



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

**ULOSTENÄYTTEEN  
BAKTEERIPATOGEENIEN TUNNISTAMINEN  
MOLEKYYLIBIOLOGISILLA  
MENETELMILLÄ**

Marika Huttu

Opinnäytetyö  
Marraskuu 2016  
Bioanalytikkokoulutus



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Bioanalyttikokoulutus  
16MASH

HUTTU, MARIKA:

Ulostenäytteen bakteeripatogeenien tunnistaminen molekyylibiologisilla menetelmillä

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 1 sivua  
Marraskuu 2016

---

Ripuli on maailmanlaajuisesti yleisimpiä kuolemaan johtavia infektiosairauksia. Erityisesti kehitysmaissa ripulitaudit ovat jokapäiväinen kaikenikäisten ongelma. Aikuisilla ripulitautien merkitys on matkailun johdosta suuri. Matkailijoiden ripulitapauksista bakteerit aiheuttavat jopa 80 prosenttia tautitapauksista. Suomessa yleisimpiä suolistopatogeeneja eli bakteeriripulin taudinaiheuttajia ovat salmonellat, shigellat, yersiniat ja kampylobakteerit. Perinteisesti bakteeriperäiseksi epäillyn akuutin ripulin etiologian selvittämiseen on käytetty ulosteen bakteeriviljelyä (F – BaktVi1).

Fimlab Laboratoriot Oy:n kliinisen mikrobiologian yksikössä on tavoitteena tulevaisuudessa käyttää bakteeriperäisen akuutin ripulin diagnostiikassa PCR-pohjaista bakteerien tunnistusmenetelmää. Tällä hetkellä käytössä ovat viljelymenetelmiin perustuvat testit. Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata kahden eri valmistajan PCR-menetelmää ja verrata niiden antamia tuloksia käytössä olevan viljelymenetelmän tuloksiin. Opinnäytetyön tehtävinä oli selvittää, kuinka yhdenmukaisia PCR-menetelmillä ja viljelymenetelmällä saadut tulokset ovat keskenään sekä pohtia kumpi PCR-menetelmistä on käyttöominaisuuksiltaan parempi.

PCR-menetelmien testauksessa käytettiin nukleiinihappojen eristykseen Abbott m2000sp-laitetta. Käytettävä aineisto rajattiin 170 näytteeksi. Testattavina PCR-menetelminä olivat kaupalliset Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay (Seegene) - ja Amplidiag® Bacterial GE (Mobidiag) -tutkimuspakkaukset. Analysoitavat näytteet määritettiin Bio-Rad CFX96™ Real-Time System -laitteella. Referenssimenetelmänä oli perinteinen viljelymenetelmä.

Tuloksia käsiteltiin taulukon, kuvioiden ja sanallisen analysoinnin avulla. Tulosten perusteella PCR-menetelmillä tunnistettiin Shigella, Campylobacter ja Yersinia viljelymenetelmää paremmin. Salmonellan osalta viljelymenetelmä oli PCR-menetelmiä herkempi. Käyttöominaisuuksissa ei ollut merkittäviä eroja PCR-menetelmien välillä.

---

Asiasanat: polymeerasiketjureaktio, ulosteen bakteeriviljely, verifiointi

## **ABSTRACT**

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

**HUTTU, MARIKA**

Recognising of Bacteria Pathogens in Faeces Sample Using Molecular Biology Methods

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 1 pages

November 2016

---

Diarrhoea is a very common illness that is caused by bacteria or virus infection. In developing countries, diarrhoea is very common disease in all ages. In Finland, diarrhoea is strongly related to travelling.

Diarrhoea can be diagnosed using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. PCR is a common and often necessary technique used in clinical laboratories and research laboratories for a variety of applications. Real-time PCR is a PCR method that monitors the amplification of a targeted DNA molecule in real-time.

In this Bachelor's study, two PCR methods, produced and marketed by commercial vendors, are examined and evaluated. The empirical part of this study was a quantitative analysis of 170 faeces samples. The results and findings were in line with the previous studies mentioned in literature. The study also has qualitative aspect since one of the targets was to find out which of these commercial PCR systems was more suitable to the client company.

---

---

Key words: diarrhoea, polymerase chain reaction, evaluation

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	ULOSTENÄYTTEEN BAKTEERIVILJELY.....	8
2.1	Salmonella .....	9
2.2	Shigella .....	10
2.3	Yersinia .....	11
2.4	Campylobacter .....	13
3	OPINNÄYTETYÖN MOLEKYYLIBIOLOGISET MENETELMÄT .....	15
3.1	Polymeraasiketjureaktio eli PCR .....	15
3.2	Reaaliaikainen PCR .....	15
3.3	Nukleiinihappoeristysautomaatin toimintaperiaate .....	16
3.4	Allplex™ GI-Bacteria(l) Assay (Seegene) -testi .....	17
3.5	Amplidiag® Bacterial GE (Mobidiag) -testi .....	18
4	TYÖSKENTELYN ERITYISPIIRTEITÄ MOLEKYYLIBIOLOGIAN LABORATORIOSSA .....	19
5	MENETELMÄN VERIFIOINTI .....	21
5.1	Verifioinnin eri vaiheet .....	22
6	AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET .....	23
7	TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT .....	25
8	OPINNÄYTETYÖN MENETELMÄT .....	26
9	KOKEELLISEN OSUUDEN TOTEUTUS .....	28
9.1	Näytteiden kerääminen ja valmistelu .....	28
9.2	Nukleiinihappoeristys .....	29
9.3	Allplex™ GI-Bacteria(l) Assay – määrittelyn kulku .....	30
9.4	Amplidiag® Bacterial GE – määrittelyn kulku .....	32
10	MENETELMÄVERTAILUN TULOKSET .....	35
10.1	Tulosten analysointi .....	37
11	POHDINTA.....	40
	LÄHTEET .....	42
	LIITTEET .....	45

## 1 JOHDANTO

Ripulitaudit kuuluvat ihmisen yleisimpiin infektioihin. Useimmiten ne ovat bakteerien tai virusten aiheuttamia. Kehitysmaissa ripuliin sairastuminen on jokapäiväinen ongelma, joka koskettaa kaikenikäisiä ihmisiä. Suomessa asuvilla ihmisillä ripulitauteja esiintyy erityisesti matkailun yhteydessä. (Mattila & Järvinen 2011, 475–476; Karhumäki, Jons-son & Saros 2009, 118.) Osa suolistoinfektioista on niin sanottuja zoonooseja. Niillä tarkoitetaan tartuntatauteja, joiden aiheuttajat voivat siirtyä eläimistä ihmisiin ja päinvastoin joko suoraan tai välillisesti. Välillinen tartunta tapahtuu, kun ripulia aiheuttavat bakteerit tulevat ruoan tai veden mukana elimistöön ja alkavat lisääntyä siellä. (Zoonoosikeskus 2016.) Salmonellabakteerin aiheuttamista ripuleista 70–85 prosenttia ja kampylobakteeritartunnoista yli puolet on ulkomaista alkuperää. Shigelloja ei ole lainkaan kotimaisina taudinaiheuttajina. Yersiniatartunnat sen sijaan ovat valtaosin peräisin kotimaasta. (Mat-tila & Järvinen 2011, 475–476; Karhumäki ym. 2009, 118.)

