuuksiltaan tietyntyyliset bakteerit. Bakteerien vaatimat kasvuvaatimukset vaihtelevat. Jotkin bakteerit ovat hyvin vaatimattomia vaatimiensa ravinteiden suhteen, kun taas toiset, esimerkiksi streptokokit, vaativat runsaasti erilaisia kasvutekijöitä. Ravintoaineina käytetään yleensä erilaisia hiiva- ja lihaliemiutteita sekä peptoneita. Joillekin maljoille lisätään defibrinoitua verta jolloin voidaan maljalla nähdä bakteerien verisoluille aiheuttama tietyille bakteereille, kuten streptokokeille, tyypillinen hemolyysi pesäkkeen ympärillä. Suklaamalja puolestaan sisältää kuumentamalla hajotettua verta. Veri- ja suklaamaljat ovat yleismaljoja, joilla useimmat patogeenit bakteerit kasvavat. Erikoistarkoituksiin käytetään erottelevia ja selektiivisiä maljoja. Tällaisten maljojen käyttö helpottaa bakteerien alustavaa tunnistamista. Esimerkiksi virtsaviljelyihin käytetään laktoosia sisältävää Cled-maljaa, jolla voidaan hyvin tunnistaa yleisesti virtsatieinfektioita aiheuttava *E. coli* maljalle muodostuvan tyypillisen laktoosin käytöstä johtuvan keltaisen värin perusteella. Selektiivisillä maljoilla kasvavat jonkin maljoille lisätyn aineen takia vain niille tyypilliset bakteerit. Elatusaineeseen voidaan tällöin lisätä esimerkiksi tiettyjä antibiootteja. (Carlson & Koskela 2011.)

Useimmille patogeeneille bakteereille sopivin lämpötila on +35 °C. Jotkin bakteerit sietävät korkeampiakin lämpötiloja, mitä voidaan käyttää selektiivisenä testinä esimerkiksi ulosteen kamylobakteereille. Joillekin bakteereille, kuten gonokokille ja meningokokille, on edullista kasvatusolosuhteiden hiilidioksidipitoisuuden kasvattaminen. Bakteereja voidaan myös kasvattaa esimerkiksi hapettomissa eli anaerobeissa oloissa, joilloin happea sietämättömät bakteerit saadaan tunnistettua. Useimmat bakteerit kasvavat silmin havaittaviksi pesäkkeiksi jo alle vuorokaudessa. Anaerobibakteerit vaativat usein aerobibakteereja pidempiä kasvuaikoja. Mykobakteerien kasvatus voi viedä viikkojakin. (Carlson & Koskela 2011.)

Maljoilla kasvavat bakteerit pyritään luokittelemaan ryhmiin niiden muodostamien pesäkkeiden koon, muodon, värityksen, hajun ja hemolyysin avulla. Näiden päätelmien avulla tehdään päätöksiä siitä millaisia jatkotutkimuksia bakteereille tehdään. Maljoilta voidaan poimia bakteereja esimerkiksi värjäyksiä, puhdasviljelyjä, erilaisia tunnistustestejä ja herkkyysmäärytyksiä varten. (Carlson & Koskela 2011.)

Herkkyysmäärytyksillä pyritään löytämään sopiva mikrobilääke bakteerin aiheuttaman infektion hoitamiseksi. Herkkyysmäärytystä varten bakteerista tehty suspensio levitetään tasaisesti useimmiten Müller-Hilton -maljalle. Maljalle asetetaan sitten tietty sarja eri lääkkeitä sisältäviä kiekkoja. Malja laitetaan kasvamaan, jolloin bakteerien kasvaessa lääkekiekoista diffundoituu lääkeainetta ympäröivään elatusaineeseen. Lääkeainekiekon ympärille muodostuu estorengas, jonka laajuus riippuu bakteerin herkyydestä kyseiselle lääkeaineelle. Mitä herkempi bakteeri on sitä suurempi on syntyvä estorengas. Herkkyysluokiksi on määritetty S, I ja R. S tarkoittaa, että bakteeri on herkkä kyseiselle

lääkkeelle normaaliannoksilla. I on vähentyneesti herkkä lääkkeelle tai herkkyydestä ei ole täyttä varmuutta. R on resistentti lääkkeelle. (Carlson & Koskela 2011.)

Viimeisimpinä vuosina on tuotu markkinoille laitteita, joilla bakteerien lääkeherkkyysmääritys voidaan tehdä automaattisesti. Tällaisia laitteita ovat bioMérieuxin Vitek2, Siemensin MicroScan ja BD:n Phoenix. Herkkyysmääritysten lisäksi laitteilla voidaan tunnistaa joitain bakteereja ja myös hiivoja. Laite tarvitsee määrittäjä varten bakteeripesäkkeestä valmistetun suspension. Suspensio laimennetaan ja siirretään herkkyysmäärityskortille tai kuoppalevylle laitteella tai käsin. Laite ilmoittaa bakteerilajin ja sen lääkeherkkyden 4-16 tunnin kuluttua testin aloituksesta. Laitteiden luotettavuus lajin tunnistuksen ja herkkyden suhteen on erittäin hyvä yleisimpien ja hyvin kasvavien bakteerien kohdalla. Tunnistus- ja herkkyysautomaatit ovat hyvä apu kliinisessä mikrobiologiassa, kuitenkin vain kun ne ovat asiantuntijan käytössä, eli bakteerin alkutunnistus on osunut oikeaan ja tunnistus- ja herkkyysmäärityspaneelit on valittu oikein. (Nissinen 2008.)

3.3.3 Geeniteknologiset sekä muut uudet menetelmät

Geeniteknologiset menetelmät mikrobiologiassa ovat koko ajan enemmän käyttöön otettu alue. Menetelmät kehittyvät, nopeutuvat, täsmentyvät ja halpenevat kaiken aikaa siten, että niitä voidaan ottaa yhä useammissa kliinisen mikrobiologian laboratorioissa rutiinidiagnostiseen käyttöön. Uusia, kehittyviä menetelmiä ovat erityisesti erilaiset sekvensointimenetelmät. Nykyisin bakteerin tunnistus herkkyysmäärityksineen ja tyyppitys voi viedä aikaa nopeampikasvuisilla lajeillakin viikkoja ja hidaskasvuisilla kuten mykobakteereilla jopa kuukausia ja sisältää hyvin monia vaiheita. Uusilla sekvensointimenetelmillä voitaisiin sekvensoida koko bakteerin genomi. Vertaamalla sekvenssiä tietokantojen tietoihin saataisiin selville esimerkiksi tiedot bakteerin lajista ja kannasta sekä resistenssi ja virulenssiominaisuuksista. Tällöin koko tutkimusprosessiin kuluisi paljon vähemmän aikaa, kun viljely kestää nopeilla lajeilla 1-2 päivää, hitailla lajeilla 1-3 viikkoa ja sekvensointi kestäisi kaikilla lajeilla 1-12 tuntia. Tällainen koko genomien sekvensointiin perustuva kokonaisvaltainen tunnistus ja tyyppitys ei ole kuitenkaan vielä laajemmalti käytössä oleva menetelmä vaan sen käyttöönotto rutiinidiagnostiikkaan vaatii sekvensointilaitteilta kehittymistä ja halpenemista. Lisäksi tietokantoihin tarvitaan vielä paljon lisää tietoa ja analyysiohjelmilta kehittymistä ennen kuin menetelmää voitaisiin käyttää rutiinidiagnostiikassa. (Didelot, Bowden, Wilson, Peto & Crook 2012.)

Bakteriologisesta näytteestä voidaan nykyisellä rutiinikäytössä olevalla tekniikalla etsiä tietyille bakteereille spesifisiä RNA- tai DNA-jaksoja niille spesifisten koettimien avulla. Testiä varten näyte pitää esikäsitellä niin että sen sisältämä nukleiinihappo on yksijuosteisena vapaana ketjuna. Menetelmää herkitetään monistamalla haluttua kohtaa polymeerasiketjureaktiolla tai jollain muulla monistusmenetelmällä. Nukleiinihappojen tunnistukseen perustuvat testit ovat hyvin herkkiä ja voivat periaatteessa tunnistaa jopa näytteessä olevan yhden ainoan bakteerin. Näytteen käsittely voi kuitenkin heikentää herkkyyttä. Ongelmana voi olla myös näytteessä olevat monistusreaktion käynnistymisen estävät inhibiittorit, jolloin saadaan väärä negatiivinen tulos. Suoraa nukleiinihapon osoitusta käytetään lähinnä viljellyistä mykobakteerinäytteistä tehtävässä lajintunnistuksessa. Monistustekniikkaan perustuvia automatisoituja menetelmiä voidaan käyttää esimerkiksi *Chlamydia trachomatiksen* osoi-

tukseen alkuvirtsanäytteestä, *Bordetella pertussiksen* osoitukseen nielunäytteestä ja *Mycobacterium tuberculosisin* osoitukseen yskösnäytteestä. (Carlson & Koskela 2011.)

Monistustesteillä pystytään monistamaan tiettyjä bakteerien geenejä. Infektioiden torjunnan kannalta on tärkeää tunnistaa bakteerien antibioottiresistenssigeenit. *Staphylococcus aureuksen mecA*-antibioottiresistenssigeenin löytyminen kertoo kannan olevan metisilliiniresistentti eli MRSA, johon ei tehoa mikään beetalaktaamiantibiotti. Mykobakteerien hitaan kasvun vuoksi niiden herkkyysmäärittämisä voidaan nopeuttaa testaamalla PCR-tekniikalla löytyykö näytteestä *Mycobacterium tuberculosisin* rifampisilliiniresistenssigeeni. (Carlson & Koskela 2011.) Toksiinintuotto on tärkeä ominaisuus bakteerille sen taudinaiheuttamiskyvyn kannalta. Toksiinintuotogeenejä voidaan testata muun muassa kurkkumätäbakteerilta, enterohemorragiselta *Escherichia coli*ta (EHEC) ja antibioottiripulin aiheuttajalta *Clostridium difficile*ltä. Monistustesteillä voidaan myös analysoida mikrobilajin sisäistä kannanvaihtelua, mistä on apua epidemioiden selvittelyssä. (Katila 2004c; Ohjekirja 2012)

Etenkin syvien bakteeri-infektioiden diagnostiikassa voidaan käyttää yleisbakteerinukleiinihappomääritystä, joka perustuu bakteerille spesifisen 16S-rRNA:ta koodaavan geenin tunnistukseen ja osoittamiseen näytteestä. Kun verrataan löydettyä sekvenssiä tietokannoissa oleviin, voidaan tunnistaa bakteerin suku tai jopa laji. Tätä menetelmää on käsitelty tarkemmin jo aiemmin tekstissä kappaleessa 3.2.3 Bakteerin luokittelu ja tyypitys. (Carlson & Koskela 2011.)

Mikrobiologiassa on pyrkimyksenä saada taudinaiheuttaja selville mahdollisimman nopeasti. Uusi menetelmä taudinaiheuttajan nopeaksi selvittämiseksi on MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of light) eli matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio lentoaikamassaspektrometria. Tällä menetelmällä näytteestä voidaan tunnistaa eri sukujen ja lajien bakteerit sekä saman lajin eri kannat muutamissa minuuteissa. Menetelmä on nopea ja melko osuva, joskin massaspektrometriatulosten tulkinnessa käytettävät tietokannat saisivat olla laajemmat. Menetelmän kustannukset etenkin käyttöönotossa ovat huomattavat. Tarvittavan laitteiston hankintahinta on satoja tuhansia euroja vaihdellen mallista riippuen ja vuosittaiset ylläpitokustannukset ovat noin 10 % hankintahinnasta. (Saijonkari 2011.)

4 POLYERAASIKETJUREAKTIO ELI PCR

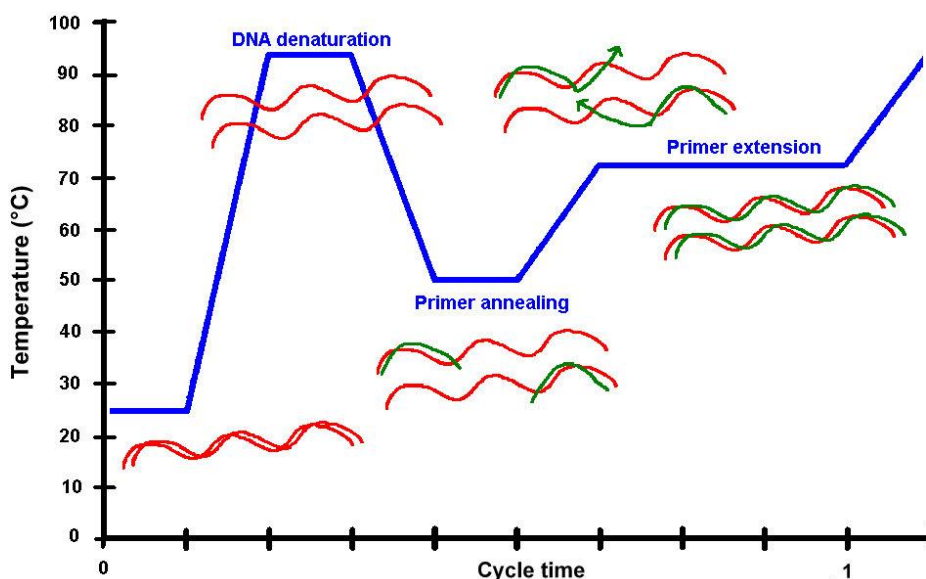
Polymeraasiketjureaktio eli PCR on geeniteknikan menetelmä. Sen avulla voidaan monistaa haluttua nukleinihappojaksoa, joka sijaitsee kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun nukleinihappojakson välissä. PCR perustuu nukleinihapon emästen selektiiviseen pariutumiseen monistettavalla alueella. Halutun nukleinihappojakson monistuminen perustuu oikein valittuihin polymeraasiketjureaktion alukkeina toimiviin oligonukleotideihin. Polymeraasiketjureaktioon tarvitaan mallina eli templaattina toimivan nukleinihapon lisäksi polymeraasientsyymi, alukkeina toimivat oligonukleotidit, vapaita nukleotideja sekä ionikoostumukseltaan sopivaa reaktiopuskuriliuosta. PCR:ssä käytetään korkeissakin lämpötiloissa aktiivisena ja denaturoitumattomana säilyvää termostabiilia DNA-polymeraasia. Tällaisia polymeraaseja on löydetty kuumissa lähteissä eläviltä bakteereilta. Tällainen polymeraasi on *Thermus aquaticus*-bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasi. Tätä käytetään paljon, vaikka se tekeekin melko paljon virheitä. Useissa PCR-sovelluksissa käytetään vähemmän virheitä tekeviä polymeraaseja kuten *Pfu*-, *Vent*-, *Tth*- ja DynaZyme-polymeraaseja. Myös *Taq*-polymeraasista on geeniteknikalla kehitetty vähemmän virheitä tekeviä versioita. Monet standardimenetelmistä ovat yhä *Taq*-polymeraasille optimoituja. (Brown 2010, 147-149; Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010, 153.)

Ennen kuin polymeraasiketjureaktio voidaan käynnistää, tulee nukleinihappo eristää ja puhdistaa reaktiota häiritsevistä epäpuhtauksista. DNA:ta on perinteisesti puhdistettu fenoli- tai fenoli-kloroformiuuton avulla. Nykyisin puhdistukseen käytetään lähinnä erilaisia silikamenetelmiä. Usein käytetään valmiita kaupallisia puhdistuskittejä. Silikamenetelmät perustuvat DNA:n sitoutumiseen silikaan korkeassa ionivahvuudessa. Mukana liuoksessa täytyy olla lisäksi kaotrooppia, joka rikkoo molekyyliä ympäröidän vesikerroksen ja mahdollistaa suolasillan syntymisen silikan ja DNA:n välille. Usein käytetty kaotrooppi on guanidiinihydrokloridi. Silika on usein sidottu valmiiksi pieneen pylväseen eli spinkolonnin ja puhdistus voidaan suorittaa mikrosentrifuugilla. Spinkolonnimenetelmässä DNA tartutetaan kolonnin pohjalla olevaan silikaan, epäpuhtaudet pestään pois etanolilla, minkä jälkeen DNA irroitetaan silikasta ja sentrifugoidaan pienen puskurimäärän kanssa puhtaaseen putkeen. DNA:n puhdistukseen voi käyttää myös magneettipartikkeleja hyödyntävää menetelmää. Puhdistus voidaan myös automatisoida suurille näytemäärille kuoppalevyillä tehtäväksi käyttäen silika- tai magneettipartikkelimenetelmää. (Suominen ym. 2010, 106-108.)

Eristetyn DNA:n pitoisuutta ja puhtautta voidaan arvioida mittaamalla DNA-liuoksen absorbanssia spektrofotometrillä. Mittaus suoritetaan 260 nm:ssa ja se perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon 260 nm:ssa. Puhtaalla DNA-liuoksella absorbanssi-arvo 1,0 mitattuna aallonpituudella 260 nm vastaa DNA-pitoisuutta 50 µg/ml. (Suominen ym. 2010, 110.)

Polymeraasiketjureaktio käynnistetään lämmittämällä reaktioseos noin 94 °C:een. Tämä saa nukleinihappomolekyylit denaturoitumaan, jolloin templaattina toimivan kaksoisjuosteen juosteet erkanevat toisistaan ("denaturation"). Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan 50-60 °C:een, mikä saa alukkeet kiinnittymään nyt yksijuosteisiin templaattinukleinihappomolekyyliihin ("annealing"). Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan jälleen 72-74 °C:een, mikä mahdollistaa DNA-

polymeraasin toiminnan ja nukleiinihappojuosteiden synteesin templaatin mallin mukaisesti ("synthesis" tai "extension"). Tällöin templaatin molemmille juosteille muodostuu vastinjuoste alukkeista lähtien. Näitä reaktion kolmea vaihetta, joita kutsutaan yhdessä sykliksi, toistetaan useita kertoja. Jokaisen syklin aikana tuotteen määrä kaksinkertaistuu. Ensimmäisen syklin tuloksena saadaan siis kahdesta nukleiinihapponauhasta kaikkiaan neljä nauhaa. Seuraavassa syklistä saadaan neljästä nauhasta kahdeksan nauhaa. Kolmannessa syklistä saadaan jo kahdeksasta nauhasta 16 nauhaa ja niin edelleen syklejä toistettaessa. Syklejä toistamalla saadaan valmistettua alkuperäiseen verrattuna moninkertainen määrä nukleiinihappoa. Hyvin optimoidulla PCR:llä voidaan saada yhtä templaattimolekyyliä kohti valmistettua miljoona tuotemolekyyliä. (Brown 2010, 147-149; Suominen ym. 2010, 154-157.) Yhden polymeraasiketjureaktiosyklin kulku vaiheineen on kuvattu kuvassa 2.



Kuva 2 Polymeraasiketjureaktiosyklin kulku (BioSistemica 2012.)

Ensimmäisessä syklistä syntyvät tuotteet ovat toisesta päästään monistettavaa aluetta pidempiä, sillä DNA-polymeraasi jatkaa tuotteen synteesiä niin kauan kunnes seuraava denaturaatio alkaa. Vasta toisessa syklistä saadaan tuotteeksi täsmälleen oikean pituisia DNA-jaksoja. Kuitenkin jokaisessa syklistä syntyy myös alkuperäiselle templaatille vastinjuoste, joka on haluttua monistusaluetta pidempi. Näiden hieman pidempien tuotemolekyylien määrä on kuitenkin häviävän pieni verrattuna reaktiossa syntyvän tuotteen lopulliseen määrään. Polymeraasiketjureaktiossa toistetaan syklejä yleensä 15-40 kertaa. PCR-tuotteen käyttötarkoituksesta riippuen tuote voidaan joutua puhdistamaan ylimääräisistä alukkeista ja nukleotideista. Joissain sovelluksissa tuotetta ei tarvitse puhdistaa lainkaan. PCR-menetelmällä työskennellessä on hyvä tehdä varsinaisen PCR:n lisäksi kontrollireaktioita, jotta voidaan varmistua menetelmän toimivuudesta. Negatiivisina kontroleina voidaan tehdä PCR, jossa on templaatti ilman alukkeita ja alukkeet ilman templaattia. Voidaan myös tehdä positiivinen kontrolli eli käyttää reaktiota, joka on toiminut aikaisemmin ja antanut positiivisen tuloksen. PCR:ta varten täytyy pipetoida pieniä tilavuuksia eri liuoksia. Pienten tilavuuksien pipetoiminen on haastavaa. Pipetoinnin apuna voivat olla värilliset liuokset. Pipetoinnissa voidaan käyttää myös automatiikkaa apuna. (Suominen ym. 2010, 154-157.)