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja on Fimlab Laboratoriot Oy:n klinisen mikrobiolo-gian laboratorio. Fimlab Laboratoriot Oy:n omistavat Pirkanmaan, Keski-Suomen ja Kanta-Hämeen sairaanhoitopiirien kuntayhtymät. Yhtiö tuottaa laboratorio- ja lääkäripal-veluita, opetus- ja tutkimustoimintaa sekä muita terveydenhuoltoon liittyviä palveluita julkisen terveydenhuollon tarpeisiin. Yhtiön asiakkaita ovat terveydenhuoltoalan laitok-set, sairaalat, terveyskeskukset, lääketehtaat, tutkijat, lääkärit ja potilaat. (Fimlab Labora-toriot Oy 2016a.)

Fimlabin alueellinen toiminta jakaantuu tuotantoyksiköihin Pirkanmaalla, Keski-Suo-messa ja Kanta-Hämeessä. Näytteenottopalveluita tarjotaan useissa asiakaspalvelun toi-mipisteissä kaikkien kolmen omistavan sairaanhoitopiirin alueella. Yhtiön laborato-riopalvelut on keskitetty Tampereelle Finn-Medi Delta-rakennukseen. Laboratoriossa tehdään bakteriologian, molekyylibiologian, infektioserologian, autoimmunisairauksien ja mykologian alan laboratoriotutkimuksia 24 tuntia vuorokaudessa vuoden jokaisena päivänä. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016a.)

Kliinisen mikrobiologian osastolla tehtävät työt on jaettu työpisteisiin tehtävänä olevan tutkimusten perusteella. Työpisteitä ovat: veriviljelyt, anaerobityöpiste, virtsaviljelyt, herkkyystyöpiste, hygieniatyöpiste, märkäviljelyt, streptokokkiviljelyt, MRSA-viljelyt,

uloste viljelyt, sienet ja mykobakteeriviljelyt. Jokaisessa työpisteessä suoritetaan kyseisen bakteerin tutkimus työhjetta noudattaen alusta loppuun eli näytteen vastaanottamisesta vastauksen antamiseen tilaajalle. Mikrobiologian osastolla työskentelevät tekevät vuoro-työtä, johon kuuluu myös päivystystöiden osaaminen. Työ mikrobiologian osastolla on luonteeltaan moniammatillista yhteistyötä. Sujuva vuorovaikutus kaikkien ammattiryhmien välillä on tärkeää töiden sujuvuuden kannalta.

Kliinisen mikrobiologian uloste viljelylaboratoriossa tutkitaan F-BaktVi1-tutkimuspyynnöllä ulostenäytteestä *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas* ja *Plesiomonas* bakteereita. Näytteenä työpisteessä käytetään ulostetta muovipurkissa ja bakteerikuljetusputkessa. Tällä hetkellä laboratoriossa käytetään bakteerien tunnistamiseen viljelymenetelmiin perustuvia testejä. Kliinisen mikrobiologian laboratorion tavoitteena on siirtyä käyttämään ulosteen bakteeripatogeenien analysoinnissa polymeerasiketjureaktiomenetelmää (PCR). Tällä tavoin on mahdollista saada tutkimuksen tulokset kliinikoille nopeammin ja tehokkaammin.

Tässä opinnäytetyössä tutkitaan bakteeripatogeenien tunnistamista PCR-menetelmällä, joka on yksi tärkeimmistä molekyylibiologisista menetelmistä. Opinnäytetyön tarkoituksena on tuottaa tuloksia uuden tutkimusmenetelmän verifiointia varten. Opinnäytetyössä testataan kahden eri valmistajan PCR-menetelmiä sekä verrataan niiden antamia tuloksia nykyisin käytössä olevan viljelymenetelmän tuloksiin.

Opinnäytetyöni alkoi huhtikuussa 2016 päiväkirjamuotoisena työnä, johon sisältyi omien tavoitteiden laatiminen ja oman osaamisen arviointi 40 työpäivän ajalta. Päiväkirjaan kuului kehittämistehtävä osuus, jonka aiheena oli uusien PCR-menetelmien testaaminen. Päiväkirjan kirjoittamisessa oli haastetta vaihtuvien työtehtävien takia. Syksyllä päätin vaihtaa työni perinteiseksi opinnäytetyöksi, jonka aiheeksi rajasin kehittämistehtävänä olevan PCR-menetelmien testauksen. Päiväkirjamuotoisesta työstä olisi tullut liian laaja, jos se olisi käsitellyt kaikkia kliinisen mikrobiologian työpisteitä. Opinnäytetyö muuttui koestuksen myötä kokeelliseksi työksi. Opinnäytetyössäni kuvaan uloste viljelyn nykytilanteen sekä koestuksessa käyttämiäni molekyylibiologisia menetelmiä ja työskentelyn erityispiirteitä. Koestuksessa tarvittava aineisto (n= 170) on kerätty huhtikuun 2016 alussa uloste viljelyyn tulevista näytteistä. Aineistosta valittiin kaikki viljelymenetelmällä positiiviseksi saadut näytteet kahden viikon ajalta koestukseen mukaan. Loput koestuk-

sessä käytettävät näytteet olivat negatiivisia viljelymenetelmällä. Koestus rajattiin kahdeksi 96 näytteen sarjaksi. Tuloksia käsittelemäni kuvioiden ja sanallisen analysoinnin avulla.

## 2 ULOSTENÄYTTEEN BAKTEERIVILJELY

Ihmisen yleisimpiin infektioihin kuuluvat ripulitaudit ovat erityisesti kehitysmaissa joka-päiväinen ongelma. Suolistoinfektioita aiheuttavat bakteerit tulevat useimmiten ruoan tai veden mukana elimistöön ja alkavat lisääntyä siellä aiheuttaen ripulitaudin. Kehittyneissä ja kehitysmaissa ovat samat ripulin aiheuttajamikrobit, niiden osuudet ja merkitys vain vaihtelevat. Suomessa tärkeimpiä suolistoinfektioita aiheuttavia bakteereita ovat salmonellat, kampylobakteerit, *Yersinia enterocolitica* (virulentit kannat), *Clostridium difficile* ja enterohemorraaginen *Escherichia coli* (EHEC). (Karhumäki ym. 2009, 118; Mattila & Järvinen 2011, 475.)

Äkilliseen vatsatautiin sairastuneelta voidaan taudinaiheuttaja etsiä ulosteviljely 1 –paketin (F –BaktVi1) avulla. Tutkimus sisältää salmonella-, shigella-, yersinia- ja kampylobakteeriviljelyt. (Karhumäki ym. 2009, 118.) Yksittäinen ulosteen salmonellaviljely tulee kyseeseen tartuntatautiasetuksessa (A786/1986) määriteltyyn riskityöhön tulevan tarkastusta tehtäessä (erityisesti ruoanlaitossa sekä pienten lasten ja vanhusten hoidossa työskentelevät) tai riskityötä tekevän työntekijän ulkomaanmatkan jälkeistä tarkastusta tehtäessä tai kontrolloitaessa yksittäisen hoidon onnistumista (Tartuntatautiasetus 2016; Mattila & Järvinen 2011, 482, 496).

Näytteenä ulosteviljelytyöpisteessä on ulostetta sekä muovipurkissa, että tikussa kuljetusputkessa. Näytteiden säilytys tapahtuu jääkaappilämpötilassa ennen maljoille viljelyä. (Fimlab Laboratoriot 2016a). Työpisteen hoitajan vastuulla on arvioida näytteen laatu, tarkistaa näytetiedot ennen analysointia sekä huolehtia näytteiden asianmukaisesta säilytyksestä. Työpisteen aamupäivän töihin kuuluu viljeltyjen maljojen lukeminen ja vastaus-ten antaminen pyytävälle taholle C5LIMS-tietojärjestelmän kautta. Viljellyiltä maljoilta arvioidaan luvussa bakteeripatogeenien esiintyminen ja määrä. Positiivisista näytteistä tehdään kullekin tutkimukselle kuuluvat jatkotutkimukset. Iltapäivän töinä viljellään uudet saapuneet näytteet, numeroidaan maljoja valmiiksi viljelyä varten sekä tehdään muita työpisteeseen kuuluvia tehtäviä, kuten malja- ja putkikontrolleja sekä tilauksia.

Bakteeriviljelyä pidetään edelleen diagnostisen bakteriologian perusmenetelmänä. Laboratoriotyöskentely bakteriologialla on vielä suurelta osin käsityötä. Näytteiden viljely



suoritetaan hajotustekniikalla kiinteille elatusainemaljoille. Käytössä on myös nestemäisiä elatusaineita, kuten nestemäistä erikoiselatusainetta ja antikoagulanttia sisältävät veriviljelypullot. (Carlson & Koskela 2011, 40–41.) Bakteripatogeenien tunnistamisessa käytetään VITEK® MS-analyysilaitteistoa, jonka toiminta perustuu MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption ionization Time-of-Flight) – menetelmään. Laite laskee eripainoisten proteiinimolekyylien määrästä massaspektrin ja vertaa sitä laitteen tietokannassa (spektrikirjasto) oleviin bakterikantojen spektreihin ja listaa parhaat tunnistusosumat. (VITEK® MS 2016.) Lisäksi käytetään bakteereiden tunnistuksen apuna erilaisia biokemiallisia testejä ja useimmiten määritetään mikrobilääkeherkkyys. Bakteriviljelmien käsittely ja tulkinta vaativat tehtävään koulutetun henkilökunnan. Joistakin viljelytutkimuksista voidaan negatiiviset maljat seuloa ja vastata terveysesemien laboratorioissa ja lähettää ainoastaan kasvavat viljelymaljat jatkotutkimuksiin mikrobiologian laboratorioon. (Carlson & Koskela 2011, 40–41.)

## 2.1 Salmonella

Salmonellat voivat aiheuttaa suolisto- ja yleisinfektioita, kuten vakavan septisen yleisinfektion eli lavantaudin (*Salmonella typhi*) tai lievemmän pikkulavantaudin (*Salmonella paratyphi*) (Karhumäki ym. 2009, 119). Useimpien salmonellojen aiheuttama tauti on lievempi. Bakteerit jäävät suoleen, jossa ne aiheuttavat suolistotulehduksen, enteriitin. Ominaisia piirteitä taudille on äkillinen ripuli, vatsakipu ja kuumeilu. (Siitonen & Vaara 2010, 187.)

Kliinisen mikrobiologian laboratorioissa salmonellabakteerit todetaan ulostenäytteestä viljelyllä. Yleensä salmonellat kasvavat XLD (Xylose Lysine Deoxycholate)-maljoilla mustina (tai aluksi värittöminä) pesäkkeinä (kuva 1). Ulostetta viljellään selektiiviselle elatusainemaljalle (XLD) ja rikastusliemiputkeen (seleniitti). Seleniittiputksta viljellään XLD-malja inkuboinnin jälkeen. Lajitunnistuksessa käytetään VITEK MS –analysointia eli massaspektrometriä. Salmonellojen tarkempi tunnistus tehdään antigeeniosoituksen avulla käyttäen antiseerumiagglutinaatiota. Salmonellabakteereista osoitetaan kaupallisten seerumeiden avulla somaattisia eli O- ja flagella- eli H-antigeeneja. Vain harvoilla salmonelloilla on kapseli ja erikoistapauksissa osoitetaan kapseliantigeenia (Vi). Antiseerumiagglutinaation tuloksen perusteella salmonellat nimetään Kauffman-White-järjestelmän mukaan. *Salmonella enteritidis* ja *Salmonella typhimurium* tunnistetaan se-

roryhmätasolle, samoin *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* ja *Salmonella paratyphi B*. Salmonelloista muut vastataan O-ryhmän perusteella ryhmänimellä. Jos salmonellakanta on agglutinaatiossa epäselvä, vastataan se salmonellalajina ja lähetetään THL:ään tunnistettavaksi. (Siitonen & Vaara 2010, 184–185; Fimlab Laboratoriot Oy 2016c.) Ihmiselle taudin aiheuttavia salmonellaserotyyppejä tunnetaan yli 2000. Suomessa yleisimmät tautia aiheuttavat salmonellan serotyypit ovat *enteritidis* ja *typhimurium*. (Terveys- ja hyvinvoinnin laitos 2016.)