4.1 Alukkeiden suunnittelu

PCR:n onnistumisen kannalta on oleellisen tärkeää, että reaktio suunnitellaan hyvin etukäteen. Tässä suunnittelussa oleellista on reaktion kannalta sopivien alukkeiden valinta tai suunnittelu. Alukkeet tulee suunnitella siten, että ne pariutuvat templaattijuosteeseen juuri haluttuihin kohtiin, mutta eivät sitoudu herkästi muualle templaattiin. Alukkeen tulee olla komplementaarinen templaattijuosteen kanssa, jotta hybridisaatio templaattijuosteen ja alukkeen välillä voi tapahtua. Monistettavan DNA-jakson ei tulisi olla yli 3kb suuruinen ja sen tulisi mielellään olla alle 1 kb. Pidempiäkin jaksoja pystytään monistamaan, mutta tulokset voivat olla heikompia, ellei käytetä erityismenetelmiä. Alukkeiden tulee olla sopivan mittaisia. Liian lyhyet alukkeet sitoutuvat helposti väärin kohtiin, jolloin tuloksena syntyy useita erilaisia suunnittelemattomia tuotemolekyylejä. Liian pitkät alukkeet puolestaan hidastavat alukkeiden pariutumista templaatin kanssa, jolloin ketjureaktion tehokkuus pienenee. Käytetyt alukkeet ovat harvoin yli 30 emäksen mittaisia. (Brown 2010, 149-152.)

Alukkeilla voi olla taipumusta pariutua itsensä kanssa siten, että se muodostaa niin sanotun hiusneularakenteen (hairspin) siten, että alukkeen alku- ja loppupää pariutuvat keskenään, jolloin alukkeen sitoutuminen templaatti-DNA:han vaikeutuu. Alukkeet saattavat olla myös herkkiä muodostamaan alukedimeerejä. Tällöin eri alukkeet saattavat sitoutua voimakkaasti toisiinsa 3'-päistään ja muodostaa sitten pidennysvaiheen aikana dimeerejä. Tällaisessa reaktiossa ei saada tuotetta haluttua määrää, koska tarvittavat alukkeet voivat loppua kesken. Alukkeiden sitoutuminen toisiinsa 5'-päistään ei ole niin merkityksellistä, joskin voi vähentää reaktion saantoa jonkin verran. Tällaisia alukkeita tulisi pyrkiä välttämään parhaan mahdollisen lopputuloksen saamiseksi. (Suominen ym. 2010, 158-160.)

Reaktiossa käytettävät lämpötilat ovat erittäin merkityksellisiä reaktion onnistumiselle. Reaktioissa annealing-vaiheen lämpötila on riippuvainen alukkeiden pituudesta, nukleotidikoostumuksesta ja pitoisuudesta. Oikean annealing-lämpötilan valinta on tärkeää, että saadaan oikeita tuotteita. Jos valittu annealing-lämpötila on liian korkea, alukkeiden ja templaatin pariutumista ei tapahdu. Jos lämpötila puolestaan on liian matala, pariutumista tapahtuu myös kohdissa, jotka eivät ole täysin komplementaarisia alukkeen kanssa. Kun lämpötila on valittu oikein, alukkeet pariutuvat templaatti-DNA:han vain haluttuihin kohtiin. Oikean annealing-lämpötilan laskemisen apuna voidaan käyttää alukkeiden sitoutumisen voimakkuutta kuvaavaa sulamislämpötilaa T_m . Tässä lämpötilassa puolet alukkeista on sitoutuneena templaatteihin ja puolet on irrallaan reaktioseoksessa. Käytettäessä lyhehköjä alukkeita T_m voidaan karkeasti arvioida Wallacen säännön avulla: $T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$. Tämän säännön perusteella jokainen alukkeessa oleva A- ja T-emäs nostaa lämpötilaa 2 $^{\circ}\text{C}$ ja kukin G- ja C-emäs nostaa lämpötilaa 4 $^{\circ}\text{C}$. Sulamislämpötilan tarkempaa laskemista varten on kehitetty lukuisia internetistäkin ilmaiseksi löytyviä laskureita. Alukkeiden suunnitteluun on olemassa erilaisia tietokoneohjelmia, jotka osaavat huomioida lämpötilan määrittelyssä esimerkiksi alukkeiden sitoutumiskohtien naapurinukleotidien ja liuoksen ionivahvuuden vaikutuksen sulamislämpötilaan. Eri laskentaohjelmien antamat suosituslämpötilat voivat vaihdella hieman, joten lämpötilan toimivuutta voi joutua testaamaan ja optimoimaan. Alukepari tulisi suunnitella siten, että niiden sulamislämpötilat eivät poikkeaisi paljoa toisistaan. Alukkeiden T_m -lämpötilaa ei yleensä voida käyttää suoraan an-

nealing-lämpötilana vaan lähtökohta annealing-lämpötilan optimointiin on $T_m - 5$ °C tai $1-2$ °C T_m matalampi lämpötila. Yleisimmin sopiva annealing-lämpötila on 55-72 °C. (Suominen ym. 2010, 158-160; Brown 2010, 149-152.)

4.2 PCR:n optimointi

PCR:ää optimoidessa tulee ottaa huomioon monia asioita. Kaikkien käytettävien aineiden pitoisuuksilla on merkitystä kokonaisuuden ja lopullisen saannon kannalta. Mikäli jotain reaktiossa tarvittavaa ainesosaa, kuten entsyymiä, alukkeita tai deoksinukleotideja on liian vähän, reaktion saanto pienenee. Jos jotain ainesosaa puolestaan on liikaa, epäspesifisten tuotteiden syntyminen on todennäköisempää. (Suominen ym. 2010, 162.)

Käytettävien entsyymien työskentelytehokkuudessa on eroja, joten tarvittavan entsyymien määrä on riippuvainen käytetystä entsyymistä. Tarvittava entsyymimäärä riippuu myös templaateista ja alukkeista. Alukkeiden optimaalinen pitoisuus reaktioliuoksessa on yleensä 0,1-0,5 μM . Kutakin deoksinukleotidia tulisi olla yhtä paljon seoksessa, ellei tahallisesti haluta aiheuttaa mutaatioita PCR:ssä. Erilaiset deoksinukleotidien pitoisuudet lisäävät synteessissä tapahtuvien pistemutaatioiden määrää. Magnesiumionien konsentraatio liuoksessa vaikuttaa moniin asioihin. DNA-polymeraasientsyymi vaatii vapaita magnesiumioneja toimiakseen. Magnesiumionien pitoisuus liuoksessa tulee olla 0,5-2,5 mM enemmän kuin deoksinukleotidien kokonaispitoisuus. (Suominen ym. 2010, 162.)

Aineiden pitoisuuksien lisäksi reaktion onnistumiseen vaikuttavat reaktiossa käytetyt eri vaiheiden lämpötilat ja kestot. Denaturaation epäonnistuminen estää koko reaktion onnistumisen. Denaturaatio suoritetaan tyypillisesti 95 °C:ssa 30 sekunnin ajan. Denaturaatioaikaa pidennettäessä entsyymien aktiivisuus pienenee. *Taq*-polymeraasia termostabiilimpia entsyymejä käytettäessä denaturaatioaikaa voidaan pidentää yhteen minuuttiin. Hyvin GC-pitoista templaattia käytettäessä denaturaatiolämpötilaa voi nostaa 97 °C. Ensimmäistä sykliä edeltävän alkudenaturaation voi tehdä muita denaturaatioita pidempikestoisena. Alukkeiden kiinnittymisen lämpötilaa eli annealing-lämpötilaa käsiteltiin jo edellä alukkeiden suunnittelun yhteydessä. Alukkeiden pidentymisvaiheen eli ekstension aikaan vaikuttaa templaatin pituus ja määrä sekä käytetty entsyymi ja lämpötila. *Taq*-polymeraasilla ekstensiolämpötila on yleensä 72 °C. Yhden minuutin ekstensioaika riittää alle 2 kb kokoisille tuotteille. Reaktion alkuvaiheessa hieman pidemmistä ekstensioajoista voi olla hyötyä ja reaktion viimeisen syklin ekstensioaika on yleisesti pidempi, jotta keskeneräiset tuotteet ehtivät valmistua. Reaktiossa käytettävien syklien lukumäärä määräytyy templaatti-DNA:n määrän mukaan. Liian suurella syklimäärällä epäspesifisten tuotteiden syntyminen todennäköistyy ja liian vähäisellä syklimäärällä tuotteen määrä luonnollisesti jää vähäisemmäksi. (Suominen ym. 2010, 163-164.)

Koska reaktion onnistumiselle tärkeää on eri vaiheiden lämpötilat ja kestot, on tärkeää että PCR-laite on täsmällinen, ja toteuttaa reaktion siten kuin siihen on ohjelmoitu. Laitteen tarkkuus ja reaktioiden toistettavuus tulee olla hyvä. Laitteissa lämmön siirtoon käytetään Peltier-elementtejä, joissa kahdesta eri materiaalista muodostettu laite siirtää sähkövirran vaikutuksesta lämpöä eri osien välillä. Lämmönsiirtomateriaalina voidaan käyttää esimerkiksi hopeaa tai ilmaa. Elementeissä lämpötila

saattaa vaihdella eri kohdissa, joten laitteen toimivuutta ja lämpötiloja on hyvä testata vuosittain. (Suominen ym. 2010, 164.)

PCR on herkkä kontaminaatioille, etenkin kun templaattia on vähän käytössä. PCR-työskentelyssä, esimerkiksi *in vitro*-diagnostiikassa, tulee olla erittäin huolellinen kontaminaatioiden estämiseksi. Tilojen ja välineiden tulee olla ehdottoman puhtaita ja DNA-vapaita. Tilojen ilmanvaihdon tulee olla oikein järjestetty, jottei kontaminoivaa DNA:ta kulkeudu tiloihin. Tällöin voidaan estää väärin positiivisten tulosten synty. Kontaminaatit saattavat joissain tapauksissa myös estää reaktion toiminnan, jolloin voi syntyä vääriä negatiivisia tuloksia. (Suominen ym. 2010, 165-166.)

4.3 PCR-tuotteen jatkokäsittely

PCR-tuotteen jatkokäsittely monistuksen jälkeen riippuu tuotteen käyttötarkoituksesta. Tuote voidaan analysoida käyttäen geelielektroforeesia. PCR-tuote voidaan kloonata, mikäli se halutaan liittää vektoriin geenimuuntelua varten. Tuote voidaan myös sekvensoida, jolloin saadaan selville kopioidun nukleinihappojakson emäsjärjestys. Sekvensointiin on kehitetty useita erilaisia menetelmiä. (Brown 2010, 154.)

Useimmiten PCR-tuotteen analysointiin käytetään tuotteen ajamista geelielektroforeesilaitteistolla. Erilaisia elektroforeesilaitteistoja on useita. Polyakryyliamidigeelielektroforeesilla voidaan analysoida pieniä nukleinihappojaksoja. Keskikokoisia fragmentteja voidaan analysoida agarosigeelielektroforeesilla. Suurten DNA-fragmenttien ja jopa kokonaisten kromosomien analyysiin käytetään pulssikenttäälektroforeesia. Elektroforeesissa geeliin johdettu sähkövirta saa DNA-juosteet liikkumaan sähkökentässä. Perinteisesti elektroforeesissa käytetään kaksinapaista sähkökenttää. Pulssikenttäälektroforeesissa sähkövirran suunta vaihtelee. (Suominen ym. 2010, 122.)

DNA on negatiivisesti varautunut, koska siinä on fosfaattiryhmiä, jotka tekevät siitä happaman ja siten negatiivisesti varautuneen. Negatiivisesti varautuneena molekyylinä DNA kulkeutuu sähkökentässä positiivista napaa eli anodia kohti. Yleensä mitä suurempi DNA-molekyyli on, sitä hitaammin se liikkuu sähkökentässä. Kulkeutumiseen vaikuttaa lisäksi geelin tiheys ja DNA-molekyylin muoto. Tällä menetelmällä saadaan erikokoiset DNA-molekyylit muodostamaan omat geelissä erottuvat vyöhykkeensä. Nukleinihappomolekyylit sellaisenaan eivät erotu silmin nähtävästi. Tämän vuoksi ennen elektroforeesigeeliin lisätään ennen ajoa useimmiten etidiumbromidia. Etidiumbromidin avulla vyöhykkeet saadaan näkyviksi, kun ne kuvataan UV-valossa. Ajossa käytetään usein mukana kokostandardia, jonka muodostamien vyöhykkeiden avulla voidaan nähdä onko PCR:llä saatu tuote oikeaa eli onko se halutun kokoista. Elektroforeesilla voidaan myös nähdä jos reaktiossa on syntynyt sivutuotteenä muita erikokoisia tuotteita. Mikäli vyöhykkeitä ei muodostu elektroforeesilla lainkaan näytteen kohdalle, voidaan todeta, että PCR on jostain syystä epäonnistunut eikä reaktiotuotetta ole muodostunut lainkaan. Kun elektroforeesijossa käytetään kokostandardia, voidaan todeta että elektroforeesi on toiminut, kun standardille tyypilliset vyöhykkeet tulevat näkyviin. (Suominen ym. 2010, 123-129.)

Elektroforeesijon jälkeen halutut DNA-fragmentit voidaan eristää geeliltä erilaisia menetelmiä käyttäen. Käytetyimpiä menetelmiä ovat erilaiset silikamenetelmät ja LGT-agarosimenetelmä. Kaupalliset pikamenetelmät perustuvat yleensä erilaisten silikamatriisien käyttöön. (Suominen ym. 2010, 130.)

4.4 Erilaisia PCR sovelluksia

Erilaisia PCR:n sovelluksia on kehitetty useita, kuten reaaliaikainen PCR (real-time PCR) ja kvantitatiivinen PCR (qPCR). PCR:n avulla voidaan tutkia myös RNA:ta, kun tutkittava RNA käännetään ensin DNA:ksi. RNA:n kääntäminen komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) suoritetaan käänteiskopioijaentsyymien avulla, minkä jälkeen monistaminen suoritetaan PCR:llä. Tällöin kyseessä on RT-PCR (reverse transcriptase PCR). Joskus näkee käytettävän lyhennettä RT-PCR myös reaaliaikaisesta PCR:stä. (Suominen ym. 2010, 166-170; Brown 2010, 158-161.)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä voidaan PCR-tuotteen määrää seurata kaiken aikaa reaktion aikana. Tuotteen määrää voidaan seurata kahdella tapaa. Reaktioseokseen voidaan lisätä fluoresoivaa merkkiainetta, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han. DNA:han sitoutunut merkkiaine fluoresoi huomattavasti voimakkaammin kuin sitoutumaton merkkiaine. Joskus alukkeet voivat pariuua kaksijuosteiseen muotoon siten, että kaksijuosteisen DNA:n ja siten myös fluoresenssisignaalin määrä hieman kasvaa. Fluoresenssisignaalin voimakkuus kuitenkin kertoo hyvin tuotteen määrästä seoksessa. Toinen tapa saada tuotteen määrä näkyväksi, on käyttää lyhyitä, fluoresoivalla signaalilla varustettuja oligonukleotideja eli koettimia. Koettimet tuottavat spesifisen fluoresoivan signaalin vain ollessaan sitoutuneena DNA:han. Näin saadaan mitattua vain sitoutuneiden koettimien määrä, joka on riippuvainen tuotteen määrästä. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä on etuna perinteiseen menetelmään verrattuna se, että koko prosessi ja tuloksen saaminen nopeutuu, kun tuote voidaan havaita jo reaktion aikana eikä lopputuotetta tarvitse käsitellä ja mitata laboratoriossa reaktion jälkeen. Nykyisin käytetäänkin lähinnä reaaliaikaisia PCR-menetelmiä niiden etujen vuoksi. Reaaliaikaisen PCR:n laitteet ovat kuitenkin kalliimpia kuin perinteiset PCR-laitteet. (Suominen ym. 2010, 166-168; Brown 2010, 158-160.)

Kvantitatiivisella PCR:llä pyritään määrittämään alkuperäisen näytteen DNA-molekyyliäärää. PCR:llä muodostuneiden tuotemolekyylien määrä on riippuvainen alkuperäisten templaattimolekyylien määrästä. Ongelmana on kuitenkin se, että reaktio on hyvin herkkä muutoksille, eikä kahdessa periaatteessa samanlaisessa ja samanlaisissa oloissa tehdyssäkään reaktiossa välttämättä saada samanlaisia määriä tuotetta. Perinteisesti PCR-tuotteen määrää on arvioitu elektroforeesigeeliin muodostuneista vyöhykkeistä niiden intensiteetin avulla. Näytteen muodostaman vyöhykkeen intensiteettiä verrattiin samassa ajossa olleiden tunnetun vahvuisten DNA-standardien muodostamien vyöhykkeiden intensiteettiin. Tämä menetelmä on kuitenkin melko epätarkka, sillä suurelta erot alkuperäisen templaatin määrässä eivät tuota kovin suurta eroa elektroforeesiin muodostuneen vyöhykkeen intensiteettiin. Nykyisin DNA:n määrää mitataan reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä. Alkuperäisen templaatin määrää voidaan arvioida käyttämällä reaktiossa mukana kilpailevana templaattina toimivaa sisäistä standardia, tällöin suljetaan pois menetelmässä tapahtuvista pienistä muutoksista

aiheutuvia eroja tuotteen määrässä. Reaaliaikaisessa PCR:ssä siis mitataan reaktioseoksessa muodostuvan fluoresoivan signaalin voimakkuutta. Fluoresoivalle signaalille voidaan asettaa tietty kynnyksisarvo. Mitä nopeammin kynnyksisarvo ylittyy, sitä enemmän DNA-templaattia on ollut alussa reaktioseoksessa. (Suominen ym. 2010, 166-170; Brown 2010, 158-160.)

Muodostuneen PCR-tuotteen puhtaus voidaan todeta mittaamalla tuotteen sulamislämpö. Perinteisellä PCR-laitteella tämä tehdään mittaamalla tuotteen absorbanssi 260nm:lla eri lämpötiloissa. Näytettä lämmitettäessä DNA-juosteet eroavat toisistaan sekvenssille tyypillisessä lämpötilassa (sulamislämpö). Yksinauhaisessa muodossa oleva DNA absorboi 260 nm UV-valoa enemmän kuin kaksijuosteinen muoto. Mitattua sulamislämpöä voidaan sitten verrata sekvenssille ominaiseen teoreettiseen arvoon, jolloin voidaan varmistua siitä, että tuote on oikeaa. Reaaliaikaisen PCR:n laitteissa tuotteen sulamiskäyrät tuotetaan automaattisesti. (Suominen ym. 2010, 168-169.)

5 KLIINISESTI MERKITTÄVIÄ PCR-MENETELMÄLLÄ TUTKITTAVIA BAKTEEREJA

Kliinisessä mikrobiologiassa on otettu käyttöön melko uusina menetelminä erilaisia PCR-tekniikkaan perustuvia bakteerien tunnistus- ja tyyppitysmenetelmiä. Joidenkin bakteerien tunnistus näytteestä on riittävää diagnoosin tekemiseksi ja sopivan hoidon aloittamiseksi. Eli käytännössä kun spesifisillä alukkeilla saadaan monistettua havaittava määrä DNA:ta näytteestä, voidaan todeta näytteen sisältäneen kyseisen bakteerin DNA:ta. Joissakin tapauksissa voi olla tarpeen tutkia löytyykö kyseiseltä bakteerikannalta tiettyä esimerkiksi virulenssiin oleellisesti vaikuttavaa geeniä. Myös PCR-menetelmillä tehtävien epidemiologisten selvitysten tekeminen on nykyisin arkipäivää ja suureksi avuksi epidemioiden leviämisen selvittelyssä ja uusien epidemioiden leviämisen ennaltaehkäisyssä. Tässä käsitellään joitakin bakteereja, joiden aiheuttamien infektioiden selvittelyssä voidaan hyödyntää PCR-menetelmää jollain tavalla. Perusteluja juuri näiden bakteerien valitsemiseen käsiteltäväksi on esitelty kappaleessa 7.1.

5.1 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis aiheuttaa hinkuyskää, joka oli etenkin aikaisemmin hengenvaarallinen sairaus varsinkin imeväisikäisille lapsille. Myös jotkin muut bakteerit, kuten *B. parapertussis* aiheuttavat hinkuyskää lievempänä tautina. Hinkuyskä on saanut nimensä tautiin liittyneistä hinkumista aiheuttavista yskänpuuskista. Suomessa rokotukset hinkuyskää vastaan aloitettiin 1952, minkä jälkeen tauti on vähentynyt huomattavasti sekä ennen tyyppillisen lastentaudin potilaiden ikäjakauma on muuttunut siten että nykyisin kolmasosa tartunnoista todetaan aikuispotilailla. Rokotuksista huolimatta hinkuyskätapauksia on ilmennyt jonkin verran jatkuvasti. Rokotteiden teho kestää vain muutamia vuosia eikä sairastettu hinkuyskäkään anna elinikäistä immunitettia. (Forsius 2005; Kantele, He & Mertsola 2005; Mertsola & He 2010, 170.)

Bordetella pertussis on aerobinen gramnegatiivinen pieni sauvabakteeri. Sillä on monia virulenssitekijöitä. Se tarttuu hengitysteiden värekarvalliseen epiteeliin filamenttihemagglutiniiniin (FHA), pertusistoksiiniin (PT), pertaktiiniin (PRN) ja fimbrioiden avulla (FIM). *B. pertussis* tuottaa toksiineja, jotka lamaannuttavat värekarvojen toiminnan ja aiheuttavat tulehduksen hengitysteihin ja siten sitkeän hinkuyskälle tyyppillisen yskän. (Kantele, He & Mertsola 2005; Mertsola & He 2010, 170.)

5.1.1 Infektio

Hinkuyskä tarttuu herkästi pisaratartuntana ja hengitystie-eritteiden välityksellä. Hinkuyskän tyyppillisin oire on puuskittainen tikahduttava yskä. Hyvin nuorilla vauvoilla yskää ei välttämättä kehity vaan tauti ilmenee toistuvina hengityspysähdyksinä. Taudin itämisaika on yleensä noin viikko. Korkeaa kuumetta ei yleensä liity tautiin, vähäistä nuhaa ja lämpöilyä kylläkin. Kouluikäiset lapset ja aikuiset hakeutuvat lääkäriin yleensä vasta yskän kestänyt viikkoja. Yskäkohtauksen laukaisee usein rasitus, tupakan savu tai lämpötilamuutos. Tyyppillisesti hinkuyskä kestää kuudesta kymmeneen viikkoon. Vaikeaan hinkuyskään voi liittyä monia vakavia komplikaatioita etenkin rokottamattomilla pienillä lapsilla. Keuhkokuume on tavallinen komplikaatio. (Mertsola & He 2010, 172-173.)

5.1.2 Diagnostiikka ja hoito

Bordetella pertussiksen diagnostiikassa käytetään viljelyä, hinkuyskä-PCR:ää ja serologiaa. Pitkään oireilleilla potilailla käytetty menetelmä on serologia, lyhyempään oireilleilla viljely ja PCR-tutkimus. Bakteriviljelynäyte otetaan nenänielusta ja viljely vaatii erikoismaljoja ja on usein melko epäherkkä menetelmä. Negatiivinen viljelytulos ei siis tarkoita ettei tartuntaa olisi. Yli kuukauden ikäisissä tartunnoissa viljelyn tulos on useimmiten negatiivinen ja viljely siten turha. Hinkuyskän diagnosoinnissa käytettyjä PCR-menetelmiä on useita. Useimmat hinkuyskädiagnoosit tehdään Suomessa serologiamenetelmillä. Vasta-aineet kuitenkin kehittyvät hitaasti, joten tuoreissa tartunnoissa menetelmää ei voi käyttää. Serologiassa on myös ongelmana menetelmien huono standardoituavuus. Nykyinen serologia ei myöskään erottele *B. pertussista* ja *B. parapertussista*. Aikuisten hinkuyskädiagnoosiin suositellaan PCR-tekniikan ja serologian yhdistämistä. (Kantele, He & Mertsola 2005; Mertsola & He 2010, 173-174.)

Hinkuyskän hoitoon käytetään perinteisesti erytromysiiniä, jonka uudemmat makrolidivalmisteet ovat osin syrjäyttäneet vähäisempien gastrointestinaalisten sivuvaikutustensa vuoksi. Yli kuukauden yskineillä potilailla hinkuyskää ei tarvitse hoitaa, sillä elimistö on jo itse tuhonnut bakteerit. Hoidon teho on paras alle kaksi viikkoa kestäneessä taudissa, vanhemmissa tartunnoissa hoitoa käytetään lähinnä tartuttamisen ehkäisemiseksi. (Kantele, He & Mertsola 2005.)

5.1.3 PCR-diagnostiikka

Suomessa pienten lasten hinkuyskätapauksista yli 80 % diagnosoidaan nykyisin viljelyn ja PCR-menetelmän avulla. Useita erilaisia PCR-menetelmiä on olemassa. *B. pertussiksen* PCR-diagnostiikassa on yleensä pyrkimyksenä tunnistaa *B. pertussis* ja erottaa se muista hinkuyskän kaltaisia tauteja aiheuttavista bakteereista. Tavallisin hinkuyskädiagnoosiin PCR-menetelmistä perustuu *B. pertussiksen* toistojakson kopiointiin. Tavallinen käytetty toistojakso on IS481. Tällä voidaan tunnistaa *B. pertussis*. PCR-tutkimuksessa voi olla virhetekijänä vastikään USA:ssa havaittu puuskitaista yskää aiheuttava *B. pertussiksen* sukulaisbakteeri *Bordetella holmesii*. *B. holmesii* reagoi ristiin PCR-tutkimuksessa tavallisimmin käytetyn pertussis-PCR-alukkeen kanssa (IS481 PCR). Suomesta tätä bakteeria ei ole löytynyt uusilla spesifisillä PCR-menetelmillä. (Mertsola & He 2010, 172-174.)

Uusi Yhdysvalloissa kehitetty monikohde PCR voi erottaa *Bordetella*-lajit toisistaan (Tatti, Sparks, Boney & Tondella 2011). *B. pertussis* tunnistetaan jaksolla IS481. *B. parapertussis* tunnistetaan jaksolla IS1001 (pIS1001). *B. holmesii* tunnistetaan IS1001-kaltaisella jaksolla (hIS1001). Myös harvinainen *B. bronchiseptica* voi joskus antaa positiivisen tuloksen käytettäessä IS481-PCR:ää. Tämän erottamiseen voidaan käyttää pertussistoksiinin alayksikön S1 (*ptxS1*) kopiointia. Tutkimuksella *B. pertussis* on positiivinen aina IS481:llä ja *ptxS1*:llä. *B. holmesii* on positiivinen IS481:llä ja hIS1001:llä, mutta negatiivinen pIS1001:llä. *B. parapertussis* on positiivinen pIS1001:llä ja *ptxS1*:llä, mutta negatiivinen IS481:llä ja hIS1001:llä. Menetelmä testattiin myös useilla muilla kuin *Bordetella*-

lajien bakteereilla, eikä se reagoi ristiin muiden bakteerien kanssa. Tällä menetelmällä voidaan siis luotettavasti ja herkästi tunnistaa ja erotella kliinisesti merkittävät *Bordetella*-lajit. Koska Suomessa ei ole havaittu *B. holmesiita* ja *B. bronchiseptica* on hyvin harvinainen ja harvoin etenkin ihmisestä eristetyistä kannoista testattuna reagoi IS481-PCR:ssä, riittänee Suomessa *B. pertussiksen* tunnistamiseksi IS481 ilman monimutkaisempia menetelmiä.

PCR-tutkimusta varten näyte otetaan nenänielusta mieluiten dacrontikulla, joka lähetetään laboratorioon kuivassa koeputkessa. PCR-tutkimukseen voidaan käyttää myös nenänielun imulimaa. PCR-näytteen voi säilyttää jääkaapissa ennen kuljetusta. PCR-tulos voi säilyä positiivisena vielä useita päiviä antibiootihoidon alkamisesta. PCR-tutkimuksella voidaan myös löytää oireettomia *B. pertussis*-bakteerin kantajia. PCR-menetelmä on hyvin herkkä ja spesifinen. (Mertsola & He 2010, 173-174.)

Kuten kaikki PCR-menetelmät, myös *B. pertussis*-PCR-menetelmät ovat herkkiä kontaminaatioille, minkä vuoksi PCR-työskentelyssä on tärkeää olla huolellinen ja huolehtia hyvästä hygieniasta ja estää kontaminanttien leviäminen. Näytteisiin voi tulla kontaminaatioita ja siten virheellisiä positiivisia tuloksia esimerkiksi *B. pertussis*-rokotteista, kuten oli havaittu tapahtuneen USA:ssa julkaistun tutkimuksen mukaan (Salimnia ym. 2012).

Ennen PCR-tutkimusta näytteestä pitää eristää DNA ja puhdistaa se. Näytetikusta DNA voidaan liuottaa esimerkiksi valmiiseen kuljetusliuokseen. DNA:n eristämiseen näytteestä voidaan käyttää esimerkiksi valmista kaupallista MagnaPure LightCycler -eristyskittiä. (Vestrheim ym. 2012; Tatti ym. 2011.)

PCR-menetelmä on huomattavasti herkempi viljelyyn verrattuna, etenkin jos näytteen bakteerimäärä on niukka. Norjalaisessa tutkimuksessa (Vestrheim ym. 2012) on todettu, että *B. pertussis*-viljelytuloksen positiivisuus PCR-positiivisista näytteistä riippuu näytteen bakteerien määrästä. Tutkimuksessa oli tutkittu PCR-positiivisia nenänielunäytteitä kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Tutkimuksessa tehtiin myös viljely samoilta potilailta otetuista näytteistä. Tutkimuksessa todettiin, että mitä pienemmällä syklimäärällä saatiin kynnyсарvo ylitettyä, sitä useammin näytteestä saatiin myös viljelystä positiivinen tulos. Eli mitä suurempi määrä DNA:ta näytteessä oli ollut, sitä todennäköisemmin viljelytulos oli positiivinen. Tutkimuksessa mukana olleista 223 PCR-positiivisesta näytteestä 45 eli 20,2 % antoi positiivisen viljelytuloksen.

5.2 *Borrelia burgdorferi*

Borrelioosia aiheuttaa *Borrelia burgdorferi*-bakteeri, jota kantavat Ixodes-puutiaiset. Näitä borrelioosia levittäviä puutiaisia esiintyy koko Etelä- ja Keski-Suomessa. Eniten niitä on Ahvenanmaalla ja Saaristomeren alueella. Satunnaisesti puutiaisia eli kansanomaisesti punkkeja on tavattu pohjoisempaanakin. Samat puutiaiset levittävät myös vakavampaa puutiaisaivokuumetta (TBE-virus). Borrelioositartuntoja esiintyy vuosittain eniten huhtikuusta loka-marraskuuhun, kun puutiaiset ovat liikkeellä. (Seppänen 2011; Oksi, Seppälä & Hytönen 2010, 247-248.)

Borrelia burgdorferi on korkkiruuvimainen muotoinen 10-30 µm pitkä ja 0,5 µm paksu spirokeettabakteeri. Se luokitellaan gramnegatiivisiin bakteereihin soluseinäarakenteensa perusteella. Tarkkaan ottaen *Borrelia burgdorferi* sensu lato on yhteisnimi ryhmälle borreliabakteereja. *Borrelia*-bakteerien genomi on epätyypillisesti jakaantunut lineaariseen kromosomiin sekä useisiin lineaarisiin tai sirkulaarisiin plasmideihin. (Seppänen 2011; Oksi, Seppälä & Hytönen 2010, 247-248.)

5.2.1 Infektio

Lymen borreliosia sai nimensä, kun 1970-luvun lopussa Lymen pikkukaupungissa USA:ssa nivelreuman kaltaisen epidemian yhteydessä havaittiin tautiin liittyvän puutiaisen purema ja rengasmaisen punainen ihomuutos. *B. burgdorferi* bakteeri löydettiin vuonna 1982 puutiaisesta. Borreliositartuntoja on Suomessa 3000-4000 vuosittain. Lymen borreliosia tarttuu puutiaisen puremassa. *Borrelia burgdorferi* -bakteerin tartunta on mahdollista usean, vähintään 24 tunnin kuluttua siitä, kun puutiainen aloittaa ateriointinsa. Tämän aikaa kestää, että puutiaisen suolessa elävät bakteerit muuttuvat infektiivisiksi ja siirtyvät iholle. Jos puutiainen saadaan poistettua iholta vuorokauden sisällä puremasta, infektioriski on olemattoman pieni. Borreliosissa tavallinen löydös on puutiaisen puremakohdan ympärille iholle leviävä rengasmaisen laajeneva punoitus, erythema migrans (EM). Tämä johtuu bakteerien säteittäisestä leviämisestä ihon alla puremakohdasta pois päin. Infektiokohtaan kertyy tulehdussoluja ja paikalliset verisuonet voivat vaurioitua ja tulehtua. EM leviää yleensä 5 vuorokauden aikana 5 cm läpimittaiseksi. EM voi laajeta jopa kymmenien senttimetrien laajuuteen. Kaikille tartunnan saaneille ei kehity EM:ää. Borreliosin oireena voi olla kuumetauti, johon ei liity yskää, nuhaa tai ripulia. Suomessa suurin osa tartunnoista on ihoon rajoittuneita alkuvaiheen borreliooseja. Bakteerit voivat kuitenkin aiheuttaa levinneen infektion tunkeutuessaan verisuonten endoteleihin ja veri-aivoesteeseen läpi. Taudin levitessä seurauksena voi olla muun muassa meningiitti, arttriitti myokardiitti tai neuroborreliosia eli infektion levinnyt tautimuoto, jonka yleisin oire on aivohermohalvaus. Levinneen infektion oireet alkavat yleisimmin 1-3 kk kuluttua puremasta ja viimeistään vuoden kuluessa. (Seppänen 2011; Oksi, Seppälä & Hytönen 2010, 247-248.)

5.2.2 Diagnostiikka ja hoito

Borreliosin diagnostiikka on hiukan ongelmallista. Infektiota ei aina voida yksiselitteisesti todentaa tai poissulkea. Borreliosia diagnosoidaan usein kliinisten oireiden, pääasiassa EM, perusteella. Antibioottihoidon aloittaminen jo esitietojen ja EM:n perusteella. Tuoreessa tartunnassa ei ehdi kehittyä vereen vasta-aineita, joiden perusteella tauti voitaisiin diagnosoida. Vasta-aineiden kehittyminen kestää 3-4 viikkoa ja vasta-ainetasojen muutokset kehittyvät hitaasti. Levinnyttä borreliosia epäiltäessä vasta-ainemäärityksestä on yleensä apua. Joskus ilmenee kuitenkin levinnyttä borreliosia sairastavia potilaita, joilla vasta-aineet ovat negatiiviset, joten negatiivinen tuloskaan ei sulje pois Lymen borreliosia. Joskus vasta-ainetestit voivat antaa myös vääriä positiivisia tuloksia. Oireettomilta henkilöiltä ei tule mitata vasta-aineita lainkaan, sillä kohonnutkaan vasta-ainepitoisuus ei välttämättä kerro käynnissä olevasta infektiosta. Poikkeuksena potilaat, joilla on ollut lähiaikoina todennäköisesti EM. Borrelian viljely on hyvin vaikeaa, eikä sitä käytetä rutiinidiagnostiikassa. Pitkittyneissä ja keskushermoston infektioiden tapauksissa voidaan käyttää nukleinihapon osoitusta likvorista, nivelnes-

teestä tai kudoksenäytteestä. Tämä menetelmä on kuitenkin epäherkkä periaatteellisesta herkkyydestään huolimatta. Ongelmana on se, ettei näytettä saada otettua infektiopesäkkeestä. Negatiivinen PCR-testikään ei poissulje borrelioosin mahdollisuutta. Verinäytteistä ei PCR-testiä kannata tehdä kuin enintään korkeakuumeisilta potilailta spiroketemiaepäilyissä. (Oksi, Seppälä & Hytönen 2010, 249-254; Seppänen 2011.)

Borrelioosin hoitokäytännöt vaihtelevat eri maissa ja eri maiden hoitolaitoksissa. Hoito riippuu myös infektion voimakkuudesta ja kestosta. Varhaisen vaiheen infektioiden yhteydessä käytetään yleensä suun kautta otettavaa antibioottilääkettä, esimerkiksi amoksisilliiniä. Levinneissä infektioiden yhteydessä käytetään usein suonensisäistä antibioottia, kuten keftriaksonia. Lääkehoitokuuri ei välttämättä saata oireita heti häviämään, vaan oireiden poistumiseen voi mennä aikaa yli puolikin vuotta. Borrelioosiin ei ole olemassa rokotetta. Tartunnalta voidaan suojautua suojautumalla huolellisesti puutiaisten puremilta ja poistamalla iholle joutuneet puutiaiset välittömästi. (Oksi, Seppälä & Hytönen 2010, 254-255.)

5.2.3 PCR-diagnostiikka

Lymen borrelioosia aiheuttaa ryhmä geneettisesti eri lajeihin kuuluvia bakteereja, joita kuitenkin kutsutaan yhteisnimityksellä *Borrelia burgdorferi* sensu lato tai ainoastaan *Borrelia burgdorferi*. Yleensä PCR-menetelmiä käytettäessäkin on riittävä, kun tunnistetaan taudinaiheuttaja kuuluvaksi *B. burgdorferi*-ryhmään ilman että sitä tarvitsisi tunnistaa tarkemmin. *B. burgdorferi* sensu lato voidaan tunnistaa PCR:llä kopioimalla näytettä spesifisillä alukkeilla, joilla saadaan kopioitua osia konservoituneesta kromosomaalisesta flagelliinigeenistä (*flaB*). PCR:ssä käytettiin useita erilaisia alukkeita. Tämä menetelmä on kuvattu tuoreessa yhdysvaltalaisessa Floridassa ja Georgiassa toteutetussa tutkimuksessa (Clark, Leydet & Hartman 2013). Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia taudinaiheuttajia Lymen borrelioosin kaltaisissa taudeissa Floridassa ja Georgiassa. Tutkimuksessa *B. burgdorferi* tunnistettiin PCR-tutkimuksella yhdistettynä sekvensointiin. Tutkimuksessa käytettyjä näytteitä olivat seerumi, plasma, kokoveri, ihobiopsiat ja kuivatut veripisarot.

Toisessa yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa kuvatun menetelmän mukaan *B. burgdorferi* sensu lato voidaan tunnistaa myös monistamalla joukolla alukkeita kromosomaalista *p66*-geeniä, joka koodaa 66 kDa proteiinia. *B. burgdorferi* tunnistukseen voidaan käyttää myös esimerkiksi 31 kDa-kokoista ulompaa pintaproteiinia koodaavaa geeniä *ospA*. (Clark 2004.)

Positiivisen PCR-tuloksen saaminen ei välttämättä tarkoita, että potilaalla olisi käynnissä aktiivinen akuutti infektio. *B. burgdorferi* DNA:n löytyminen kertoo, että bakteeria on näytteessä, mutta se ei välttämättä ole enää elinkykyistä ja taudinaiheuttamiskykyistä. Eräässä 2013 julkaistussa tutkimuksessa (Iyer ym. 2013) viljeltiin *B. burgdorferi*-bakteeria maljoilla, joita käsiteltiin keftriaksoniantibiootilla. Tutkimuksessa todettiin että PCR-tulokset säilyvät positiivisina pitkään vielä antibioottilääkityksen jälkeenkin, vaikka bakteerit eivät olleet enää elinkykyisiä. Tutkimuksessa todettiin myös, että antibioottilääkityksen jälkeisiin positiivisiin PCR-tuloksiin ilman positiivista viljelytulosta tulee suhtautua harkitsevasti. Tutkimuksessa käytettiin *B. burgdorferi* havaitsemiseen perinteisellä PCR:llä ulompaa pintaproteiinia A (outer surface protein A) tuottavaa geeniä *ospA*. Menetelmässä käytetyt

olosuhteet ja alukkeet on kuvattu tutkimuksessa yksityiskohtaisesti. Monistuksen jälkeen PCR-tuote analysoitiin elektroforeesilla. Tutkimuksessa viljelmistä tutkittiin myös *B. burgdorferin* RNA:ta. RNA tutkittiin käyttäen käänteiskopiointi PCR:ta. cDNA-molekyylien havaitsemiseen käytettiin useita erilaisia spesifisiä alukkeita, joilla mitattiin neljän eri geenin transkriptiota viljelmissä. RNA-aktiivisuuden havaittiin laskevan antibioottikäsittelyiltä viljelmiltä nopeasti antibioottikäsittelyn jälkeen. DNA:ta havaittiin PCR:llä koko antibioottikäsittelyn jälkeisen havainnointiajan eli 56 vrk.

5.3 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis aiheuttaa ihmiselle sukupuoliteitse tarttuvan infektion. *C. trachomatis* on pieni solun sisäisesti lisääntyvä gramnegatiiviseksi värjäytyvä bakteeri. *C. trachomatiksen* soluseinä kuitenkin poikkeaa muiden gramnegatiivisten bakteerien soluseinäarakenteesta. *C. trachomatis* jaotellaan soluseinän pääproteiinin, MOMP:n (Major Outer Membrane Protein) antigeenisten ominaisuuksien ja geenisekvenssien perusteella yli 20 immuno- ja genotyyppiin. Genotyyppien A-K bakteerit kuuluvat trakoomabiotyyppiin ja L₁-L₃ kuuluvat lymfogranuloomabiotyyppiin. Klamydiabakteereille on ominaista niille tyypillinen lisääntymiskierto: solun ulkopuolella bakteerit ovat ulkoisia olosuhteita kestävässä infektiivisessä EB-muodossa (Elementary Body) ja solun sisällä ne puolestaan ovat ei-infektiivisessä, metabolisesti aktiivisessa RB-muodossa (Reticulate Body). (Puolakkainen & Paavonen 2010, 287-288.)

5.3.1 Infektio

Suomessa todettujen -tartuntojen määrä on lisääntynyt vuosi vuodelta 2000-luvun aikana. Tapauksia on vuosittain noin 14 000. Kuten muillekin sukupuolitaudeille, *C. trachomatis*-tartunnalle, voi altistaa seksuaalinen riskikäyttäytyminen, jota ilmenee erityisesti nuorilla ja päihteiden käyttäjillä. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 293; Kurkinen, Sarkkinen, Kärpänoja & Ranta 2006.)