KUVA 1. *Salmonella typhimurium* XLD-maljalla

## 2.2 Shigella

Shigellaa esiintyy vain ihmisen tai apinan suolistossa, joten tartunta on aina peräisin shigellaa erittävän henkilön ulosteista. Shigella leviää suhteellisen herkästi ulosteen saastutetun ruuan tai veden välityksellä. Tartunnan voi saada myös kosketustartuntana käteilyssä tai uimavedestä, koska tartuttava bakteeriansos on erittäin pieni. Shigella on yleinen ripulitaudin aiheuttaja kehitysmaissa, joissa on suuri ihmistiheys sekä yleiskuntoa ja hygieniää huonontavia riskitekijöitä. Suomessa shigelloosia ei juuri esiinny kotimaisena tartuntana. (Karhumäki ym. 2009, 121; Mattila & Järvinen 2011, 485–486; Siitonen & Vaara 2010, 192.) Shigellabakteerit jaetaan neljään lajiin: *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri* ja *Shigella sonnei*. Näistä *S. dysenteriae* on kehitysmaissa aiheuttanut epidemioita, joissa on ollut vakava taudinkuva. Shigelloosista käytetään nimeä punatauti sen aiheuttaman verisen ripulin takia. (Mattila & Järvinen 2011, 485.)

Shigellabakteeri (kuva 2) voidaan todeta viljelemällä ulostenäyte selektiiviselle elatusainemaljalle (XLD). Shigellat kasvavat värittöminä tai hiukan punertavina pesäkkeinä XLD-maljalla. *Shigella sonnei* fermentoi heikosti laktoosia, joten se voi muuttua maljoilla koliformien näköiseksi eli keltaiseksi. Shigellan näköisistä pesäkkeistä tunnistus tehdään laboratoriossa käyttäen biokemiallisia testejä sekä antiseerumiagglutinaatiota. Biokemiallisessa tunnistuksessa käytetään glukoosi- ja liikkuvuusputkia. Shigellat ovat liikkumattomia, eivätkä useimmiten tuota kaasua glukoosiputkessa. Poikkeuksena on *Shigella flexneri*, joka tuottaa kaasua glukoosiputkessa. Tunnistusta jatketaan tarvittaessa tekemällä API 20E. Shigellalajien antigeeniosoituksessa käytetään kaupallisia shigella-antiseerumeita. Jokaiselle neljälle shigellalajille on oma reagenssinsa. Tulos on positiivinen, kun agglutinaatio saadaan yhdellä reagenssilla muiden jäädessä negatiivisiksi. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016d.)



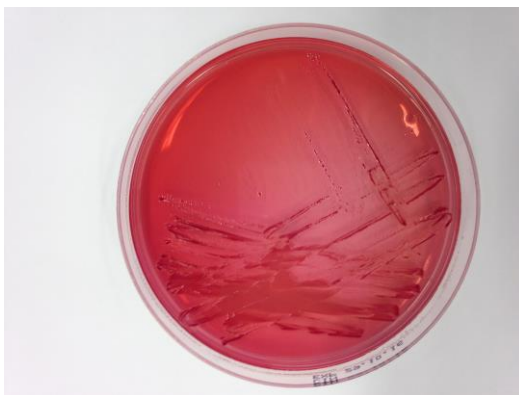
KUVA 2. *Shigella flexneri* XLD-maljalla

### 2.3 Yersinia

Yersiniat ovat eläimissä, maaperässä ja vesistöissä esiintyviä bakteereita, jotka voivat aiheuttaa ihmiselle suolisto- ja yleisinfektioita. Tällä hetkellä tunnetaan 14 Yersinia-lajia. Tärkeimmät ihmiselle tautia aiheuttavat lajit ovat: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* ja *Yersinia pestis*. Yleensä Yersiniat leviävät saastuneiden elintarvikkeiden välityksellä, kuten *Yersinia enterocolitica* kypsentämättömän tai huonosti kypsennetyn sianlihan välityksellä. *Yersinia pseudotuberculosis* esiintyy monilla eläimillä, kuten jyrtsijöillä, linnuilla ja jäniksillä. *Yersinia pestis* on ruton eli mustan surman aiheuttaja. *Y. pestis* infektoita esiintyy jyrtsijöissä maapallon eri puolilla. Tartunnan välittäjänä jyrtsijästä ihmiseen on kirppu tai infektoituneen eläimen purema. (Siitonen & Vaara 2010, 194; Mattila & Järvinen 2011, 485.)

Viljelyssä käytetään selektiivistä antibiootteja sisältävää CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) -elatusainemaljaa. Maljalla *Yersinia enterocolitica*-pesäkkeet kasvavat keskeltä tummanpunaisina ja reunoilta läpikuultavina pesäkkeinä (kuva 3). Yersiniakylmärikastus tehdään BHI (Brain Heart Infusion) -lihaliemiputkeen, jota inkuboidaan jääkaapissa 2 viikon ajan ja tehdään viljelyt 1 ja 2 viikon kuluttua. Kylmärikastuksessa pienten bakteerimäärien löytäminen helpottuu. Kylmärikastuksella etsitään yleensä *Yersinia pseudotuberculosis* sillä yleensä *Yersinia Enterocolitica* kasvaa hyvin suorassa viljelyssä CIN-maljoilla (kuva 3). Laboratoriossa kylmärikastus tehdään aina, jos näytteestä on pyydetty pelkkä yersiniaviljely. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016g.)