Naisten klamydiainfektioista jopa 90 % on oireettomia tai niin vähäoireisia, että infektio jää toteamatta. Klamydiabakteerit kasvavat hitaasti soluissa saaden aikaan kroonisia tai piileviä infektioita. Klamydia ilmenee yleisimmin kohdunkaulan tulehduksena. Kohdunkaulan tulehdus on kuitenkin usein niin vähäoireinen, että sen toteaminen gynekologisen tutkimuksen yhteydessäkin on vaikeaa tai mahdotonta. Klamydia-infektio aiheuttaa myös virtsaputkitulehduksia, jotka ilmenevät virtsaamisen kivuliaisuutena. Infektio voi myös levitä sisäsynnyttiin, missä se aiheuttaa endometriitin tai munajohtimen tulehduksen tai molemmat, jolloin kyseessä on sisäsynnytintulehdus (PID). Vaikeissa tapauksissa PID voi levitä kuumeiseksi lantion alueen vatsakalvon tulehdukseksi tai pikkulantion märkäpesäkkeeksi. Vatsakalvon tulehdus voi levitä myös ylävatsan alueelle. Klamydiainfektio voi saada aikaan hedelmättömyyttä aiheuttamalla munajohdinvaurioita. Klamydiainfektion aiheuttamien kudosuutosten ja solujen toiminnallisten muutosten on todettu olevan kohdunkaulansyövän riskitekijä. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 293-295.)

Miehillä *C. trachomatis* voi aiheuttaa virtsaputkitulehduksia, jotka ovat yleisimmin oireettomia tai vähäoireisia. Joskus virtsaputkentulehdus voi levitä lisäkestulehdukseksi. Vastasyntyneet lapset voivat

saada klamydiainfektion altistuttuaan bakteerille synnytyskanavassa. Infektio ilmenee silloin sidekalvotulehduksena tai keuhkokuumeena. Jos äidin klamydiainfektio on jäänyt toteamatta raskauden aikana, lapsi altistuu infektiolle. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 294; Kurkinen ym. 2006.)

5.3.2 Diagnostiikka ja hoito

*C. trachomatis*en diagnostiikassa käytetään nykyään miltei ainoastaan nukleiinihappojen monistukseen ja osoitukseen perustuvia testejä. Näitä testejä on kaupallisesti saatavilla ja ne on todettu herkiksi ja tarkoiksi sekä viljelyä nopeammiksi. Nukleiinihappotestien etuna viljelyyn verrattuna on myös se, että näytteenä voidaan käyttää helposti saatavaa ensivirtsanäytettä ja bakteerien inaktivoituminen kuljetuksen aikana ei haittaa testin onnistumista. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 291.)

Klamydian aiheuttamissa genitaali-infektioissa näyte nukleiinihappotestia varten voidaan ottaa virtsaputkesta, kohdunkaulasta tai emättimestä tai testiin voidaan käyttää ensivirtsanäytettä. Sidekalvotulehduksissa näyte otetaan sidekalvolta. Pikkulapsilla näyte voidaan ottaa infektion laadusta riippuen silmän sidekalvolta tai keuhkotulehduksissa nenänielusta. Käytettäessä näytteenä virtsaa, tulee huolehtia etteivät bakteerit pääse kasvamaan kuljetuksen aikana ja tuhoamaan näytettä. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 290.)

Viljelyä varten otetut näytteet ovat herkempiä näytteen säilytyksen ja kuljetuksen suhteen. Näytteen kuljetuslämpötilan tulee olla riittävän alhainen ja näyte pitää toimittaa mahdollisimman nopeasti laboratorioon. Kun näytteen kuljetus on onnistunut, viljely on herkkä ja tarkka *C. trachomatis*-bakteerin osoitusmenetelmä. Viljelyvastauksen saamiseen menee kuitenkin useita päiviä, kun PCR-testillä vastaus saadaan paljon nopeammin. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 290-291.)

C. trachomatis-infektion ensisijaisena hoitona käytetään 1 gramman kerta-annosta atsitromysiinia suun kautta otettuna. Tämä hoito on helppo toteuttaa. Hoitoon voidaan käyttää myös erytromysiiniä. Koska infektio tarttuu sukupuoliteitse ja voi helposti uusiutua, on myös partnerin hoito tärkeää, vaikkei partnerilla olisikaan mitään oireita. Taudin leviämisen estämiseksi olisi tärkeää etsiä ja hoitaa kaikki partnerit. Hoitamattomana tauti voi levitä ja aiheuttaa komplikaatioita. (Puolakkainen & Paavonen 2010, 295; Kurkinen ym. 2006.)

5.3.3 PCR-diagnostiikka

Chlamydia trachomatis voidaan havaita reaaliaikaisella monikohde PCR-menetelmällä (MRT-PCR), jota voidaan käyttää rutiinidiagnostiikassakin *C. trachomatis*en tunnistamiseksi. Tällainen tutkimusmenetelmä on kehitetty ja validoitu sekä sitä kuvaava artikkeli on julkaistu 2006. Tässä PCR-menetelmässä käytetään yhdessä reaktiossa kolmea eri monistuskohtaa, kryptistä plasmidia, MOMP-proteiinia (major outer membrane protein) koodaavaa geeniä ja sisäistä kontrollia. Tällä menetelmällä voidaan yhdellä reaktiolla havaita ja varmistaa *C. trachomatis*en olo näytteessä, tunnistaa kaikki eri *C. trachomatis*en genotyypit, tunnistaa *C. trachomatis* ilman ristireaktioita muiden mahdollisesti näytteessä olevien bakteerien kanssa, tunnistaa *C. trachomatis* 95 % todennäköisyydellä jo

kolmesta MOMP-geenikopiosta ja yhdestä kryptisestä plasmidista sekä havaita monistusreaktion inhiboituminen. Menetelmällä pystyttiin tunnistamaan oikein kaikki tutkitut näytteet, joista osa oli positiivisia ja osa negatiivisia, ja tulokset oli vahvistettu COBAS Amplicor PCR:llä. Tämän menetelmän käyttäminen vähentää tulosten vahvistamisen tarvetta ja väärin negatiivisten määrää, mikä puolestaan vähentää tutkimusten vuorittamiseksi vaadittavaa työmäärää ja lyhentää tutkimusten valmistusaikaa. (Jalal ym. 2006.)

Tutkimuksella on tutkittu *C. trachomatis* PCR-näytteiden säilytysolosuhteiden vaikutusta DNA:n määrään näytteessä ja siten PCR-tulokseen. PCR-menetelmänä käytettiin edellä kuvattua reaaliaikaista PCR-menetelmää, jossa alukkeet sitoutuvat kryptiseen plasmidiin. Näytteitä säilytettiin kaksi vuotta eri lämpötiloissa huoneenlämmöstä -80 °C asti neljässä eri lämpötilassa. Näytteet analysoitiin kuusi kertaa säilytyksen aikana (0, 1, 7, 14 ja 30 vrk ja 2 vuotta). Käytettyjä näytteitä olivat emättimen pyyhkäisy-näytteet ja virtsa. Säilytysolosuhteilla ja ajalla ei ollut vaikutusta PCR-tuloksen positiivisuuteen, vaan pisimpäänkin säilytetyistä näytteistä voitiin havaita DNA:ta. Pidemmällä säilytysajoilla kynnyksarvon ylittymiseksi saatettiin tarvita useampia syklejä, mutta positiivinen tulos kuitenkin saatiin. (Dommelen ym. 2013.)

Jo pidempään käytössä olleiden PCR-menetelmien rinnalle on kehitetty ja tullut käyttöön nukleiinihappojen nopeaan spesifiseen tunnistukseen perustuvia menetelmiä. Italialaisessa yliopistossa on tehty tutkimus, jossa on verrattu kahta erilaista *C. trachomatis* diagnostiikassa käytössä olevaa menetelmää. Verrattavat menetelmät olivat BD ProbeTec ET System ja "in-house one tube nested PCR" eli ei-kaupallinen PCR-menetelmä, jossa suoritetaan kaksi peräkkäistä "sisäkkäistä" PCR-reaktiota. Jälkimmäisessä reaktiossa käytetään alukkeita, joilla monistetaan osia ensimmäisellä reaktiolla monistetusta alueista. (Molicotti, Usai, Cubeddu, Sechi & Zanetti 2013.) ProbeTec ET System on ensimmäinen reaaliaikainen menetelmä, joka perustuu DNA:n monistukseen ja havaitsemiseen ja *C. trachomatis* nopeaan tunnistukseen kliinisistä näytteistä. Monistuksen periaatteena on DNA-juosteiden homogeeninen pariuminen ja DNA:n ilmaisemiseen näytteestä käytetään fluoresenssisignaalia. (BD 2013.) Tutkimuksessa tutkittiin kaikkiaan 511 näytettä käyttäen molempia menetelmiä. Menetelmillä todetut positiiviset näytteet vastasivat hyvin toisiaan, mutta ProbeTec ET System -menetelmä oli hieman toista menetelmää herkempi. (Molicotti, Usai, Cubeddu, Sechi & Zanetti 2013.)

Epidemiologisiin selvityksiin voidaan käyttää *C. trachomatis* genotyypitystä. Tyypitystä voidaan monistamalla *omp1*-geeniä "nested" eli sisäkkäisellä PCR:llä. Tyypitystä voidaan tehdä myös RFLP-analyysillä (restriction fragment length polymorphism), DNA sekvensoinnilla, blottausmenetelmillä ja oligonukleotidisiruilla. *C. trachomatis* seksuaalivälitteisesti leviävien kantojen tyypitykseen voidaan käyttää reaaliaikaista nested PCR:ää (NRT-PCR). Tämä menetelmä on kuvattu tutkimuksessa, jossa oli selvitetty voiko kantoja tyypittää NRT-PCR:llä ja mikä on tämän menetelmän herkkyys verrattuna non-NRT-PCR-menetelmään (NNRT-PCR). NRT-PCR suoritettiin tekemällä kaksi peräkkäistä PCR-reaktiota. NNRT-PCR suoritettiin tekemällä vain jäljempi NRT-PCR:n PCR-reaktio pienin muutoksin. Tutkimuksessa tutkitut genotyypit olivat *C. trachomatis* genotyypit D-K ja kolme lymfogranuloosia aiheuttavaa genotyyppiä LGV I-III. Kantojen tunnistukseen käytettiin yhtätoista spesifistä

koetinta eli omansa kutakin genotyyppiä kohti. Näytteet monistettiin ensin käyttäen alukkeita, jotka monistivat *omp1* –geenin konservoituneita jaksoja ja kannat tunnistettiin toisessa PCR-reaktiossa koettimilla, jotka sitoutuivat *omp1* –geenin vaihteleviin jaksoihin. Tutkimuksessa näytteet tyyppitettiin sekä käyttäen NRT-PCR- että NNRT-PCR-menetelmää. Tutkimuksessa todettiin NRT-PCR:n olevan hyvä menetelmä *C. trachomatis* seksuaalivälitteisiä tauteja aiheuttavien kantojen genotyyppis-pesifiseen tyyppitykseen. Menetelmä pystyi havaitsemaan 95 % todennäköisyydellä *C. trachomatis* jo neljästä geenikopiosta reaktiota kohti. NRT-PCR:n myös havaittiin olevan herkempi tunnistamaan genotyyppijä verrattuna NNRT-PCR-menetelmään. NNRT-PCR tyyppitti vain 80 % genitaalinäytteistä ja 90 % peräsuolen pyyhkäisynäytteistä, kun NRT-PCR-menetelmä onnistui kaikkien näytteiden tyyppityksessä. Genotyypit oli varmistettu toisessa riippumattomassa laboratorioissa. (Jalal, Stephen, Alexander, Carne & Sonnex 2007)

5.4 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile on anaerobinen, grampositiivinen subterminaalisia itiöitä tuottava suora sauva-bakteeri (Jalava, Eerola, Lindholm, Meurman & Virolainen-Julkunen 2009, 248). Se on tavallisin antibioottihoitoon liittyvän ripulin aiheuttaja. Bakteeria on eristetty luonnosta sekä ihmisten ja eläinten ulosteesta. Se kuuluu suoliston normaaliflooraan jopa puolella terveistä vastasyntyneistä ensimmäisen ikävuoden aikana. Kantajuus vähenee nopeasti iän myötä. Bakteeri aiheuttaa tyyppillisesti sairaaloissa ripuliepidemioita. (Rautio 2010, 233-234.)

5.4.1 Infektio

C. difficile voi aiheuttaa ripulin tilanteessa, jossa suoliston muut mikrobit eivät ole rajoittamassa bakteerin kasvua. Tällöin bakteeri voi lisääntyä niin suureksi pitoisuudeksi, että sen aiheuttamat toksiniit saavat aikaan taudin. Taudin ajateltiin aikaisemmin olevan sisäsyntyinen eli endogeeninen ja pääsevän vallalle, kun suoliston normaalifloora on häiriintynyt antibioottihoitoon tai muun syyn vuoksi. Nykyisin on kuitenkin todettu *C. difficilen* leviävän myös itiönä ulosteesta suun kautta potilaalta toiselle tai hoitohenkilökunnan tai kontaminoituneen ympäristön välityksellä. (Rautio 2010, 234.)

Lisääntyessään ja kasvaessaan bakteeri pääsee stationaarivaiheeseen, missä se alkaa tuottaa muun muassa toksiineja A ja B. Ennen stationaarivaihetta *tcdC* -geeni repressoi toksiineja A ja B koodaavia geenejä. TcdA- ja TcdB-toksiineja koodaavat geenit sijaitsevat *C. difficilen* genomissa patogeenisuusalueella, PaLoc. Tähän alueeseen kuuluu toksiineja tuottavien geenien lisäksi toksiinien tuottoa sääteleviä geenejä kuten *tcdR*, *tcdC* ja *tcdE*. Hypervirulenteissa kannoissa, kuten esimerkiksi O27-ribotyypin hypervirulenteissa kannoissa, *tcdC* -geenissä on yhden emäksen suuruinen deleetio, joka tuottaa viallisen tcdC-säätelyproteiinin. Tämä saa aikaan toksiinigeenien aikaisemman transkription ja siten toksiinien moninkertaisen tuoton. Joillakin muilla PCR-ribotypeillä on havaittu muitakin yhden emäksen suuruisia tcdC-proteiinin inaktivoitumiseen johtavia mutaatioita. (Rautio 2010, 235; Jalava ym. 2009, 246-247.)

Jotkin kannat muodostavat primaaritoksiinien lisäksi binääritoksiinia. Binääritoksiinin tuottoa säätelevä geenialue, CDT locus, koostuu kahdesta alayksiköstä, joita koodaavat geenit *cdtA* ja *cdtB* sekä positiivinen säätelygeeni *cdtR*. Useimmilta kannoilta voidaan löytää ainakin osia tästä binääritoksiinia koodaavasta geenialueesta, mutta oleellisia osia kuitenkin puuttuu, niin ettei binääritoksiineja tuoteta. Pelkästään binääritoksiineja tuottavien bakteerien ei ole todettu aiheuttavan tautia. HYKS:ssa on todettu vuosien 2007-2008 tautitapausten perusteella, että 027-kantojen aiheuttama kuolleisuus ja ripulin uusiutumiskasvu on suurempi kuin muilla kannoilla. *C. difficile* aiheuttaman taudin vakavuus vaihtelee lievästä ripulista vakavaan, hengenvaaralliseen pseudomembranoottiseen suolitulehdukseen, johon voi liittyä toksinen megakoolon ja jopa suolen puhkeaminen. Suurin sairastumisriski on yli 65-vuotiailla ja immuunipuutteisilla henkilöillä. (Rautio 2010, 235; Jalava ym. 2009, 246-247.)

5.4.2 Diagnostiikka ja hoito

Diagnoosi perustuu yleensä bakteerin viljelyyn ja toksiinin osoitukseen, mikä voidaan tehdä joko suoraan ulosteesta tai eristetyistä bakteerikannasta. Viljelystä tekee haasteellisen *C. difficile* herkkyyks ja ulosteen runsas normaalifloora. Viljely tehdään selektiiviselle kasvualustalle, jonka antibiootit estävät useimpien normaaliflooran bakteerien kasvun. Maljoja kasvatetaan anaerobiolosuhteissa 2 vrk, minkä jälkeen *C. difficile* voidaan havaita kasvavan tyypillisenä reunoiltaan epätasaisena litteänä pesäkkeenä tuottaen tyypillistä hevosenlannan hajua. Pelkällä viljelyllä ei voida todeta kannan toksiinin tuottoa ja siten patogeenisuutta. Toksiinin osoitus perustuu usein entsyymi-immunologiaan. Nämä testit ovat usein kaupallisia, molempia toksiineja mittaavia sekä yksinkertaisia ja käteviä suorittaa. Toksiininosoitustestit on usein tarkoitettu tehtäväksi suoraan ulosteesta, eikä maljalle viljelystä kannasta. Toksiinigeenin osoitukseen viljelystä kannasta sopii paremmin PCR-testi. Vaikka viljely ja toksiinin osoitus onkin usein riittävä diagnoosin tekemiseen, epidemiologia selvityksiä varten on kehitetty PCR-menetelmiä. PCR-menetelmillä voidaan tyyppittää kantoja ja tunnistaa hypervirulentteja kantoja. PCR-menetelmien lisäksi kantoja voidaan tyyppittää pulssikenttä-elektroforeesilla eli PFGE:llä ja REA:lla, joka perustuu DNA:ta pilkkovien restriktioendonukleasientsyymien ja elektroforeesin käyttöön. (Rautio 2010, 235; Jalava ym. 2009, 247-250.)

Lievässä ripulitapauksissa tauti paranee, kun lopetetaan taudin laukaissut antibioottilääkitys. Vaikeita ripuleita voidaan hoitaa suun kautta vankomysiinillä tai metronidatsolilla. Tauti on kuitenkin herkkä uusiutumaan. Pahimmissa tapauksissa voidaan joutua tekemään kolektomia hengen pelastamiseksi. Myös ulosteen siirron on todettu olevan tehokas antibioottiripulin hoidossa. (Rautio 2010, 235.)

5.4.3 PCR-diagnostiikka

C. difficile voidaan tunnistaa PCR-menetelmillä, minkä lisäksi bakteerikannan ominaisuuksia, kuten toksiinintuottogeenejä voidaan tutkia tarkemmin PCR-menetelmillä. PCR-menetelmillä voidaan selvittää epidemioiden syntyä ja tyyppittää ja tunnistaa bakteerikantoja.

Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä voidaan tunnistaa *C. difficile* ulostenäytteistä potilailta, joilla epäillään olevan *C. difficile* aiheuttama infektio. 2011 julkaistun meta-analyysin mukaan *C. difficile* to-

teaminen reaaliaikaisella PCR-menetelmällä on hyvin herkkä ja spesifinen menetelmä *C. difficile*-infektion varmistamiseksi. Meta-analyysissä oli käyty läpi 19 eri tutkimusta, joissa oli verrattu PCR-menetelmää viljelymenetelmiin. PCR-menetelmän herkkyydeksi oli meta-analyysissä määritetty 90 % ja spesifisyydeksi 96 %. (Deshpande ym. 2011.)

Toksiinigeenit voidaan osoittaa PCR:llä ja näin todeta kannan olevan ainakin potentiaalisesti virulentti. Kantojen tunnistamiseen ja tyyppitykseen on kehitetty monia menetelmiä, kuten toksiinigeenien ja *tcdC*-geenin PCR ja tuotteen elektroforeesi, PCR-ribotyyppitys ja rep-PCR. Suomessa ainakin kolme yliopistotason laboratoriota tekee nopeaa *C. difficile* toksiinigeenien osoitukseen perustuvaa diagnostiikkaa. (Rautio 2010, 235; Jalava ym. 2009, 248, 250.)

PaLoc-geenien (mm. *tcdC*, *tcdR* ja *tcdE*) osoittamiseen sopivia perinteisiä ja reaaliaikaisia PCR-menetelmiä on kuvattu useita. PaLoc-alueen geenien monistus onnistuu normaalissa molekyylibiologiaa hyödyntävässä mikrobiologian laboratoriossa. Useiden eri *C. difficile*-kantojen PaLoc-alueen sekvenssi on määritetty. PCR-menetelmiä suunniteltaessa alukkeet on suunniteltu sijoittuvaksi alueelle siten, että yleisimmät geenien toimintaan vaikuttavat mutaatiot voidaan havaita. Isot alueella tapahtuneet deletiot on helppo todeta, yhden emäksen mutaatiot vaikeampi. Koska bakteerien genomit mutatoituvat jatkuvasti, eri PCR-menetelmien toimivuutta tulee tarkkailla jatkuvasti sekvenssianalytiikalla ja analysoimalla eri mutaatioita omaavia bakteerikantoja. (Jalava ym. 2009, 248.)

Perinteisesti *C. difficile*-kannat on luokiteltu PaLoc-alueensa perusteella eri toksinotyypeihin. Tässä toksinotyyppitykseksi kutsutussa menetelmässä koko bakteerin PaLoc-alue monistetaan usealla eri PCR:llä, minkä jälkeen reaktiotuotteet pilkotaan restriktioentsyymeillä ja analysoidaan geielektroforeesilla. Tämä menetelmä on merkittävä tyyppitysmenetelmä ja antaa paljon tietoa PaLoc-alueen rakenteesta. Se on kuitenkin varsin työläs ja hidas, minkä vuoksi sitä käytetäänkin vain muutamissa laboratorioissa maailmassa. (Jalava ym. 2009, 249.)

Suomessakin julkaistiin kuitenkin melko vasta uusi nopeampi menetelmä, jolla voidaan todeta osa virulenssiominaisuuksiensa osalta muuntuneista kannoista. Menetelmän tekniikka muistuttaa normaalia toksiinigeenien osoitusta multiplex-PCR:llä. PCR-alukkeet on kuitenkin valittu niin, että ne antavat toksiinigeenien lisäksi tietoa säätelygeenistä *tcdC* ja binääritoksiinigeeneistä CDT-alueella. Näillä menetelmillä saatujen tietojen yhdistäminen ribotyyppitystietoihin on osoittanut PaLoc- ja CDT-alueilla havaittujen mutaatioiden ja ribotyyppitystietojen korreloivan keskenään esimerkiksi 027-ribotyypin kannoilla. Näitä tietoja voidaan hyödyntää ainakin 027-ribotyypin nopeassa tunnistuksessa. Toksinotyyppitykseen ja PCR-ribotyyppitykseen verrattuna tällainen multiplex-PCR on helppo ja nopea suorittaa, joskaan se ei pysty havaitsemaan kaikkia mutaatioita. Menetelmässä osa informaatiosta perustuu ainoastaan olettamukseen, että näkyvät, isot mutaatiot ovat sidoksissa *tcdC*-geenin toiminnallisiin muutoksiin. Virhettä tässä 027-ribotyypin nopeassa tunnistuksessa voivat antaa jotkin toiset ribotyypit, jotka myös antavat positiivisen tuloksen tällä menetelmällä. Nämä kannat ovat kuitenkin Suomessa ainakin toistaiseksi harvinaisia, joten niillä ei ole käytännön merkitystä kliinisessä diagnostiikassa. (Jalava ym. 2009, 248.)

PCR-ribotyypitys on vakiintunut Euroopassa tärkeimmäksi *C.difficile* -kantojen tyyppitysmenetelmäksi. Ribotyypitys perustuu 16S ja 23S RNA-molekyylejä koodaavien geenialueiden välisen alueen monistamiseen spesifisillä PCR-alukkeilla. Näitä rRNA:ta koodaavia geenejä on useita *C. difficile* genomissa. Geenit sijoittuvat aina toisiinsa nähden samalla tavalla, mutta geenikopioiden määrä vaihtelee ja kopioiden välisessä etäisyydessä on eroja. Kun geenien välinen alue kopioidaan, saadaan eripituisia DNA-molekyylejä, jotka sitten voidaan havaita ja erotella geelielektroforeesilla. Elektroforeesilla saatu monistettujen DNA-molekyylien juosteprofiili on kyseisen bakteerikannan ribotyyppi. Erilaisia *C. difficile* ribotyyppijä on nykyisin tunnistettu yli 180. PCR-ribotyypitys on melko työläs ja hidas menetelmä ja sen heikkoutena on sen tuloksen riippuvaisuus käytetyistä olosuhteista, tekijän ammattitaidosta ja subjektiivisesta tulkinnasta. Jotta tulokset eri laboratorioiden kesken olisivat vertailukelpoisia, PCR-ribotyypitys vaatii avukseen laajan ribotyyppijä edustavan referenssikantakokoelman ja profiilikirjaston. Suomessa tyyppitystä tehdään THL:n laboratoriossa. Suomesta on löytynyt vuoteen 2009 mennessä yli 70 erilaista PCR-ribotyyppiä, joista noin 30 on tunnistettu aikaisemmin kansainvälisesti raportoiduiksi ribotyypeiksi. (Jalava ym. 2009, 249-250.)

Uutena hyvin erottelevana tyyppitysmenetelmänä on tullut käyttöön MLVA eli multilocus variable number tandem repeat –analyysi. Se perustuu bakteerin genomissa olevien toistosekvenssien määrittämiseen PCR:n ja geelielektroforeesin tai sekvensoinnin avulla. Menetelmästä saadaan tuloksena numeerinen arvo, joten eri laboratorioiden tuloksista saadaan hyvin vertailukelpoisia. Tämä menetelmä on käytössä Suomessakin THL:n laboratoriossa. (Jalava ym. 2009, 250.)

PCR-menetelmien luotettava käyttö patogeenisten kantojen tunnistuksessa vaatii alituista menetelmien päivittämistä. *C.difficile* virulenssin kannalta tärkeillä geenialueilla tapahtuu jatkuvasti muutoksia, joten sekvenssitietoja tulee täydentää ja käytettyjä alukkeita testata. (Jalava ym. 2009, 251.)

5.5 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis kuuluu mykobakteereihin, joiden yhteinen ominaisuus on niiden haponkestävyys. Tämä johtuu niiden soluseinämän erityisen suuresta rasvapitoisuudesta. Mykobakteerit ovat suoria tai hieman kaareutuvia, itiöttömiä ja liikkumattomia sauvabakteereja. Kooltaan ne ovat 0,2-0,6 x 1,0-10 µm. Mykobakteerit värjäytyvät useimmiten grampositiivisiksi. Mykobakteerien soluseinä on monikerroksinen ja siinä on pitkiä ja haarautuneita lipideihin luettavia mykolihappoja, jotka tekevät seinämästä vahvan, vahamaisen ja alkoholeja ja happoja kestävän. Paksu seinämä antaa mykobakteereille suojan myös fagosyyttisolujen soluja hajottavia tekijöitä vastaan. Mykobakteerit ovat ehdottoman aerobisia. Patogeeniset mykobakteerit, kuten *M. tuberculosis*, ovat viljelyssä hyvin hidaskasvuisia ja havaittavia pesäkkeitä ilmenee yleensä 2-6 viikossa. Mykobakteerit kasvavat 37 °C:ssa tai 31 °C:ssa. *M. tuberculosis* kasvaa parhaiten 6,4-7,0 pH:ssa. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 140-141.)

5.5.1 Infektio

M. tuberculosis tarttuu lähes poikkeuksetta hengitysteitse pisaratartuntana ja aiheuttaa tuberkuloosia. Tartuntaa levittää ihminen, jolla on keuhkoissaan bakteereja ysköksiin erittävä infektio. Yskiesä, puhuessa tai aivastaessa ilmaan leviää bakteereja sisältäviä hiukkasia, joista pienimmät voivat leijailta keuhkorakkuloihin asti. Bakteerit voivat säilyä hengissä kuivassa pölyssä, mutta eivät pääse sitten enää leijumaan keuhkoihin asti tartuntaa aiheuttamaan. Tuberkuloosipotilas on yleensä sitä vahvemmin tartuttava, mitä enemmän bakteereja voidaan havaita värjäyksessä. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 143-144.)

M. tuberculosis muodostaa infektiossa primaaripesäkkeitä tavallisimmin keuhkojen ala- ja keskiosiin. Jos tartunnan saanut henkilö on immuuni, voi tartunta rajoittua vain primaaripesäkkeisiin. Kun henkilö ei ole immuuni tai immuunipuolustus on heikentynyt, bakteerit voivat levitä keuhkoportin imusolmukkeisiin, jotka suurentuessaan voidaan havaita röntgenkuvalla. Alkuperäinen infektio kohta yhdessä imusolmukkeiden kanssa muodostaa primaarikompleksin, jonka muodostumiseen voi kulua useita viikkoja ilman mitään oireita. Primaarikompleksi voi levittää etäpesäkkeitä muihin elimiin. 90 %:lla potilaista infektio jää ikuisesti piileväksi, vain 10 % sairastuu elämänsä aikana. Muutama prosentti tartunnan saaneista saa infektion alkuvaiheessa oireita aiheuttavan taudin. Oireellinen infektio voi syntyä paikkoihin, joihin on muodostunut etäpesäkkeitä tai voi kehittyä tuberkuloottinen aivokalvontulehdus tai yleistynyt tauti eli miliairituberkuloosi. Myöhäistuberkuloosi voi kehittyä jopa vuosikymmeniä tartunnan jälkeen piilevistä pesäkkeistä aktivoituneista bakteereista. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 144.)

Tuberkuloosiin sairastuneet ovat usein jollain tavoin immuniteetiltaan heikentyneitä. Sairastumisalttiutta lisäävät esimerkiksi alkoholismi, diabetes, aliravitsemus, HIV-infektio ja AIDS. Vanhoilla ihmisillä immuunijärjestelmä on heikentynyt iän myötä, minkä seurauksena tauti voi puhjeta. Myös vastasyntyneet voivat saada vakavia tautimuotoja. Joskus *M. tuberculosis* aiheuttaa taudin myös aiemmin täysin terveessä ihmisessä. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 144-145.)

Tuberkuloosia vastaan kehitetty BCG-rokote (*Bacillus Calmette-Guérin*) sisältää eläviä heikennettyjä naudan *M. bovis* tuberkuloosibakteereja. Suomessa BCG-rokote on annettu ennen yleisesti, mutta nykyisin se annetaan vain riskiryhmiin kuuluville vastasyntyneille ja aiemmin rokottamattomille alle seitsemänvuotiaalle riskiryhmiin kuuluville lapsille. Rokotteen haittavaikutuksena voi olla luutulehdus ja rokotteen teho on kiistanalainen. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 145.)

5.5.2 Diagnostiikka ja hoito

Mykobakteeri-infektioissa diagnostiikka perustuu värjäykseen, viljelyyn ja geenimonistukseen. Perinteisen diagnostiikan ongelmana on hitaus. *M. tuberculosis* kasvaa viljeltynä hyvin hitaasti. Nopeana tunnistusmenetelmänä on säilynyt näytteestä tehtävä happovärjäys. Värjäyksellä voidaan havaita näytteestä mykobakteerit, jotka ovat haponkestäviä. Värjäykseen sisältyy värikäsittelyn jälkeinen happo-alkoholikäsittely, joka huuhtoo värin pois muista kuin haponkestävistä bakteereista. Värjäyk-

sessä voidaan käyttää tavallisia tai fluoresoivia väriaineita. Fluoresoivilla väriaineilla näytteen tarkastelu helpottuu ja nopeutuu. Värjäyksen herkkyys on kuitenkin huono ja diagnoosin tekoon tarvittava bakteerimäärä on suuri. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 141.)

Viljely on menetelmänä paljon herkempi kuin värjäys. Hidaskasvuiset mykobakteerit voivat jäädä kuitenkin viljelmän kasvaessa normaaliflooran bakteerien alle, ellei näytteessä olleita normaaliflooran bakteereja dekontaminoida ennen viljelyä. Pesäkkeiden muodostuminen vie aikaa 2-6 viikkoa, minkä jälkeen voidaan tehdä alustava luokittelu kasvunopeuden, ja -lämpötilan, pesäkemorfologian ja värinmuodostuksen perusteella. Tarkempi lajinmääritys tehdään geeniteknisillä menetelmillä. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 141-142.)

Lajimäärityksen voi tehdä kaupallisten geenikoettimien avulla. Lajinmäärityksen voi tehdä myös 16S-rDNA-sekvenssin määrityksen avulla. Samaan mykobakteerilajiin kuuluvien kantojen keskinäistä sukulaisuutta voi tutkia geneettisillä sormenjälkitekniikoilla. RFLP-menetelmä (restriction fragment length polymorphism) on laajimmin käytetty ja parhaiten standardoitu tuberkuloosibakteerin tunnistuksessa käytetty menetelmä. Tämä on kuitenkin melko hidas menetelmä. Sen rinnalla voi tehdä esimerkiksi spoligotyypitystä ja MIRU-VNTR-määritystä, mitkä ovat nopeampia menetelmiä. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 142.)

PCR-tekniikkaa voidaan käyttää mykobakteerin osoitukseen suoraan näytteestä. PCR:llä löytyy tuberkuloosibakteeri miltei aina, kun on kyseessä värjäyspositiivinen näyte. PCR-menetelmällä voidaan nopeasti todeta onko värjäyksessä havaittu mykobakteeri *M. tuberculosis* vai jokin ei-tuberkuloottinen mykobakteeri. PCR-menetelmiä voidaan käyttää myös todennettaessa muualla kuin keuhkoissa sijaitseva tuberkuloosi-infektio. Keuhkoista tuberkuloosi on helpompi diagnosoida kuin muualta kehosta. Positiivinen PCR-tulos on merkittävä, mutta negatiivisella tuloksella ei voida kuitenkaan täysin sulkea pois tuberkuloosin mahdollisuutta. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 142.)

Tuberkuloosi-infektio voidaan todeta myös gammainterferonitesteillä. Testit perustuvat tuberkuloosibakteerien immunogeenisten proteiinien aikaan saamaan T-soluvasteeseen. Testeillä voidaan mitata gammainterferonia, jota muodostuu T-solujen tunnistaessa tuberkuloosibakteerien proteiinia. Myös T-solujen määrää voidaan laskea. Tämän menetelmän väärän negatiivisen tuloksen voivat kuitenkin aiheuttaa potilaan vakava immuunivaje tai erittäin vaikea tuberkuloositauti. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 142.)

Tuberkuloosin hoidossa ei ole riittävää apua tavallisista antibiooteista. Taudin hoitoon on olemassa kuitenkin tehokkaitakin lääkeyhdistelmiä. Hoito kestää yleensä vähintään kuuden kuukauden ajan. Jotkin tuberkuloosibakteerikannat ovat kehittäneet resistenssiä joitakin lääkkeitä, vähintään rifampisiinia ja isoniatsidia vastaan. XDR-tuberkuloosibakteerit ovat kehittäneet resistenssiä vielä useammille lääkkeille. Tällöin hoitoon tarvitaan tavallisuudesta poikkeava tehokas lääkeyhdistelmä, tarkka ja riittävän pitkä eristys ja pitkä lääkehoito vielä senkin jälkeen, kun ysköksissä ei havaita bakteereja. (Soini, Liippo & Vasankari 2010, 142.)

5.5.3 PCR-diagnostiikka

PCR-tekniikoilla voidaan tunnistaa *Mycobacterium tuberculosis* ja selvittää epidemioita sekä tunnistaa ja tyypittää erilaisia kantoja. Erityisen tärkeää on pystyä tunnistamaan monille mikrobilääkkeille resistentit bakteerikannat. Näitä tutkimalla voidaan ehkäistä niiden leviämistä, saada potilaille oikeanlainen hoito ja ymmärtää kantojen antibiootiresistenssin toimintamekanismeja. Tuberkuloosin erilaisista diagnosointimenetelmistä on julkaistu lukuisia tutkimuksia. *M. tuberculosis* tunnistetaan useiden erilaisten kaupallisten ja ei-kaupallisten PCR-menetelmien avulla. Myös bakteerin antibioottilääkeresistenssi voidaan havaita lukuisien erilaisten molekyylibiologisten, usein PCR-menetelmiin perustuvien, menetelmien avulla. Kiinalaisen systemaattisen tutkimuksen ja meta-analyysin mukaan PCR-yksijuoste-konformaatio polymorfismi menetelmä (PCR-single-strand conformational polymorphism method) on herkkä ja spesifinen menetelmä rifampisilliiniresistentin *M. tuberculosisin* havaitsemiseen. Menetelmän sovellettavuus tällä hetkellä on kuitenkin hyvin rajoittunutta eikä sitä ole saatavilla kaupallisesti. Tälläkään menetelmällä ei voida korvata perinteistä viljelyä ja lääkeherkkyystestauksia. (Xu, Jiang, Sha, Li & Xiao 2010.)

Eräällä tutkimuksessa oli tutkittu, mikä menetelmä voisi olla edullinen ja tehokas menetelmä keuhkotuberkuloosin havaitsemiseen ja seulomiseen sekä multiresistenssien tuberkuloosikantojen tunnistamiseen Itä-Euroopan ja Venäjän vankiloissa. Näillä alueilla esiintyy paljon multiresistenttiä tuberkuloosia, joten on tärkeää saada tartunnan saaneet selville ja hoitoon leviämisen estämiseksi. Vankiloissa luonnollisesti menetelmän tulee olla edullinen ja tehokas. Tutkimuksella oli verrattu keskenään kahdeksaa erilaista strategiaa tuberkuloosin seulomiseksi. Käytettyjä menetelmiä yhdistettynä tai itsekseen olivat itsearviointi, oireiden seulonta, MMR (mass miniature radiography) ja ysköksen PCR-tutkimus. PCR-tutkimuksena käytettiin Xpert MTB/RIF –menetelmää, joka tunnistaa *M. tuberculosisin* ja bakteerin multiresistenttiydestä kertovan rifampisilliiniresistenttiyden. Tutkimuksessa todettiin ysköksen PCR-tutkimuksen olevan nopea, tehokas ja myös kustannustehokas menetelmä tuberkuloosin seulontaan ja sen multiresistenttien kantojen tunnistamiseen. Tätä PCR-menetelmää pidettiin parhaana seulontamenetelmänä. Tutkimusjakson aikana saatiin seulontojen avulla sekä tuberkuloosin että multiresistentin tuberkuloosin esiintyvyyden vankiloissa laskemaan. (Winetsky ym. 2012.)

Kaupalliset NAA-testit (nuclein acid amplification test) eli nukleiinihappojen monistustestit ovat yleisesti spesifisiä *M. tuberculosisin* havaitsemisessa, mutta viljelyyn verrattuna epäsensitiivisiä menetelmiä. Viljely menetelmänä on kuitenkin hidas. Indonesiassa toteutetulla tutkimuksella on vertailtu reaaliaikaista IS6110-PCR-menetelmää mikroskopointiin ja viljelyyn tuberkuloottisen meningiitin diagnostiikassa. Tutkimuksessa tutkittiin meningiittidiagnosoitujen potilaiden aivoselkäydinnesteestä otetut näytteet reaaliaikaisella PCR-menetelmällä, joka perustui *M. tuberculosisin* kompleksille spesifisten IS6110-toistojaksojen monistukseen. Näytteistä tutkittiin myös solut, proteiinit ja glukoosi sekä tehtiin mykobakteeriviljely, värjäys ja kryptokokkimääritys. Tutkimuksessa todettiin IS6110-PCR:n olevan herkkä ja spesifinen menetelmä tuberkuloottisen meningiitin havaitsemiseksi ja voivan nopeuttaa diagnoosin saamista ja siten hoidon aloitusta. (Chaidir ym. 2012.)

Tuberkuloosin aiheuttamia epidemioita voidaan selvittää ja alkuperäistä tartunnanaiheuttajaa etsiä selvittämällä ilmenneiden tartuntatapausten aiheuttajabakteerien kantojen identtisyttä. Pirkkalassa vuonna 2008 ilmenneessä tuberkuloosiepidemiassa etsittiin tartuntojen alkuperäistä lähdettä ja selvitettiin tapausten yhteenkuuluvuutta. Bakteerikantojen identtisyys varmistettiin THL:n laboratoriossa MIRU-VNTR-analyysillä, joka hyödyntää PCR:ää. Tällä pystyttiin varmistamaan tapausten sama alkuperä ja yhteenkuuluvuus ja varmistamaan alkuperäisestä tartunnan lähteestä ja epidemian leviämistä. (Valve ym. 2011.)

5.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus on tavallisin ihmisen märkäbakteeri ja merkittävä taudinaiheuttaja, joka aiheuttaa infektioita sekä perusterveille, että toimintakyvyltään heikentyneille ihmisille. Monet kantavat oireettomina *Staph. aureusta* ajoittain etenkin nenässä tai nenänielussa, iholla tai joskus myös emättimessä, välilihan tai peräsuolen alueella. Bakteeri voi levitä muualle iholle tai limakalvolle kosketus- tai aerosolitartuntana. Terve iho ja limakalvot toimivat hyvin tartuntasuojana, mutta vaurioituneesta bakteeri voi levitä syvempiin kerroksiin ja aiheuttaa paikallisen ja edelleen leviessään syvemmän tai yleistyneen infektion. Mikroskooppisesti *Staph. aureus* havaitaan yksin, pareittain tai pieninä ryppäinä kasvavana grampositiivisena kokkibakteerina. (Vuopio-Varkila, Kuusela & Kotilainen 2010, 83.)

5.6.1 Infektio

Tyypillisiä *Staph. aureuksen* aiheuttamia infektioita ovat märkäiset iho- ja pehmytkudosinfektiot, leikkaushaava-, luu- ja nivelinfektiot sekä vakavat yleisinfektiot kuten sepsis ja endokardiitti. Lievempiä ihoinfektioita ovat follikuliitti eli karvatuppitulehdus ja furunkuloosi eli paisetauti, joka syntyy follikuliitin leviessä laajemmalle ympäröidään kudokseen. Myös pikkulapsilla yleinen märkärupi on yleisimmin *Staph. aureuksen* aiheuttama. Yleistä on myös *Staph. aureuksen* aiheuttama selluliitti sekä mastiitti eli rintatulehdus. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86-87.)