Yersinioiden tunnistus tehdään ensisijaisesti VITEK MS- analyysilaitteistolla. Biokemiallisina testeinä voidaan käyttää urea- ja liikkuvuusputkia, joissa yersiniat ovat laktoosinegatiivisia ja yleensä ureaposiittivisia, H<sub>2</sub>S-negatiivisia sekä liikkumattomia +35 °C:ssa. *Y. enterocolitica* jakautuu kuuteen biotyyppiin: 1A, 1B, 2, 3, 4 ja 5. Biotyyppi 1A: kantoja pidetään apatogeneineina, koska niiltä puuttuvat klassiset virulenssitekijät. Patogeeneihin kuuluvat pääsääntöisesti muihin biotyyppeihin kuuluvat kannat. *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis*- kannoilta virulenssiplasmidin läsnäolo voidaan osoittaa tekemällä fenotyyppinen virulenssitesti CR-MOX (Congo Red Magnesium Oxalate) -maljalle. Virulentit kannat keräävät kongonpunaista pesäkkeeseensä ja kasvavat oranssinpunaisena ja vaihtelevan kokoisena. Ei-virulentit kannat ovat tasakokoisia läpikuultavia agaripohjan värisiä pesäkkeitä. Samalla viljellään myös positiivinen ja negatiivinen kontrollikanta, joiden kasvua verrataan tutkittaviin kantoihin. (Siitonen & Vaara 2010, 193; Fimlab Laboratoriot Oy 2016g.)

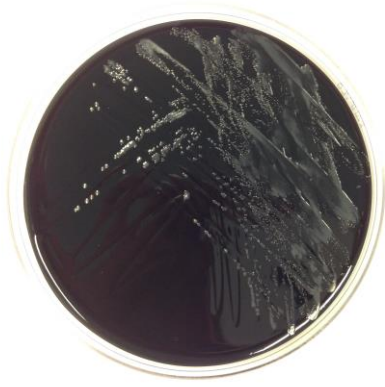


KUVA 3. *Yersinia enterocolitica* CIN-maljalla

## 2.4 Campylobacter

Kampylobakteeri on kaikkialla maailmassa erittäin yleisesti sekä ihmisillä että eläimillä esiintyvä suolistobakteeri. Kampylobakteerilajeja on lukuisia, näistä *Campylobacter jejuni* (yli 90 %) ja *Campylobacter coli* (5-10 %) ovat yleisimmät taudinaiheuttajat Suomessa. Myös *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter lari* ja *Campylobacter fetus* voivat aiheuttaa suolistoinfektion ihmisellä. Näistä *C. fetus* on harvinainen oppurtinistinen taudinaiheuttaja. Yleensä kyseessä on septinen yleisinfektio. (Mattila & Järvinen 2011, 483; Rautelin 2010, 217–219; Terveystieteiden tutkimuskeskus ja Hyvinvoinnin tutkimuskeskus 2016.) Kampylobakteereja voi esiintyä runsaasti monen eläimen suolistossa (nautakarja, lampaat, siat ja siipikarja). Infektion lähteenä on usein eläimistä valmistettujen vaillinaisesti kypsennettyjen ruokien nauttiminen tai kontakti eläimeen, myös lemmikkieläimiin. Muutaman sadan kampylobakteerin nauttiminen voi jo aiheuttaa infektion. Akuutin ripulin lisäksi tautiin liittyy usein korkeaa kuumetta ja kovia vatsakipuja. (Rautelin 2010, 219–220.)

Laboratoriodiagnoosi perustuu ulosteen kampylobakteeriviljelyyn. Ulostenäyte viljellään selektiiviselle kampylobakteerimaljalle, jota inkuboidaan 2 vuorokautta +42° C:ssa mikroaerofiilisessa ilmassa (suljettu astia, joka täytetään seoskaasulla 5 -6 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>). (Fimlab Laboratoriot Oy 2016b.) Mikroaerofiiliset bakteerit kasvavat ainoastaan, kun niiden kasvuympäristön happipitoisuus on sopivan pieni. Ne myös sietävät korkeampia lämpötiloja, mitä voidaan hyödyntää diagnostiikassa apuna ulosteen kampylobakteereja viljeltäessä (lämpötilaselektio). (Carlson & Koskela 2011, 42.) Jokaiseen viljelyastiaan laitetaan mukaan puhdasviljelmä *C. jejuni* sekä *E. coli*-kontrollikannasta. Kampylobakteerin tunnistus tehdään kasvukokeiden avulla. Maljalla kasvavasta harmahavasta (kuva 4) ja oksidaasipositiivisesta pesäkkeestä tehdään puhdasviljelmät kahdelle verimaljalle ja yhdelle kampylobakteerimaljalle. Verimaljoista toista kasvatetaan lämpökaapissa ja toinen malja kasvatetaan kampylobakteerimaljan kanssa mikroaerofiilisessa ympäristössä. Lämpökaapissa olevalla verimaljalla ei saa olla kasvua, kun taas muut maljat kasvavat. Lajitunnistus kampylobakteerille tehdään verimaljalta, joka on kasvanut mikroaerofiilisisä olosuhteissa VITEK MS – analyysilaitteistolla. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016b.)



KUVA 4. *Campylobacter jejuni* kampakylobakteerimaljalla

### 3 OPINNÄYTETYÖN MOLEKYYLIBIOLOGISET MENETELMÄT

#### 3.1 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

Polymeraasiketjureaktio (PCR) on menetelmä, joka mahdollistaa DNA:n eksponentiaalisen monistamisen. PCR-menetelmällä monistetaan DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. Toimiakseen reaktio tarvitsee monistettavan DNA:n, vapaita nukleotideja (dNTP), puskuriliuoksen, ioneja (magnesiumia), DNA-polymeraasin ja monistettavan alueen rajaavat alukkeet eli primerit. PCR-reaktio perustuu lämpötilan sykliseen vaihteluun. Reaktio tapahtuu ohjelmoitavassa laitteessa, joka lämmittää ja jäähdyttää reaktioseosta halutun sarjan mukaisesti. (Suominen & Ollikka 2003, 107–109; Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 153; Solunetti 2006.)

Polymeraasiketjureaktiossa toistuu kolme vaihetta: DNA-juosteiden erotus toisistaan eli denaturaatio, alukkeiden sitoutuminen yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin eli annealing ja vastinjuosteiden synteesi eli pidennys, jolloin DNA-polymeraasi syntetisoi yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista DNA:ta. Kolmivaiheista sykliä toistetaan peräkkäin templaattista riipuen useita kymmeniä kertoja. Näin saadaan aikaan alukkeiden rajoittaman DNA-jakson eksponentiaalinen monistuminen. (Suominen & Ollikka 2003, 107–109; Solunetti 2006.)