Vakavampia infektioita ovat bakteremia ja sepsis. Useimmiten bakteremia on seurausta paikallisesta infektiosta. Tartuntareittinä voivat olla verisuonikanyylit ja invasiiviset toimenpiteet. Verisuonikanyylit tulisivin poistaa heti kun niitä ei enää tarvita. *Staph. aureuksen* aiheuttama sepsis alkaa usein korkealla kuumeella ja vilun väräillä, ja voi olla rajuoireinen sekä nopeasti etenevä, jolloin voi pian ilmaantua vakavan yleisinfektion oireita. Sepsiksen seurauksena voi kehittyä muun muassa septinen sokki, aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymä, metastaattisia infektiopesäkkeitä sisäelimiin tai endokardiitti eli sydämen sisäkalvon tulehdus. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 87-88; Huttunen, Syrjänen & Vuento 2013)

5.6.2 Diagnostiikka

Staph. aureus erotetaan muista stafylokokeista koagulaasireaktion perusteella. Bakteeri hyydyttää plasman kasvaessaan koeputkessa plasman läsnä ollessa. *Staph. aureusta* lukuun ottamatta ihmisen stafylokokit ovat koagulaasinegatiivisia. *Staph. aureus* muodostaa kasvaessaan yleisimmin väriltään

keltaisia pesäkkeitä. Viljelyissä saatetaan havaita pienipesäkkeisiä SCV-variantteja (small colony variants), joiden resistenssi antibiootteja vastaan on usein lisääntynyt. SCV-varianttien pesäkkeiden tunnistus *Staph. aureukseksi* voi olla vaikeaa niiden epätyypillisen näköisten ja kokoisten pesäkkeiden vuoksi. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 83-84.)

Staph. aureus on tyypillinen grampositiivinen kokki, jonka soluseinän päärakennusaineina ovat peptidoglykaani ja teikkohapot. Peptidoglykaaniin sitoutuu monia *Staph. aureukselle* tyypillisiä seinämäproteiineja, jotka saavat ihmisessä aikaan luonnollisen immunitietin ja tulehdusreaktion. Tämän vuoksi suurin osa *Staph. aureus*-kannoista suojaakin seinämäproteiininsa polysakkaridien muodostamalla kapselilla. Syvässä infektiossa elimistö muodostaa mitattavissa olevia vasta-aineita *Staph. aureuksen* antigeneja kohtaan. *Staph. aureuksella* on pinnallaan adhesiineja, joilla se voi paremmin tarttua elimistön solujen ja rakenteiden pintaan. Adhesiinit voivat myös suojata bakteereja elimistön puolustusreaktioilta. *Staph. aureus* tuottaa monia eksoentsyymejä ja toksiineja. Nämä ovat tärkeitä stafylokokin taudinaiheuttamiskyvylle. Hemolysiinit hajottavat etenkin elimistön punasoluja useilla eri mekanismeilla. Panton-Valentine leukotoksiini eli leukosidiini (PVL) on läheinen sukulainen μ -hemolysiinille. PVL:n tuotanto liittyy nuorilla aikuisilla esiintyviin furunkulooseihin ja hemorragisiin keuhkokuumeisiin sekä joidenkin tiettyjen MRSA-kantojen aikaan saamiin syviin ihoinfektioihin ja paiseisiin. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 84-86.) PVL:a koodaava geeni voidaan havaita PCR-tekniikan avulla (Huslab 2013).

Staph. aureus voi tuottaa superantigeneina toimivia eksotoksiineja, jotka voivat kiinnittyä suoraan T-solun reseptoriin, mikä johtaa laajaan T-solujen aktivaatioon. *Staph. aureuksen* tuottamia superantigeneja ovat TSST-1, joka aiheuttaa toksisen sokkioireyhtymän, sekä joukko enterotoksiineja. Enterotoksiinit voivat aiheuttaa ruokamyrkytyksiä. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86.)

Staph. aureukselle on tyypillistä sen genomiin liittyvät siirtyvät genomien osat. Näitä ovat esimerkiksi bakteriofagiperäinen DNA ja patogeenisuusaarekkeet. Bakteriofaagien avulla perimään voi siirtyä esimerkiksi PVL-geeni. Patogeenisuusaarekkeet puolestaan ovat pidempiä DNA-jaksoja, jotka voivat sisältää useita geenejä, jotka ovat resistenssin ja virulenssin kannalta tärkeitä. Jaksoille tyypillistä on niiden molemmissa päissä olevat alueet, joiden avulla ne voivat liittyä genomiin. Kliinisesti erityisen tärkeä patogeenisuusaareke on SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*), joka on metisilliiniresistenteille kannoille leimallinen. Tärkein geeni saarekkeessa on muuttanutta peptidoglykaanin synteesin entsyymiä koodaava geeni *mec*. Muuttanut entsyymi, PBP2A tekee bakteerisolut resistentiksi stafylokokkipenisilliineille, kefalosporiineille ja karbapeneemeille. Rakenteen perusteella SCC*mec*-saarekkeet voidaan jaotella eri tyyppeihin, mitä käytetään hyödyksi MRSA-kantojen epidemiologisessa tyyppityksessä. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 86.)

5.6.3 MRSA eli metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*

Staph. aureus on kehittänyt resistenssiä kaikille kliinisessä käytössä oleville mikrobilääkeryhmille. Yli 80 % kaikista *Staph. aureus*-kannoista on resistenttejä tavalliselle penisilliinille tuottamansa penisilliiniä hajottavan beetalaktamaasi-entsyymin ansiosta. Stafylokokkipenisilliinit (beetalaktamaasia kes-

tävät penisilliinit), kuten kloksasilliini, ovat kuitenkin tehokkaita näitä bakteereja vastaa. Osa kannoista on kuitenkin stafylokokkipenisilliineillekin resistenttejä. Silloin kyseessä on metisilliiniresistentti *Staph. aureus*. MRSA-kannat ovat penisilliinien lisäksi resistenttejä myös kaikille muille beetalaktamiantibioteille sisältäen kefalosporiinit ja karbapeneemit. Resistenssi perustuu bakteerin ilmentämään *mecA*-geeniin, joka koodaa soluseinään muodostuvaa muuttunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia. MRSA:n *mecA*-geeni pystytään tunnistamaan ja kopioimaan PCR-tekniikan avulla. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 89-90; Huttunen, Syrjänen & Vuento 2013.)

MRSA-kannat ovat lisääntyneet viime vuosina nopeaa tahtia monissa maissa. Suomessa ja muissa Pohjoismaissa tilanne on vielä verrattain hyvä, joskin tapausten määrä on huomattavasti lisääntynyt. Vuonna 2012 uusia tapauksia ilmoitettiin 1280 (Jaakola ym. 2013). Usein tapauksissa on kyseessä oireeton kantajuus, mutta myös vakavien infektioiden määrä on huolestuttavasti kasvanut. MRSA aiheuttaa sairaalaperäisiä leikkaushaava- ja luuinfektioita sekä septisiä yleisinfektioita. MRSA:n aiheuttamat infektiot ovat oireiltaan ja taudinkuvaltaan melko samanlaisia kuin "tavallisen" *Staph. aureuksen* aiheuttamat infektiot, mutta niiden hoito on vaikeampaa niiden antibioottiresistenttyyden vuoksi. MRSA saattaa myös levitä sairaalaloissa nopeasti ja aiheuttaa epidemioita. Tartunnan saanut henkilö saattaa jäädä oireettomana tartunnan kantajaksi vuosikausiksi ja levittää tietämättään tartuntaa eteenpäin sairaalassa tai muualla. Yleisimmin MRSA leviää sairaaloissa henkilökunnan käsien mukana. Tämän vuoksi on tärkeää huolehtia eristyksestä ja hyvästä käsihygieniasta. Vaikka terveydenhuollon henkilökunta usein levittää tartuntaa, he eivät silti itse saa juurikaan MRSA-infektioita, sillä heillä ei ole infektiolle altistavia sairauksia. Vaikka MRSA-tartunta on useimmiten sairaalaperäinen, se voi syntyä myös avohoidossa. Tyypillisesti tällöin on kyseessä iho- tai pehmytkudosinfektio. Näitä infektioita aiheuttavien MRSA-kantojen ominaisuudet ovat yleensä erilaisia kuin sairaalaperäisillä kannoilla. Avohoitokannat ovat usein mikrobilääkeherkempiä kuin sairaalakannat. Näiltä avohoitokannoilta löytyy usein PVL-geeni. MRSA-tartunnat täytyy ilmoittaa tartuntatautilain mukaisesti THL:n kliinisen mikrobiologian laboratorion tartuntatautirekisteriin ja MRSA-kanta tulee lähettää sairaalainfektiolaboratorioon jatkotyyppitystä varten. (Vuopio-Varkila ym. 2010, 90-91; Huttunen, Syrjänen & Vuento 2013.)

5.6.4 PCR-diagnostiikka

Staphylococcus aureuksen tunnistamiseen käytetään perinteisiä menetelmiä. *Staph. aureuksen* diagnostiikassa PCR-menetelmiä käytetään lähinnä resistenssi ja virulenssiominaisuuksien todentamiseen esimerkiksi MRSA:n tunnistamiseksi. Lisäksi löydetty kanta pystytään tyyppittämään PCR-tekniikkaa apuna käyttäen. (Huttunen, Syrjänen & Vuento 2013.)

PCR-menetelmillä voidaan tunnistaa metisilliiniresistentti *Staph. aureus* eli MRSA nopeammin kuin perinteisillä viljelyyn perustuvilla menetelmillä. PCR:llä monistetaan SCC mec kasetti-alueetta, joka sisältää *mecA*-geenin, joka on MRSA:n tunnistusgeeni ja *orfX*:n, joka on tyypillinen *Staph. aureuselle*. Kaupallisesti saatavilla on useita MRSA:n tunnistukseen pystyviä PCR-testejä. Näitä ovat muun muassa BD GeneOhm MRSA Assay, Xpert MRSA Assay ja Roche LightCycler MRSA Advanced. Systemaattisessa tutkimuksessa on tutkittu tällaisten MRSA-pikatestien kliinisiä vaikutuksia sairaalapotiti-

laiden keskuudessa. Tutkimuksessa on tutkittu PCR-menetelmän käytön vaikutuksia MRSA:n seulonnassa verrattuna kromogeenisen agarin käyttöön sekä mitä eroja on kun käytetään PCR-seulontaa tai ei käytetä seulontaa lainkaan. Kliinisiä vaikutuksia arvioitiin muun muassa infektioluvuilla, eristyspäivien lukumäärillä ja infektioiden leviämällä. Tutkimuksessa todettiin PCR-seulonnan lyhentävän tutkimusten valmistumisaikaa ja vähentävän tarvittavien eristyspäivien lukumäärää. Nopeammin saatu MRSA-seulontavastaus myös vähentää infektoituneiden potilaiden kontaktien määrää ja siten vähentää MRSA-tartuntojen leviämistä. (Polisena, Chen, Cimon, McGill, Forvard & Gardam 2011.)

Myös toisessa uudemmassa tutkimuksessa oli vertailtu PCR-menetelmän ja kromogeenisen agarin käyttöön perustuvan menetelmän eroja MRSA:n seulonnassa. Vertailtavana oli kromogeenisen agarin lisäksi kaksi kaupallista PCR:n perustuvaa menetelmää. Tutkimuksen mukaan luotettavin tapa MRSA:n seulontaan ja havaitsemiseen on käyttää PCR-menetelmää yhdistettynä viljelyyn kromogeeniselle agarille. PCR:n etuna on sen nopeus. (Aydiner ym. 2012.)

PVL-geenin sisältäviä *Staph. aureus* -kantoja on sekä MRSA-kannoissa että MSSA-kannoissa. PVL-geenin löytymisen on todettu olevan usein tyypillinen avohoidosta löytyneille MRSA-tapauksille. (Vuopio-Varkila ym. 2010.) PVL-geeni tuottaa Panton-Valentinen leukosidiinia, joka on huokosia muodostava kaksikomponenttinen toksiiini, joka aiheuttaa neutrofiilien hajoamista. PVL-geeni todetaan kopioimalla sitä PCR:llä. PVL-geenin merkitys infektion vakavuudelle esimerkiksi vakavissa MRSA:n tai MSSA:n aiheuttamissa ihoinfektioissa on ollut kiistanalaista. Tutkimuksella on kuitenkin voitu vastikään todeta, ettei PVL-geenin löytyminen ole ensisijainen infektion vakavuutta määrittävä seikka. (Tong ym. 2012.)

6 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyöni aiheena on PCR kliinisessä bakteriologiassa. Käsittelen tässä työssä polymeerasiketjureaktiota eli PCR:ää ja sen hyödyntämistä kliinisen mikrobiologian bakteriologisissa tutkimuksissa. Käsittelen aihetta teoreettisesti lähdeaineistojen pohjalta.

Opinnäytetyöni tarkoituksena on luoda katsaus käytössä oleviin molekyylibiologian PCR-tekniikkaan pohjautuviin kliinisen mikrobiologian bakteriologiisiin laboratoriotutkimuksiin ja tutkimusmenetelmiin. Tarkoitukseni on tehdä työ, joka käsittelee kattavasti käytössä olevia tutkimuksia ja menetelmiä. Työn tulisi kuitenkin olla helposti ymmärrettävä, jotta se palvelisi muita opiskelijoita tiedonhaussa. Työ voisi olla pohjamateriaalina ja tietopakettina opiskelijoille, jotka opinnäytetyönään työstäisivät PCR-pohjaista menetelmää Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman mikrobiologian ja molekyylibiologian sekä geenitekniologian opetuskäyttöön. Tämän työn avulla toiset opiskelijat voivat saada hyvät mahdollisuudet uuden menetelmän sisäänajoon.

Käsittelen työssäni kliinisesti tärkeimmiksi arvioimiani PCR-menetelmiin pohjautuvia laboratoriotutkimuksia. Olen koostanut tietoa kunkin tutkimuksen kohteena olevasta bakteerista ja sen aiheuttamista infektioista. Teoriaosio sisältää tietoa myös tutkimusten näytteistä, näytteenkäsittelystä, tutkimusmenetelmistä sekä tutkimusten eduista, vahvuuksista ja heikkouksista.

Opinnäytetyöni on kehittämistyö, jonka tuotoksena teen taustatyöni pohjalta posterin, johon kokoan tärkeimmät asiat polymeerasiketjureaktiosta ja sen hyödyntämisestä kliinisessä bakteriologiassa. Tavoitteena on tehdä posterin, jonka välityksellä voidaan lisätä etenkin bioanalytiikan opiskelijoiden tietoja PCR:stä ja sen käytöstä. Posterin avulla opinnäytetyön sisältöä saadaan helposti saavutettavaan ja omaksuttavaan muotoon. Posterin asetetaan sitten nähtäville Savonia-ammattikorkeakoulun Kuopion terveysalan yksikköön siten, että etenkin bioanalytiikan ja muut terveysalan opiskelijat voivat esimerkiksi välituntiansa aikana tutustua posterin sisältöön ja oppia perusteita PCR:stä ja sen käytöstä bakteriologiassa. Työni tavoitteena on lisätä opiskelijoiden ja muiden Savonia-ammattikorkeakoulun tiloissa kulkevien tietoisuutta PCR:stä ja sen hyödyntämisestä bakteriologiassa.

7 TYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyöni on kehittämistyö, jonka tuotoksena on posterit PCR:stä ja sen käytöstä kliinisessä bakteriologiassa. Kehittämistyö on toiminnallinen työ, joka voi olla esimerkiksi tapahtuman järjestäminen, taideteke, liiketoimintasuunnitelma tai tuotteen suunnittelu ja rakentaminen. Kehittämistyö muodostuu yleensä kahdesta osasta: kehitettävästä tuotteesta tai tapahtumasta ja prosessia kuvaavasta kirjallisesta raportista. Kehittämistyössä opinnäytetyön tuotoksena voidaan esitellä esimerkiksi uusi työväline. Sen tuottamisen prosessi esitellään kirjallisesti sen mukaan miten kehittämishanke tai tuotos on suunniteltu, toteutettu ja arvioitu. Raportissa esitetään myös työn lähtökohtana oleva tietoperusta. (Liukko 2012.) Opinnäytetyöraporttini muodostuu suurelta osin posterin koostamisen pohjana olevasta teorian tiedosta. Teorian tiedon etsiminen ja kokoaminen on ollut merkittävä osa kehittämistyöprosessiani.

7.1 Ideointi, suunnittelu ja tiedonhaku

Työn ideointi lähti liikkeelle sopivan aiheen valinnasta ja rajaamisesta oman mielenkiinnon pohjalta pohtien yhdessä oman alan opettajien kanssa. Ajatuksena oli tehdä posterit jostain bioanalytiikan alaan kuuluvasta aiheesta. Olen ollut aina kiinnostunut luonnontieteistä, kemiasta, biologiasta ja biokemiasta. Ammattikorkeakouluopinnoissa mielenkiinnon kohteeksi on noussut mikrobiologia. Näiden mielenkiinnon kohteiden pohjalta aihe muotoutui. Voidakseni rajata aihetta tarkemmin, hain alustavasti tietoa polymeerasiketjureaktiosta eli PCR:stä ja erilaisista PCR-menetelmistä. Tein tiedonhakuja useista eri tieteellisistä tietokannoista kuten Medic:stä ja Cochranesta. Etsin myös Savonia-ammattikorkeakoulun kirjastosta aiheeseen liittyvää kirjallisuutta. Hain kirjallisuutta PCR:stä ja mikrobiologiasta. Pyrin käyttämään ajantasaista ja mahdollisimman luotettavaa tietoa. Pyrin olemaan kriittinen löytämäni tiedon suhteen ja käytin vain luotettavaksi arvioimaani tietoa.

Selvittääkseni minkälaisia laboratoriotutkimuksia nykyisin on käytössä Suomessa klinisen mikrobiologian laboratorioissa, kävin läpi eri laboratorioiden internetsivuja ja tutkimusohjekirjoja etsien sieltä aihealueeseeni kuuluvia tutkimuksia. Kävin läpi tutkimusohjekirjat seuraavilta laboratorioilta: Huslab, Islab, Oyslab/Nordlab, Satadiag, Tykslab ja Utulab. Hain tutkimuksia tutkimusohjekirjoista aihealueittain (esim. ”bakteriologiset pcr-tutkimukset”) sekä hakusanoilla ”pcr” ja ”nukleiini”. Joissakin tutkimusohjekirjoissa sopivien tutkimusten etsiminen oli haastavaa, koska tutkimuksia ei ollut ryhmitelty selkeästi siten, että kaikkien aihealueeseen kuuluvien tutkimusten löytäminen olisi ollut helppoa. Joitakin tutkimuksia tehdään useammassa laboratorioissa. Tällöin käytännössä saman tutkimuksen tutkimusnimike saattaa hieman vaihdella, mutta tutkimusnumero on sama. Joissain tapauksissa saman tutkimusnimikkeen ja tutkimusnumeron alle on yhdistetty kaksi tutkimusta kuten viljely ja nukleiinihapon osoitus. Tällöin osa tutkimuksesta on käytännössä sama kuin toisessa laboratorioissa, mutta tutkimusnumero on eri (esim. *Bordetella pertussis*). Esimerkiksi Islab:n ohjekirjasta löytyi lähes kaikki alla olevat tutkimukset, mutta ne teetetään alihankintana, joten en ole maininnut niitä alla. PCR-tutkimukset ovat selkeästi keskittyneet UTULab:iin ja Huslab:iin.

Valitsin joitakin tutkimuksia, joista lähdin etsimään enemmän tietoa myöhäisemmässä vaiheessa. Kokosin eri laboratorioiden tutkimusohjekirjoista löytämäni ja käsittelyyn valitsemani tutkimukset alle taulukon muotoon (Taulukko 1). Tarkemmassa käsittelyssäni kävin läpi mahdollisia bakteereille tehtäviä tutkimuksia ja tutkimusten tutkimusperiaatteita yleisesti, tällöin kaikki tutkimusten ja tutkimusperiaatteiden yksityiskohdat ole samanlaisia kuin alla olevan taulukon analyysilaboratorioissa käytössä olevat.

Taulukko 1 PCR-tutkimuksia

Tutkimusnimike	Lyhenne ja tutkimusnumero	Analyysilaboratorio
<i>Bordetella pertussis</i> , nukleiinihapon osoitus (PCR)	BopeNhO (4345)	UTULab
<i>Bordetella pertussis</i> , viljely ja nukleiinihapon osoitus (PCR)	-BopeViP (9441)	Huslab
Borrelia, nukleiinihapon osoitus (PCR)	BorrNhO (4202)	UTULab, Huslab
Chlamydia trachomatis (ja Neisseria gonorrhoeae), NhO, virtsasta	U-ChTrNhO (U-CtGcNhO) (4816)	SataDiag
<i>Clostridium difficile</i> genotyypitys	CldiNhO (12518)	UTULab
F- <i>Clostridium difficile</i> , kannan tyyppitys	F-CldiTy (20555)	Huslab
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , nukleiinihappo	-TBNhO (4490)	Oyslab, Huslab, Islab
<i>Staphylococcus aureus</i> , mecA-geenin osoitus	-StauMec (20225)	Huslab
<i>Staphylococcus aureus</i> , Panton Valentine leukosiidiini (PVL-geeni)	-StauPVL (20698)	Huslab
<i>Staphylococcus aureus</i> , metisilliiniresistentti, nukleiinihappo (kval)	MRSANhO (4981)	Tykslab

Rajasin tutkimusaluetta valitsemalla käsittelyyn kliinisesti merkittäviä, toisistaan poikkeavia ja mielenkiintoisia tutkimuksia. Valintojeni pohjaksi perehdyin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen ”Tartuntataudit Suomessa 2012” -julkaisuun (Jaakola ym. 2013).

Valitsin tarkastelun kohteeksi hinkuyskää aiheuttavan *Bordetella pertussis* -bakteerin, sillä hinkuyskätapauksia oli ollut vuonna 2012 536 ja etenkin alle 1-vuotiaiden tapauksista suurin osa oli todettu PCR-tutkimuksella (Jaakola ym. 2013). Otin tarkasteluun mukaan yleistä sukupuolitauteja aiheuttavan *Chlamydia trachomatis* -bakteerin. Klamydiatapauksia ilmoitettiin vuonna 2012 tartuntatautitilastojen mukaan 13458 tapauksena. Klamydiadiagnostiikassa on rutiinikäytössä geenimonistusmenetelmä. (Jaakola ym. 2013.) Valitsin myös *Clostridium difficile* -bakteerin, jonka aiheuttamia tapauksia ilmoitettiin vuonna 2012 yli 6000. *C. difficile* on kliinisesti merkittävä erityisesti ollessaan hypervirulenttia kantatyyppiä. Tämän vuoksi *C. difficile* PCR-tekniikalla tehtävä kantatyyppitys on tärkeää. (Jaakola ym. 2013.) Valitsin käsittelyyn myös *Staphylococcus aureus* -bakteerin tutkimukset. Metisilliiniresistentin *S. aureuksen* (MRSA) tartuntojen leviämisen ehkäiseminen on tärkeää. MRSA-tapauksia ilmoitettiin vuonna 2012 1280. MRSA-kanta tyyppitettiin yli 1300 henkilöltä. (Jaakola ym. 2013.) Valitsin tarkas-

teluun mukaan myös tuberkuloosin aiheuttajan *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin. Tuberkuloositartunnat ovat vähentyneet viimeisimpinä vuosikymmeninä Suomessa merkittävästi, mutta silti tuberkuloosia vielä esiintyy ja uusien tartuntojen torjunta on tärkeää. Tuberkuloositapauksia oli Suomessa 275 vuonna 2012. Tuberkuloositartunta voidaan todeta viljelyyn verrattuna nopeasti PCR-tutkimuksella. (Jaakola ym. 2013.) Näiden lisäksi valitsin mukaan borreliaa aiheuttavan *Borrelia burgdorferi* -bakteerin. Borreliaa ei ole mainittu "Tartuntataudit Suomessa 2012" -julkaisussa. Borreliaa oli kuitenkin Suomessa tartuntatautilastojen mukaan ilmoitettu 1589 tapausta (THL 2013). Borrelian havaitseminen on tärkeää, koska hoitamattomana borrelia voi aiheuttaa vakavamman monia oireita aiheuttavan myöhäisborreliosisin (Borrelia 2013).

Tarkasteluni kohteeksi valitut PCR-menetelmällä tutkittavat bakteerit ovat siis *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* ja *Staphylococcus aureus*, josta erityisesti sen metisilliiniresistentti muoto. Bakteereja on kaikkiaan kuusi kappaletta.

Tein näistä valitsemistani bakteereista yhdistettynä polymeerasiketjureaktioon kirjallisuushaun. Hain tutkimuksista tietoa PubMed-tietokannasta. Hakusanoiksi laitoin "polymerase chain reaction" ja kyseisen bakteerin nimi, esimerkiksi "*Clostridium difficile*" ja "polymerase chain reaction". Rajasin hakuja siten, että hain vain vapaasti saatavilla olevia artikkeleja, joiden kielenä oli englanti tai suomi ja jotka olivat enintään kymmenen vuotta vanhoja. Ensisijaisesti pyrin käyttämään mahdollisimman uusia artikkeleja. Hain lisäksi kustakin bakteerista ja sen aiheuttamasta taudista tietoa mikrobiologian julkaisuista.

7.2 Posterin koostaminen

Kehittämistyöni tuotoksena tein hakemani aineiston pohjalta posterin PCR:stä sekä sen hyödyntämisestä kliinisessä bakteriologiassa. Posterilla tarkoitetaan yleensä julistetta, tutkimusjulistetta tai tietotaulua. Posteria käytetään usein tutkimusten ja tutkimustulosten esittelyyn tieteellisten kokoontumisten yhteydessä. Posterit jaotellaan tieteellisiin ja ammatillisiin postereihin. Tieteellisessä posterissa esitellään järjestelmällisesti joku tutkimus menetelmiseen, tuloksineen ja johtopäätöksineen. Ammatillinen posterit on vapaamuotoisempi. Posterini on ammatillinen posterit eli se saa olla melko vapaamuotoinen. Tiedonhakujeni pohjalta opinnäytetyöhöni kasaamastani aineistosta valitsin edelleen posteriin tulevat asiat. (Perttilä 2007.)

Posterin suunnittelussa tulee huomioida monia asioita. Posterin kohderyhmä pitää miettiä, jotta posterin sisällön voi kohdentaa oikeanlaiseksi. Posteria suunnitellessa on hyvä ottaa myös huomioon paikka, johon posterit asetetaan näyttille. Posterini kohderyhmä on Savonia-ammattikorkeakoulun ja erityisesti terveysalan ja bioanalytiikan opiskelijat sekä henkilökunta. Posteriin voivat tutustua myös muut Savonia-ammattikorkeakoulun tiloissa kulkevat ja oleskelevat ihmiset. Posterin sisältöä valitessa tulee keskittyä olennaisiin asioihin, sillä posterille ei saa mahtumaan kaikkea. Valitsin posteriin oleellisimpia asioita ja pyrin esittämään asiat sellaisessa muodossa, että asiaa entuudestaan tuntematon lukijakin ymmärtäisi. (Perttilä 2007.)

Posterin pitää olla ulkonäöltään selkeä, tyylikäs ja informatiivinen sekä sen tulee olla nähtävissä kahden metrin etäisyydeltä. Posterin kannattaa suunnitella riittävän isoon kokoon alusta lähtien. Liiallinen värien käyttö voi tehdä tuotoksesta sekavan ja vaikeasti luettavan. Posterin käytännön toteutuksessa voi käyttää jotain graafiseen suunnitteluun tarkoitettua taittoohjelmaa kuten Pagemakeria tai Illustratoria. Itse suunnittelin posterin käyttäen Microsoft Office PowerPointia. (Perttilä 2007.)

Posteriin valittujen kuvien tulee olla riittävän hyvälaatuisia. Posteriin tulevat kuviot, tekstit ja taulukot tulee laittaa riittävän isoon kokoon. Teksti tulee suunnitella sopivan leveisiin palstoihin, rivivälin tulee olla riittävä ja fontin helposti luettava isokokoisenaakin. Otsikot on hyvä erottaa muusta tekstistä koon, värin, korostuksen ja välien avulla. Posteria tehdessä tulee huolehtia siitä, että posteriin jää riittävästi tyhjää tilaa siten, että kokonaisuus pysyy selkeänä ja luettavana. (Perttilä 2007.) Posterin tekstimäärän rajoittaminen ja vähentäminen tuntui vaikealta. Vielä aivan työn loppuvaiheessa vähensin posterista tekstiä, jotta se ei olisi niin raskas luettava.

Posterissa on kerrottu hyvin lyhyesti mitä on kliininen bakteriologia ja millaisia tutkimusmenetelmiä kliinisen bakteriologian käytössä on. Posterissa on kuvailtu lyhyesti polymeerasiketjureaktion toimintaperiaate, PCR:n optimointi sekä esitetty yleisimmät PCR-menetelmän sovellukset. Posteriin on kuvailtu PCR-sykli vaiheittain. Sykli on esitetty sekä kuvallisessa että sanallisessa muodossa. Lisäksi posterissa on kerrottu kuinka PCR:ää voidaan hyödyntää kliinisessä bakteriologiassa, mitä PCR-menetelmillä voidaan selvittää ja mitä bakteereja voidaan esimerkiksi tutkia. Posterin on tässä opin- näytetyössä mukana liitteessä 1.

8 POHDINTA

PCR-menetelmät kehittyvät kaiken aikaa (Didelot, Bowden, Wilson, Peto & Crook 2012). Julkaistu tieto voi olla jo julkaisuhetkellään vanhentunutta tietoa. PCR-menetelmien peruseräpäte säilyy kuitenkin samana. Menetelmistä kuitenkin tehdään jatkuvasti uusia sovelluksia ja nämä sovellukset tuovat uutta tietoa. Uudet menetelmät voivat kehittyessään syrjäyttää vanhoja pitkäänkin käytössä olleita tutkimusmenetelmiä (Katila 2004b, 346). Uuden menetelmän siirtyminen rutiinidiagnostiikkaan on kuitenkin usein pitkä (Didelot, Bowden, Wilson, Peto & Crook 2012). Uusi menetelmä on usein aluksi kallis ja saattaa vaatia laiteinvestointeja. Uusi menetelmä saattaa kuitenkin olla entistä menetelmää nopeampi ja vaatia vähemmän työaikaä työntekijältä, mikä puolestaan tuo säästöjä edelliseen menetelmään verrattuna.

Olen pyrkinyt tekemään opinnäytetyöstäni selkeän ja ymmärrettävän. Työn aihe on kuitenkin sellainen, että alaan perehtymättömällä lukijalla voi olla vaikeuksia ymmärtää joitakin osioita perin pohjin. Kaikkien sivuosassa olevien termien perinpohjainen selvittäminen olisi kuitenkin kasvattanut työtä niin paljon, etten ole siihen ryhtynyt. Olen kuitenkin koettanut selittää asiat siten, että ne olisi helppo ymmärtää. Posteriin kasaamani asiat etenkin olen pyrkinyt ilmaisemaan kansantajuisesti. Syvällisempää ja siten hieman vaikeaselkoisempaa tietoa on enemmän opinnäytetyöraportin teoriaosuuksissa.

Olen käyttänyt työhön mahdollisimman tuoretta tietoa luotettaviksi arvioimistani lähteistä. Useamman lähteen tietoja käyttäessäni olen käyttänyt ajantasaisia tietoja. Geenitekniikan ala on hyvin nopeasti uudistuva, joten melko tuoretkin kirjalllähteet saattavat sisältää vanhentunutta tietoa. Olenkin aina arvioinut kriittisesti käyttämiäni tietoja. Tiedonhakuun käyttämissäni tietokannoissa, kuten PubMed:ssä olevat artikkelit ovat yleisesti vertaisarvioituja. Näitä tietoja voi pitää siis melko luotettavina, vaikkakin tieto tulee suhteuttaa artikkelin julkaisuaikaan ja arvioida onko tieto voinut ehtiä jo vanhentua. Tietoja hakiessani katsoin löytyikö tietokannoista asettamillani hakuehdoilla meta-analyyssejä. Meta-analyysit ovat yksittäisiä tutkimuksia kattavampia ja siten luotettavampia. Meta-analyysin tuottamiseen on käytetty suurta määrää eri tutkimuksia. Löysin joitakin meta-analyyssejä joita pystyin käyttämään tiedonlähteenä.

Olin valinnut käyttämäni tietolähteet siten, että ne olisivat mahdollisimman luotettavia. Tiedonhakuni ja tiedon työstämisen heikkoutena oli kuitenkin kielitaitoni, joka ei ole valtavan vahva. Englanninkielisten artikkelilähteiden käyttö toi oman haasteensa työn tekemiseen. Olen kuitenkin pyrkinyt säilyttämään alkuperäisten lähteiden tiedot sellaisina kuin ovat. Haastetta tuotti myös englannin kielisten termien kääntö suomen kielelle. Kaikille geenitekniikan termeille ei ole vakiintunutta suomenkielistä vastinetta olemassakaan, joten teksti sisältää joitakin englanninkielisiä suomenkielisissäkin tieteellisissä teksteissä käytössä olevia termejä. Joidenkin termien ja tekstien kääntämiseen kysyin apua toisilta paremmin kieltä ymmärtäviltä henkilöiltä.

Tältä aihealueelta ei ole juurikaan tehty opinnäytetöitä aikaisemmin. Joitakin virologian PCR-tekniikoita käsitteleviä töitä on tehty, mutta bakteriologian alue on hyvin vähän käsitelty ala. Vastaa-

vaa katsausluonteista opinnäytetyötä en ainakaan löytänyt. Koska aikaisempia töitä ei ole tehty, vertailu aiempiin töihin on mahdotonta. Tällä työllä on uutuusarvoa, kun edellisiä vastaavia töitä ei ole. Tämä tekemäni opinnäytetyö voisi olla teoriapohjana toisille opiskelijoille, jotka opinnäytetyönään kehittäisivät PCR-menetelmän harjoitustyötä koulun opetuskäyttöön. Jatkotutkimuksena voisi myös tehdä vertailua jonkin bakteerin PCR-menetelmän ja perinteisten diagnostiikkamenetelmien kuten viljelyn vahvuuksista ja heikkouksista toisiinsa verrattuna. Tällaisia tutkimuksia on tehty kansainvälisesti muun muassa *Bordetella pertussis* -bakteerille (Vestheim ym. 2012) ja MRSA:lle (Aydiner ym. 2012.)

Bioanalyytikon kaikkea toimintaa ohjaavat terveydenhuollon yhteiset eettiset periaatteet ja kliinisen laboratoriotyön eettiset periaatteet. Terveydenhuollon yhteisten eettisten periaatteiden mukaan potilaalla on oikeus hyvään hoitoon. Tämä käsittää potilaan oikeuden saada luotettavia laboratoriotutkimustuloksia ilman kohtuuttomia viiveitä. (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet, 2006.) PCR-menetelmiin pohjautuvat tutkimukset ovat yleisesti ottaen herkkiä ja luotettavia ja hyvin nopeita, joten ne parantavat potilaan tutkimustulosten luotettavuutta ja nopeuttavat diagnoosia ja sitä kautta hoidon saantia (Carlson & Koskela 2011). Kliinisen laboratoriotyön eettisten periaatteiden mukaan bioanalyytikon velvollisuutena on ylläpitää ja kehittää ammattitoimintansa edellyttämää osaamista ja omaksua uusia tieteellisillä menetelmillä tutkittuja ja hyväksytyjä menetelmiä ja toimintatapoja (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet, 2006). Tämän opinnäytetyön avulla nykyiset ja tulevat bioanalyytikot voivat perehtyä PCR-menetelmien käyttöön bakteriologian tutkimusmenetelminä. Bioanalyytikon velvollisuuksiin kuuluu myös antaa asiantuntija-apua muille ammattiryhmille laboratoriotutkimuksiin liittyvissä kysymyksissä (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet, 2006). Lueskelemalla opinnäytetyötäni ja posteria muidenkin alojen opinkelijat voivat oppia perusasioita PCR:stä kliinisessä bakteriologiassa. Tämä voi edistää muiden ammattiryhmien opiskelijoiden ymmärrystä PCR-tutkimuksiin liittyen.

Posterini on mielestäni selkeän näköinen ja ymmärrettävä, joskin tekstiä on edelleen vähentämistä pyrkimyksistäni huolimatta melko paljon. Posterissa en ole käyttänyt kovin paljoa värejä tai muitakaan tehostekeinoja. Olen pyrkinyt pitämään posterin ulkoasun yksinkertaisena ilman liiallista kikkailua. Monipuolisemmalla värien ja kuvien käytöllä olisi posterista kylläkin voinut saada vielä kiinnostavamman näköisen.

Ammatillinen kasvuni on vahvistunut opinnäytetyön tekemisen myötä. Opinnäytetyöprosessi on tuonut minulle paljon uutta tietoa bakteriologiasta ja geenitekniikasta, olen myös havahtunut pohtimaan voisiko laboratoriotutkimusprosessia nopeuttaa uusilla tutkimusmenetelmillä ja siten saada potilaan diagnoosin saamisen ja hoidon etenemään nopeammin. Opinnäytetyön tekeminen yksin on vaatinut vahvaa motivaatiota ja paljon aikaa. Työn teko on ollut hyvin tiivistä ja keskittymistä vaativaa. Tietojen etsiminen on parantanut tiedonhaku- ja käsittelytaitojani. Ammattitaidon kehittämiseksi ja ylläpitämiseksi olisi hyvä tulevaisuudessakin seurata uusien tutkimusmenetelmien kehittämistä ja käyttöönottoa, tämä voi vaatia tiedonhaku- ja tiedonkäsittelytaitojen käyttöä. Bioanalyytikon velvollisuutena on pitää ammattitaitoaan yllä (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet, 2006). Olen opinnäytetyöprosessin aikana saanut tutustua paljon tieteellisiin artikkeleihin. Minun on

nykyisin helpompi ymmärtää tieteellistä tekstiä. Kun tieteellisen tekstin lukeminen on tuttua, ammatitaitoa on helpompi pitää yllä tutustumalla uusia tutkimusmenetelmiä käsitteleviin julkaisuihin. Vieraskielisten aineistojen käyttö on vahvistanut kielitaitoani. Tieteellisen tekstin käyttö, käsittely ja muokkaus ovat tulleet perinpohjaisesti tutuiksi. Tieteellisen tekstin kirjoitus lähdeviittemerkintöineen sujuu jo rutiinilla. Opinnäytetyön tekeminen on ollut kaikkiaan hyvin työlästä, mutta opettavaista. Toivottavasti tämä työ pystyy välittämään tietoa edelleen eteenpäin. Tiedonvälityksen välineeksi työn tuotteena oleva posterit on tehty.

LÄHTEET

- AYDINER, A., LÜSEBRINK, J., SCHILDGEN, V., WINTERFELD, I., KNÜVER, O., SCHWARZ, K., MESSLER, S., SCHILDGEN, O. & MATTNER, F. 2012. Comparison of Two Commercial PCR Methods for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Screening in a Tertiary Care Hospital. PLoS One [verkkolehti] nro 9. [Viitattu:20.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446963/>
- BD 2013. BD ProbeTec™ CT Assay [Viitattu:14.10.2013.] Saatavissa: http://www.bd.com/ds/productCenter/MD-ProbetecEt_allCLSI_Procedures.asp
- BIOANALYYTIKON, LABORATORIOHOITAJAN EETTISET OHJEET. 2006. Suomen Bioanalytikkoliitto ry. [verkkomateriaali] [Viitattu:13.11.2013.] Saatavissa: <http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+%281%29.pdf>
- BIOSISTEMICA 2012. qPCR basics. [verkkosivu] [kuva] [Viitattu:10.10.2013.] Saatavissa: <http://www.biosistemika.com/workshops/qpcr-basics>
- BORRELIA 2013 [verkkosivu]. THL, Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. [Viitattu:21.8.2013.] Saatavissa: http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/borrelia
- BROWN, T. 2010. Gene cloning & DNA analysis. An introduction. 6.p.
- CARLSON, P. & KOSKELA, M. 2011. Bakteriologian perustekniikat. Infektiosairaudet. Verkkojulkaisu. [Viitattu:27.8.2013.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=isa00302&p_haku=herkkyys
- CHAIDIR, L., GANIEM, A., VANDER ZANDEN, A., MUHSININ, S., KUSUMANINGRUM, T., KUSUMADEWI, I., VAN DER VEN, A., ALISJAHBANA, B., PARWATI, I. & VAN CREVEL, R. 2012. Comparison of Real Time IS6110-PCR, Microscopy, and Culture for Diagnosis of Tuberculous Meningitis in a Cohort of Adult Patients in Indonesia. PLoS One nro 12. [Viitattu:10.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528723/>
- CLARK, K. 2004. Borrelia Species in Host-Seeking Ticks and Small Mammals in Northern Florida. Journal of Clinical Microbiology nro 11, 5076-5086. [Viitattu:16.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525154/>
- CLARK, K., LEYDET, B. & HARTMAN, S. 2013. Lyme Borreliosis in Human Patients in Florida and Georgia, USA. International Journal of Medical Sciences [verkkojulkaisu] nro 7, 915-931. [Viitattu:16.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675506/#B45>
- DESHPANDE, A., PASUPULETI, V., ROLSTON, D., JAIN, A., DESHPANDE, N., PANT, C. & HERNANDEZ, A. 2011. Diagnostic Accuracy of Real-time Polymerase Chain Reaction in Detection of *Clostridium difficile* in the Stool Samples of Patients With Suspected *Clostridium difficile* Infection: A Meta-Analysis. Clinical Infectious Diseases [verkkojulkaisu] nro 7, 81-90. [Viitattu:23.9.2013.] Saatavissa: <http://cid.oxfordjournals.org/content/53/7/e81.long>
- DIDELLOT, X., BOWDEN, R., WILSON, D, PETO, T. & CROOK, D. 2012. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. Nature Reviews Genetics [verkkojulkaisu] nro 13. 601-612. [Viitattu:14.10.2013.] Saatavissa: <http://www.nature.com/nrg/journal/v13/n9/full/nrg3226.html>
- FORSIUS, A. 2005. Hinkuyskä eli pertussis. Artikkel. Suomen Lääkärelehti [verkkojulkaisu] nro 10, 1207. [Viitattu: 2.9.2013.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi/cl/laakarilehti/pdf/2005/SLL102005-1207.pdf>
- HEIKKILÄ, R. 2005. Kliininen mikrobiologia tieteenalana. Julkaisussa: HELLSTÉN, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen kuntaliitto. 9-15.
- HEIKKILÄ, R. & MEURMAN, O. 2005a. Bakteriologia. Julkaisussa: HELLSTÉN, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen kuntaliitto. 31-52.