#### 3.2 Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikainen PCR (engl. real-time PCR) mahdollistaa syntyvän tuotteen määrän seuraamisen koko ajan reaktion edetessä. Reaaliaikaisen seurannan mahdollistaa fluoresoivan väriaineen käyttö. Valmistuvaan kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen sitoutuessaan väriaineen fluoresenssisignaali moninkertaistuu. (Suominen ym. 2013, 166.) Menetelmän etuja on nopeus. Automatisoidulla PCR-laitteella voidaan kohdesekvenssin monistuminen ja määrittäminen tehdä samanaikaisesti. (Lee, Squirrel, Leslie & Brown 2009, 23.) Signaalit saadaan mitattaviksi reaaliaikaisessa-PCR – menetelmässä kahdella eri tavalla: Epäspesifisessä menetelmässä fluoresoiva väri kuten SYBR fluoresoi vapaana molekyylinä hyvin heikosti, mutta fluoresenssi voimistuu voimakkaaksi värin sitoutuessa kaksisäikeisen DNA:n emästen väliin sekvenssistä riippumatta. Sitoutumaton väri ei fluoresoi merkittävästi ja näin signaalin määrä korreloi DNA:n määrää. SYBR detektiota käytetään

analysoitaessa yhtä tuotetta/monistusreaktio. Spesifisen menetelmän fluoresoivat koettimet (engl. probe) ovat kopioitavalle kohteelle komplementaarisia, pieniä, fluoresoivasti leimattuja DNA-pätkiä. Detektio on sekvenssispesifinen. Koettimena voi toimia DNA- tai RNA-jakso tai synteettinen oligonukleotidi. Esimerkkinä koettimista on Molecular Beacon, joka on kaksoisleimattu (reportteri ja sammuttaja) hiuspinnirakenteen vapaana muodostava koetin. Sitoutuessaan DNA:han koetin aukeaa ja sammuttaja siirtyy kauemmas reportterista, jolloin fluoresenssi voimistuu. Syntyvää fluoresenssia mitataan joka syklin jälkeen, joten tuotteen monistumista voidaan seurata reaaliajassa. (Suominen ym. 2013, 168, 195; Porkka 2009.)

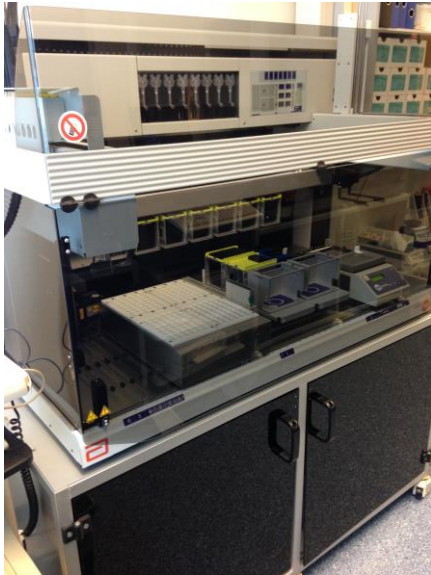
Reaaliaikainen seuranta edellyttää mittaamiseen kykenevää laitteistoa. Detektio mahdollistuu halogeenilampun tai LED:ien avulla, jotka tuottavat fluorokromin tarvitseman herätevalon. Herätevalosta ja fluoresenssivalosta suodatetaan oikea aallonpituus filtereillä, jolloin saadaan spesifinen signaali tietokoneohjelman mitattavaksi ja analysoitavaksi. Reaaliaikainen PCR on menetelmän erittäin herkkä ja pienikin määrä lähtömateriaalia riittää. Käytössä on suljettu systeemi, jonka vuoksi kontaminaatoriskit ovat vähäisemmät. (Sails 2009, 177; Suominen ym. 2013, 167; Porkka 2009.)

### 3.3 Nukleiinihappoeristysautomaatin toimintaperiaate

Nukleiinihappoeristyksessä käytetään Abbott m2000sp -laitetta (kuva 5). Eristysohjelmanä on CTNG (*Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae*) -protokolla ja reagensseina Sample Preparation System DNA -eristyskitti. Eristysohjelmaa ohjaa Abbott m2000sp-laitteella automaattinen tietokoneyksikkö. Automatiikka pipetoi reaktioputkiin magneettipartikkelit, jotka ovat silikapäällysteisiä rautaoksidipartikkeleita sekä lyysausliuoksen. Tämän jälkeen reaktioputkiin pipetoidaan näytteet. Laite siirtää reaktioputket inkubaatioyksikköön lämmitykseen. Inkubaation aikana solut hajoavat ja DNA vapautuu ulos solusta. Inkubaation jälkeen DNA sitoutuu silikapäällysteisiin magneettipartikkeleihin. Reaktioputket siirtyvät magneettiyksikköön ja magneettiset partikkelit siirtyvät tiiviisti reagenssiputken reunaosaan magneetin vetäminä. Lyysispuskuri, joka sisältää liuenneet solunjäänteet voidaan pipetoida nyt jäteastiaan. Reagenssiputkitelinettä siirretään vuorotellen magneettiselle ja ei-magneettiselle alueelle. DNA pestään ei-magneettisella alueella pesupuskureilla 1 ja 2, joista pesupuskuri 1 on kaotrooppinen suola ja pesupuskuri 2 on vesi. Pesupuskuri voidaan imeä pois magneettisella alueella, jossa partikkelit ovat kiinnittyneinä reagenssiputkien seinämään. Eluointiliuos lisätään viimeisen pesun



jälkeen. Tämä irrottaa DNA:n magneettipartikkelien pinnalta. Reaktioputket siirtyvät vielä kerran magneettiselle alueelle ja silloin pelkät magneettipartikkelit, ilman DNA:ta siirtyvät putken reunaan. DNA:ta sisältävä liuos voidaan nyt siirtää syvälle kuoppalevyille (deep well plate). Eristysohjelma loppuu tähän ja kuoppalevy suojataan muovikalvolla ja voidaan siirtää jääkaappiin odottamaan jatkotoimenpiteitä. (Abbott Molecular Inc. 2005.)



KUVA 5. Abbott m2000sp-esikäsitelyautomaatti

### 3.4 Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay (Seegene) -testi

Allplex™ GI(Gastrointestinal)-Bacteria(I) Assay on CE-merkitty ja IVD hyväksytty kvalitatiivinen testi. Testin multiplex RT-PCR ominaisuuden avulla voidaan tunnistaa samasta näytteestä yhdellä PCR-ajolla useita eri bakteeripatogeenia. Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay testipaneelilla ulostenäytteestä voidaan tunnistaa *Shigella spp./Enteroinvasiivinen Escherichia coli (EIEC)*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Clostridium difficile toxin B*, *Aeromonas spp.*, ja *Salmonella spp.* (Seegene 2016a.)

Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay -menetelmä perustuu MuDT™ (Multiple Detection Temperatures) PCR-teknologiaan. Menetelmä on esitelty ensimmäisen kerran vuonna 2014. Menetelmän avulla voidaan RT (real time)-PCR-laitteella tunnistaa useita patogeenia yhden fluoresenssikanavan kautta. Multiplex RT-PCR-menetelmällä on mahdollista kaikkien kohdemikrobityypin nukleinihappojen ja sisäisen kontrollin samanaikainen monistaminen, detekointi ja erittely (Fimlab Laboratoriot Oy 2016f; Seegene 2016b.)

### 3.5 Amplidiag® Bacterial GE (Mobidiag) -testi

Amplidiag® Bacterial GE on reaaliaikainen multiplex PCR-menetelmä, kahdeksan ripu-  
lia aiheuttavan bakteeripatogeenin nukleinihapon osoittamiseen. Testi on valmistajan  
koestama, CE-merkitty ja IVD hyväksytty. Multiplex PCR-menetelmässä on useita eri  
DNA-jaksoille spesifisiä alukkeita eli näytteestä tutkitaan usean taudinaiheuttajan esiin-  
tymistä samanaikaisesti. Testipaneeliin sisältyvät bakteerit ovat: *Campylobacter* (lajit *je-  
juni, coli*), *Salmonella spp.*, *Shigella/EIEC* (Enteroinvasiivinen *E.coli*), *Yersinia* (lajit *en-  
terocolitica, pseudotuberculosis, pestis*), *EHEC*, *ETEC*, *EAEC* ja *EPEC*. Testi vaatii ka-  
libroinnin, jota varten on erillinen kalibrointiohje. Kalibroinnin avulla analyysiohjelma  
tulkitsee tulokset. Kalibraatio on voimassa aina tietyn ajanjakson, jonka jälkeen se tulee  
uusia. (Mobidiag 2016.)

Tutkimuspakkaus sisältää reagenssit kolmelle eri multiplex-reaktiolle. Reagenssit ja  
kontrollit (positiivinen ja negatiivinen) ovat käyttövalmiita. Valmistajan ohjeen mukaan  
tärkeimpiä etuja Amplidiag® Bacterial GE-testille on korkea suoritusteho, helppo tulos-  
ten tulkinta ja nopea läpimenoaika (yhteensä noin kolme tuntia). (Mobidiag 2016.)

## 4 TYÖSKENTELYN ERITYISPIIRTEITÄ MOLEKYYLIBIOLOGIAN LABORatoriossa

PCR-menetelmät ovat erittäin herkkiä kontaminaatiolle, erityisesti silloin, kun monistetavaa nukleinihappoa on tutkittavassa näytteessä vähän. Kontaminaatio tarkoittaa pientä DNA-määrää, joka on peräisin muualta kuin monistettavasta näytteestä. Kontaminaation seurauksena voi aiheutua väärä positiivinen tulos, joka voi edelleen johtaa jopa väärään sairausdiagnoosiin. Laboratoriossa saattaa olla edellisistä reaktiosta peräisin olevia tuotteita ja tällaisen tuotteen joutuessa PCR-reaktioputkeen kontaminoiva DNA:kin monistuu. Tällöin alkuperäinen DNA saattaa tulla syrjäytetyksi kokonaan reaktiossa. (Suominen ym. 2013,165.)

Fimlabin molekyylibiologian laboratoriossa reaktioseokset valmistetaan erillisessä puhdistilassa, joka on erillään PCR-tuotteiden käsittelytilasta. Puhdistilassa saa työskennellä vain siihen koulutettu henkilökunta ja sinne kuljetaan sulkutilan kautta. Sulkutilassa puetaan yleinen puhdistilatakki, vaihdetaan omat työkengät puhdistilassa käytettäviin kenkiin ja laitetaan suojakäsineet. Kuljettaessa sulussa toisen oven on oltava suljettu ennen kuin avataan toinen ovi. Puhdistilaan ei saa viedä mitään ylimääräistä tavaraa, joka ei ole tarkoitettu puhdistilaan, eikä puhtaan huoneen välineitä siirrellä myöskään likaiseen tilaan tarpeettomasti. Puhdistilaan ei myöskään viedä mitään RNA:ta sisältäviä tuotteita eikä PCR-tuotteita. Työskentelyssä noudatetaan huolellisuutta ja toimitaan järjestelmällisesti. Kaikki tarvittavat tarvikkeet kootaan valmiiksi ennen työskentelyn aloittamista.

Puhdistilassa sijaitsevat reagenssit on jaettu mahdollisimman pieniin käyttötilavuuksiin omiin putkiinsa. Siten reagenssien sulatus käy helpommin eikä uudelleensulatuksia tarvitse tehdä niin montaa. Sulatus saattaa heikentää reagenssien toimivuutta erityisesti alukkeiden osalta. Päivän ensimmäinen työntekijä puhdistilassa huolehtii, että kaikki käytettävät välineet, pipetit, kärkilaatikoiden päällystöt sekä työskentelyssä käytettävät pinnat puhdistetaan A12t®:llä eli 80 % etanolilla pyyhkien ennen työskentelyn aloittamista. Etanolipyyhintä poistaa mekaanisesti UV-valon hajottamat nukleinihapot ja myös muut epäpuhtaudet.

Yleinen PCR-työskentelyn kontaminaatiolähde on työssä käytetyt mikropipetit. Pipetoitaessa syntyy aerosoleja, joissa on pieniä määriä DNA:ta. Edellisen pipetoinnin jäljiltä

pipetin sisäosiin joutuneet DNA-molekyylit saattavat joutua seuraavassa pipetoinnissa reaktioputkeen. Tämän vuoksi pipetoinnissa pitäisi käyttää erityisiä PCR-pipetinkärkiä, joissa suodatin estää aerosolien kulkeutumisen tai positiivikorvauspipettejä, joissa kärjen nesteen yläpuolella oleva ilmatila ei ole kosketuksessa pipetin rungon ja männän kanssa. On myös muistettava kärkien vaihto. PCR-työskentelyssä tulisi olla omat pipettisarjansa, joita ei käytetä muuhun työskentelyyn. (Suominen ym. 2013, 166.)