- HEIKKILÄ, R. & MEURMAN, O. 2005b. Laboratoriodiagnostiikka. Julkaisussa: HELLSTÉN, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen kuntaliitto. 94-98.
- HUSLAB. 2013. Ohjekirja. *Staphylococcus aureus*, Panton Valentine leukosidiini (PVL-geeni). [Viitattu: 30.8.2013.] Saatavissa: <http://huslab.fi/ohjekirja/20698.html>
- HUTTUNEN, R., SYRJÄNEN, J. & VUENTO, R. 2013. Resistentit bakteerit – haaste jokaisessa sairaalan potilaskontaktissa. Katsausartikkeli. Suomen Lääkärilehti [verkkojulkaisu] nro 13-14, 993-999. [Viitattu: 30.8.2013.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi/cgi-cug/brs/artikkeli.cgi?docn=000039185>
- IYER, R., MUKHERJEE, P., WANG, K., SIMONS, J., WORMSER, G. & SCHWARTZ, I. 2013. Detection of *Borrelia burgdorferi* Nucleic Acids after Antibiotic Treatment Does Not Confirm Viability. Journal of Clinical Microbiology [verkkojulkaisu] nro 3, 857-862. [Viitattu: 16.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592055/>
- JAAKOLA, S., LYYTIKÄINEN, O., RIMHANEN-FINNE, R., SALMENLINNA, S., VUOPIO, J., ROIVAINEN, M., NOHYNEK, H., LÖFLUND, J.-E., KUUSI, M. & RUUTU P. (toim.) 2013. Tartuntataudit Suomessa 2012. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL). [verkkojulkaisu] [Viitattu: 20.8.2013.] Saatavissa: http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/104475/URN_ISBN_978-952-245-890-2.pdf?sequence=1
- JALAL, H., STEPHEN, H., ALEXANDER, S., CARNE, C. & SONNEX, C. 2007. Development on Real-Time PCR Assays for Genotyping of *Chlamydia trachomatis*. Journal of Clinical Microbiology [verkkojulkaisu] nro 8, 2649-2653. [Viitattu: 19.9.2013.] Saatavissa: <http://jcm.asm.org/content/45/8/2649.full>
- JALAL, H., STEPHEN, H., CURRAN, M., BURTON, J., BRADLEY, M. & CARNE, C. 2006. Development and Validation of a Rotor-Gene Real-Time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of *Chlamydia trachomatis* in a Single Reaction. Journal of Clinical Microbiology [verkkojulkaisu] nro 1, 206-213. [Viitattu: 19.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1351959/>
- JALAVA, J., EEROLA, E., LINDHOLM, L., MEURMAN, O. & VIROLAINEN-JULKUNEN, A. 2009. *Clostridium difficile* toteaminen ja kantojen tyypitys. Moodi nro 9, 246-251.
- KANTELE, A., HE, Q. & MERTSOLA, J. 2005. Aikuisen hinkuyskä – vaara vauvalle. Katsausartikkeli. Suomen Lääkärilehti [verkkojulkaisu] nro 36, 3489-3493. [Viitattu: 2.9.2013.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi/cl/laakarilehti/pdf/2005/SLL362005-3489.pdf>
- KATILA, M.-L. 2004a. Diagnostiset perusmenetelmät kliinisessä bakteriologiassa ja mykologiassa. Julkaisussa PENTTILÄ, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 341-345.
- KATILA, M.-L. 2004b. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian ja parasitologian tutkimuksissa. Julkaisussa PENTTILÄ, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 346-358.
- KATILA, M.-L. 2004c. Nukleiinihappotestit kliinisessä bakteriologiassa, mykologiassa ja parasitologiassa. Julkaisussa PENTTILÄ, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 359-360.
- KURKINEN, M., SARKKINEN, H., KÄRPÄNOJA, P. & RANTA, T. 2006. Klamydian esiintyvyys äitiysterveystieteidenhuollon asiakkailta Päijät-Hämeen sairaanhoitopiirissä. Suomen Lääkärilehti [verkkojulkaisu] nro 51-52, 5349-5351. [Viitattu: 6.9.2013.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi/cl/laakarilehti/pdf/2006/SLL512006-5349.pdf>
- LINDHOLM, L. & EEROLA E. 2010. Bakteerien luokittelu ja tyypittäminen. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 56-67.
- LIUKKO, S. 2013. Opinnäytetyön raportointiohje. 4.2 Opinnäytetyön runko-osa – erilaisia rakenteita. Oppimateriaali. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. [verkkojulkaisu] [Viitattu: 5.9.2013.] Saatavissa: <http://oppimateriaalit.jamk.fi/raportointiohje/tag/kehittamistyö/>

- MERTSOLA, J. & HE, Q. 2010. *Bordetella pertussis* ja muut bordetellat. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 170-176.
- MOLICOTTI, P., USAI, D., CUBEDDU, M., SECHI, L. & ZANETTI, S. 2013. Comparison of two molecular methods for diagnosis *Chlamydia trachomatis*. Journal of infection in developing countries [verkkojulkaisu] nro 1, 64-66. [Viitattu:18.9.2013.] Saatavissa: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/23324823/821>
- NISSINEN, A. 2008. Bakteerien ja hiivojen tunnistus ja herkkyysmääritykset automaateilla. Moodi nro 5, 195-196.
- Ohjekirja. UTULab. 2012. *Clostridium difficile* genotyyppitys. Turun yliopisto. [Viitattu:7.5.2013.] Saatavissa: <http://www.med.utu.fi/tiedostot/ylab/pdf/2012-2014/CLOSTRIDIUM%20DIFFICILE%20GENOTYYPITYS.pdf>
- OKSI, J., SEPPÄLÄ, I. & HYTÖNEN J. 2010. Borreliat, treponeemat ja leptospiirat. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 247-262.
- PERTTILÄ, A. 2007. Ohjeita posterin tekoon. Viestintäpiste. Laurea-ammattikorkeakoulu. Leppävaara. [verkkojulkaisu] [Viitattu:2.9.2013.] Saatavissa: http://viestintapiste.laurea.fi/ind.pdf.doc.ppt/Posterin_suunnittelu.pdf.pdf
- POLISENA, J., CHEN, S., CIMON, K., MCGILL, S., FORVARD K. & GARDAM, M. 2011. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review. BMC Infectious Diseases [verkkojulkaisu] nro 11, 336. [Viitattu:20.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3259066/>
- PUHAKKA, J. & SALKINOJA-SALONEN, M. 2002a. Mikrobien solumuotojen tutkiminen. Julkaisussa: SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 74-77.
- PUHAKKA, J. & SALKINOJA-SALONEN, M. 2002b. Bakteerien solukuori. Julkaisussa: SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 98-111.
- PUOLAKKAINEN, M. & PAAVONEN J. 2010. Klamydiat. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 287-296.
- RAUTIO, M. 2010. *Clostridium*-lajit. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 233-238.
- SAIJONKARI, M. 2011. Julkaisun tarkastelu. MALDI-TOF massaspektrometria bakteerilajien tunnistamisessa: katsaus diagnostisesta osuvuudesta, kliinisestä vaikuttavuudesta ja kustannusvaikuttavuudesta. Tiivistelmä arviointiraportista. Finohta. THL. [verkkosivu] [Viitattu:5.9.2013.] Saatavissa: <http://meko.thl.fi/ohtanen/3639.aspx>
- SALIMNIA, H., LEPHART, P., ASMAR, B., PREBELICH, D., PAULSON E. & FAIRFAX, M. 2012. Aerosolized Vaccine as an Unexpected Source of False-Positive *Bordetella pertussis* PCR Results. Journal of Clinical Microbiology [verkkojulkaisu] nro 2, 472-474. [Viitattu:16.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264183/>
- SALKINOJA-SALONEN, M. 2002a. Mikrobiologian historia. Julkaisussa: SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 8-22.
- SALKINOJA-SALONEN, M. 2002b. DNA:n ominaisuudet ja toiminta. Julkaisussa: SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 297-322.

- SALKINOJA-SALONEN, M. 2002c. Fylogenia ja taksonomia. Julkaisussa: SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 358-384.
- SALKINOJA-SALONEN, M. 2002d. Rikastaminen. Julkaisussa: SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 58-60.
- SALKINOJA-SALONEN, M. & LOUNATMAA, K. 2002. Bakteerien tarttumisvälineet ja suojakerrokset. SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.) Mikrobiologian perusteita. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 128-140.
- SALOMAA, J. & E-OPPI OY. 2013. Bakteerin rakenne. [kuva] [Viitattu:7.10.2013.] Saatavissa: <https://peda.net/oppimateriaalit/e-oppi/ylakoulu/biologia/ihminen/taudinaiheuttajat/kuvamappi/kuvagalleria/bakteerin-rakenne>
- SEPPÄNEN, M. 2011. Hyönteisten levittämät taudit ja puremat Suomessa. Artikkel. Duodecim [verkkojulkaisu] nro 13, 1393-1400. [Viitattu:2.9.2013.] Saatavissa: <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo99629.pdf>
- SKURNIK, M. 2010. Bakteerigenetiikka. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 41-55.
- SOINI, H., LIIPPO, K. & VASANKARI, T. 2010. Mykobakteerit ja nokardiat. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 140-150.
- SUOMINEN, I., PÄRSSINEN, R., HAAJANEN, K. & PELKONEN, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- STRACHAN, T. & READ, A. 2011. Human molecular genetics. 4.p. Garland Science.
- TATTI, K., SPARKS, K., BONEY K. & TONDELLA, M. 2011. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Bordetella Species in Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology [verkkojulkaisu] nro 12, 4059-4066. [Viitattu:16.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232951/pdf/zjm4059.pdf>
- THL. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 2013. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta. Ilmoitetut tapaukset kuukausittain 2012. [verkkojulkaisu] [Viitattu: 21.8.2013.] Saatavissa: <http://www3.thl.fi/stat/>
- TONG, A., TONG, S., ZHANG, Y., LAMLERTTHON, S., SHARMA-KUINKEL, B., RUDE, T., AHN, S., RUFFIN, F., LLORENS, L., TAMARANA, G., BIEK, D., CRITCHLEY, I. & HOWLER JR, V. 2012. Panton-Valentine Leukocidin Is Not the Primary Determinant of Outcome for *Staphylococcus aureus* Skin Infections: Evaluation from the CANVAS Studies. PLoS One [verkkolehti] nro 5. [Viitattu:23.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356380/>
- VAARA, M., SKURNIK, M. & SARVAS M. 2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 14-40.
- VALVE, K., RAJALAHTI, I., HELMINEN, M., KALLUNKI, H., MÄKINEN, M., RANKI, P., NIEMI, R., LAITALA M., JÄRVENPÄÄ, R., SOINI, H. & RUUTU, P. 2011. Tuberkuloosiepidemian selvittäminen Esi-merkinä Pirkkalan epidemia. Suomen Lääkärilehti [verkkojulkaisu] nro 4, 253-260. [Viitattu:26.9.2013.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi/cgi-cug/brs/artikkeli.cgi?docn=000035214>
- VAN DOMMELEN, L., WOLFFS, P., VAN TIEL, F., DUKERS, N., HERNGREEN, S., DUGGEMAN, C. & HOEBE, C. 2013. Influence of Temperature, Medium, and Storage Duration on *Chlamydia trachomatis* DNA Detection by PCR. Journal of Clinical Microbiology [verkkojulkaisu] nro 3, 990-992. [Viitattu:19.9.2013.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592091/>

VESTRHEIM, D., STEINBAKK, M., BJORNSTAD, M., MOGHADDAM, A., REINTON, N., DAHL, M., GRUDE, N. & SANDVEN P. 2012. Recovery of *Bordetella pertussis* from PCR-Positive Nasopharyngeal Samples Is Dependent on Bacterial Load. *Journal of Clinical Microbiology* [verkkojulkaisu] nro 12, 4114-4115. [Viitattu:16.9.2013.] Saatavissa:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502974/pdf/zjm4114.pdf>

VUOPIO-VARKILA, J., KUUSELA, P. & KOTILAINEN P. 2010. *Staphylococcus aureus*. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Duodecim. 83-97.

WINETSKY, D., NEGOESCU, D., DEMARCHIS, E., ALMUKHAMEDOVA, O., DOORONBEKOVA, A., PULATOV, D., VEZHINA, N., OWENS, D. & GOLDBERGER-FIEBERT, J. 2012. Screening and Rapid Molecular Diagnosis of Tuberculosis in Prisons in Russia and Eastern Europe: A Cost-Effectiveness Analysis. *PLoS Medicine* [verkkolehti] nro 11. [Viitattu:20.9.2013.] Saatavissa:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507963/>

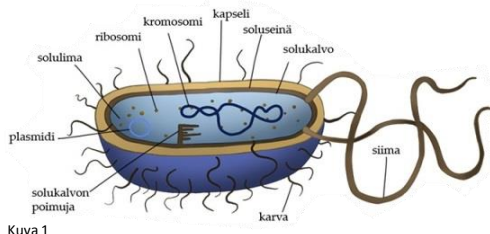
XU, H-B., JIANG, R-H., SHA, W., LI, L. & XIAO, H-P. 2010. PCR-Single-Strand Conformational Polymorphism Method for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* [verkkojulkaisu] nro 10, 3635-3640. [Viitattu:20.9.2013] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2953106/>

POLYMEERAASIKETJUREAKTIO KLIINISESSÄ BAKTERIOLOGIASSA

Kliininen bakteriologia

Kliininen bakteriologia tutkii ihmisille infektioitauteja aiheuttavia bakteereja.¹ Bakteerit ovat yksisoluisia, esitumallisia, ja jakaantumalla tai itiöiden avulla lisääntyviä eliöitä.^{2,3} Bakteerin perusrakenne on kuvattuna kuvassa 1.

Kliinisessä bakteriologiassa pääasiallisina menetelminä ovat mikroskopointi sekä viljely ja antibioottiherkkyysemääritykset. Perinteisten menetelmien lisäksi on kehitetty muun muassa nopeita polymeerasiketjureaktion käyttöön perustuvia geenimonistusmenetelmiä. Bakteerinäytteestä voidaan etsiä tietyille bakteereille tunnusomaisia DNA-jaksoja.^{4,5}



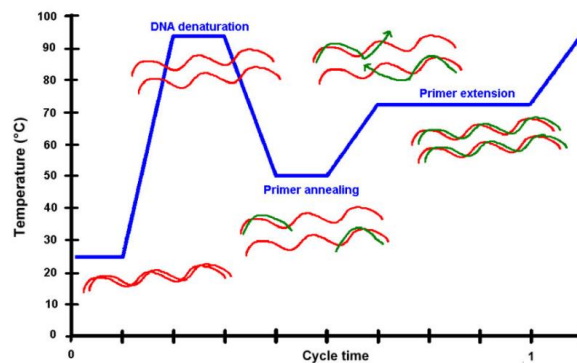
Kuva 1

Polymeerasiketjureaktio eli PCR

Polymeerasiketjureaktion eli PCR:n avulla voidaan monistaa haluttua DNA-jaksoa, joka sijaitsee kahden emäsjärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. PCR perustuu nukleiinihapon emästen selektiiviseen paritumiseen. Oikean DNA-jakson monistuminen perustuu oikein valittuihin PCR:n alukkeisiin. PCR:ään tarvitaan mallina eli templaattina toimivan nukleiinihapon lisäksi korkeissa lämpötiloissa aktiivisena säilyvä DNA-polymeraasientsyymi, alukkeet sekä vapaita nukleotideja reaktiopuskuriliuoksessa.^{6,7}

PCR:n onnistumiselle on tärkeää, että reaktio suunnitellaan hyvin etukäteen eli optimoidaan. Hyvin optimoidulla PCR:llä voidaan saada yhtä templaattimolekyyliä kohti valmistettua miljoona tuotemolekyyliä.⁶ Suunnittelussa oleellista on toimivien ja oikeaan kohtaan sitoutuvien alukkeiden valinta. PCR-syklin eri vaiheiden lämpötiloilla ja kestoilla on merkitystä lopputulokseen. Väärät lämpötilat voivat estää reaktion onnistumisen.⁷

Erilaisia PCR:n sovelluksia on kehitetty useita. Reaaliaikaisessa PCR:ssä (real-time PCR) voidaan PCR-tuotteen määrää seurata reaktion aikana. Kvantitatiivisen PCR:n (qPCR) avulla pystytään määrittämään näytteen DNA-molekyyliäärä. RT-PCR:n (reverse transcriptase PCR) avulla voidaan tutkia RNA:ta.^{6,7}



Kuva 2

PCR-sykli vaiheittain (kuva 2)

Alussa templaatti on yleensä kaksijuosteinen.

Denaturaatio. Juosteet erkanevat toisistaan eli denaturoituvat lämmittämällä reaktioseos n. 94 °C:een.

Annealing. Alukkeet parituvat templaattijuosteiden kanssa, kun lämpötila lasketaan n. 55 °C:een.

Ekstensio. DNA-polymeraasi aloittaa toimintansa ja alukkeiden pidentämisen n. 72 °C:ssa. Templaateille muodostuu vastinjuosteet. Vaiheen lopussa on kaikkiaan neljä juostetta, joista kaksi on alkuperäisiä templaatteja. Juosteiden määrä siis kaksinkertaistuu syklin aikana.

Reaktiosykli muodostuu vaiheista: denaturaatio, annealing, ekstensio. Vaiheita toistamalla saadaan juosteiden määrä kasvamaan joka sykliä kaksinkertaiseksi. Syklin määrä yhdessä reaktiossa on usein n. 30.^{6,7}

PCR kliinisessä bakteriologiassa

Kliinisessä bakteriologiassa on otettu käyttöön melko uusina menetelminä erilaisia PCR-tekniikkaan perustuvia bakteerien tunnistus- ja tyyppitysmenetelmiä. PCR-menetelmät bakteerin tunnistamiseksi ovat erityisen hyödyllisiä, kun pyritään tunnistamaan hidaskasuisia tai vaikeasti viljeltäviä bakteereja, kuten tuberkuloosia aiheuttavaa *Mycobacterium tuberculosisista*, sukupuolitauti klamydiaa aiheuttavaa *Chlamydia trachomatista* ja hinkuyskää aiheuttavaa *Bordetella pertussista*.^{8,9,10}

Usein on tarpeellista tutkia löytyykö kyseiseltä bakteerikannalta tiettyä geeniä, joka vaikuttaa oleellisesti esimerkiksi bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn tai resistenssiin. Tutkimalla *Staphylococcus aureukselta* onko sillä *mecA*-geeni, voidaan todeta onko se metisilliiniresistentti MRSA-kanta.

PCR-menetelmillä selvitetään epidemioita. Tutkimalla ovatko infektioita aiheuttaneet bakteerit geneettisesti samaa kantaa, voidaan selvittää infektion alkuperää ja tartuntojen leviämismenettelyjä. Selvityksiä tehdään erityisesti sairaalaepidemioita aiheuttaville bakteereille kuten antibioottiripulia aiheuttavalle *Clostridium difficilelle* ja MRSA:lle.¹¹

Lähteet

- HEIKKILÄ, R. 2005. Kliininen mikrobiologia tieteenala. Julkaisussa: HELLSTÉN, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen kuntaliitto. 9-15.
- HEIKKILÄ, R. & MEURMAN, O. 2005a. Bakteriologia. Julkaisussa: HELLSTÉN, S. (toim.) Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen kuntaliitto. 31-52.
- VAARA, M., SKURNIK, M. & SARVAS, M. 2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 14-40.
- KATILA, M.-L. 2004a. Diagnostiset perusmenetelmät kliinisessä bakteriologiassa ja mykologiassa. Julkaisussa: PENTTILÄ, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 341-345.
- CARLSON, P. & KOSKELA, M. 2011. Bakteriologian perusteet. Infektiosairaudet. Verkköjulkaisu. [Viitattu: 27.8.2013.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi/dtk/opp/koti?_artikkeli=isa00302&p_haku=herkkyys
- BROWN, T. 2010. Gene cloning & DNA analysis. An introduction. 6.p.
- SUDMINEN, I., PÄRSSINEN, R., HAAJANEN, K. & PELKONEN, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- PULAKKAINEN, M. & PAAVONEN, J. 2010. Klamydia. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 287-296.
- MERTSOLA, J. & HE, Q. 2010. *Bordetella pertussis* ja muut bordetellat. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 170-176.
- SOINI, H., LIIPPO, K. & VASANKARI, T. 2010. Mykobakteerit ja nokardiat. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. & VAARA, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 140-150.
- JALAVA, J., EEROLA, E., LINDHOLM, L., MEURMAN, O. & VIROLAINEN-JULKUNEN, A. 2009. *Clostridium difficile* toteaminen ja kantojen tyyppi. Moodi nro 9, 246-251.
- KUVA 1. SALOMAA, J. & E-OPPI OY. 2013. Bakteerin rakenne. [kuva] [Viitattu: 7.10.2013.] Saatavissa: <https://peda.net/oppimateriaali/e-oppi/ylakoulu/biologia/hminen/taudinaiheuttajat/kuvaapp/kuvagalleria/bakteerin-rakenne>

Kuva 2. BIOSISTEMICA 2012. qPCR basics. [verkkosivut] [kuva] [Viitattu: 10.10.2013.] Saatavissa: <http://www.biosistemika.com/workshops/qpcr-basics>

Anna Airas 2013, bioanalytiikan ko., Savonia-ammattikorkeakoulu