Putkia avattaessa syntyy pieniä määriä aerosoleja, jonka vuoksi valmiit reaktioputket saa avata sitten, kun putken reunoille ja tulppaan tiivistynyt neste on sentrifugoitu putken pohjalle mikrosentrifugilla. PCR-reagensseja valmistettaessa ne jaetaan pieniin eriin ja yhtä erää käytetään ainoastaan kerran. Ylimäärä reagenssia heitetään pois reaktioiden valmistamisen jälkeen, eikä yhteisreagensseja suositella käytettäväksi. (Suominen ym. 2013, 166.) PCR-työskentely vaatii monta erillistä tilaa. Näytekäsittely tehdään näyttemateriaalista riippuen bakteriologian tai molekyylibiologian tiloissa. PCR-reaktioseos puhdistilassa, templaatin lisäykset molekyylibiologian vetokaapissa ja DNA:n detektoiminen omassa laitehuoneessaan.

PCR-diagnostiikkaa tekevät huolehtivat työskentelytilojen siivoamisesta päivän lopuksi. Tasot pyyhitään ensin Virkon® S:llä, jonka desinfiointiteho perustuu patentoituun hapeutusreaktioon. Tämän jälkeen pipetit ym. käytössä olleet tavarat pyyhitään RNase AWAY-puhdistusliuoksella. Lopuksi pyyhitään aina vielä A12t®:llä kaikki välineet ja pinnat. Lian sidonta ja poisto tehdään puhtailla työvälineillä edeten puhtaimmasta likaiseen. Siivoamisajankohta on suunniteltu esimerkiksi puhdistilassa siten, että ensimmäinen ja viimeinen käyttäjä huolehtii siivoamisesta päivittäin. Viimeinen puhdistilan käyttäjä tuo myös roskat tullessaan sekä laittaa UV-valot päälle puhdistilaan.

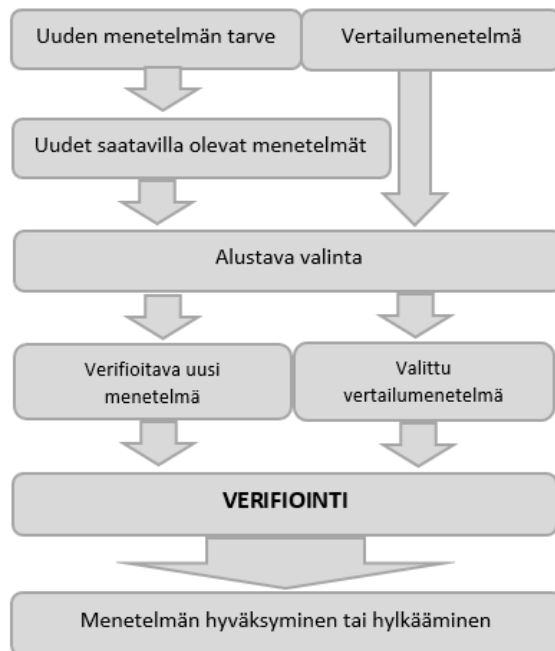
## 5 MENETELMÄN VERIFIOINTI

Laboratorion tulee käyttää ainoastaan validoituja menettelyjä voidakseen varmistaa, että tutkimusmenettelyt ovat käyttötarkoitukseen sopivia (Heikkilä 2008). Validoinnin tarkoituksena on osoittaa menetelmän kelpoisuus. Validoinnin ja verifioinnin avulla varmistetaan, että käyttöönotettava menetelmä tuottaa luotettavia ja toistettavia tuloksia. (Liimatainen 2002.) Verifioinnilla osoitetaan menetelmän toimiminen omassa laboratoriossa omalla materiaalilla odotetusti. Verifiointiin sisältyy tutkimukset ja niistä tehdyt dokumentaatiot. Prosessina verifiointi on yleensä paljon kevyempi ja nopeampi menettely kuin validointi. (Heikkilä 2008.)

Menetelmän toimivuutta seurataan validoinnin ja verifioinnin lisäksi sisäisten kontrollien ja ulkoisten laadunarviointinäytteiden avulla (Liimatainen 2002, 12–13). Validointi tai verifiointiraportista selviää, mitä on testattu, testauksen ajankohta, miten testaus on tehty sekä saadut tulokset ja johtopäätökset. Raportissa otetaan kantaa mittausepävarmuustekijöihin ja siitä selviää, onko menetelmä kelvollinen aiottuun tarkoitukseen sekä milloin se voidaan ottaa käyttöön. (Heikkilä 2008.)

## 5.1 Verifiointin eri vaiheet

Kuviossa 1. on esitetty verifiointin vaiheet Ikäheimon (2002, 13–14) artikkelin pohjalta. Verifiointiprosessi käynnistyy laboratoriossa uuden menetelmän tai laitteen tarpeen myötä. Uudet saatavilla olevat menetelmät tai laitteet kartoitetaan käyttäen apuna kirjallisuutta. Alustavan valinnan aikana valitaan myös vertailumenetelmä. Verifiointissa on uuden menetelmän tai laitteen ja valitun vertailumenetelmän annettava yhteneväiset tulokset. Tuloksiin ja johtopäätöksiin perustuen tehdään valinta uuden menetelmän käyttöönottamiseksi.



KUVIO 1. Verifiointin vaiheet (Ikäheimo 2002, 14)

## 6 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Antikaisen ym. julkaisemassa artikkelissa ”A Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of 9 Pathogens Directly From Stools of Travelers With Diarrhea” esitellään kolme eri multiplex-qPCR-menetelmää. Ulostenäytteestä voidaan menetelmien avulla tunnistaa 9 patogeenista bakteeria: *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobakteeri*, *Vibrio cholera*, *Shigella*, enteroinvasiivinen *E.coli*, enterohemorraaginen *E.coli*, enterotoksinen *E.coli* (ETEC), enteroaggregatiivinen *E.coli* (EAEC) ja enteropatogeeninen *E.coli* (EPEC). Menetelmän validoinnissa aineistona käytettiin positiivisia (n= 245) ja negatiivisia (n= 243) kontrollikantoja sekä ulostenäytteitä, jotka olivat referenssimenetelmällä vastattu positiivisena tai negatiivisena. Lisäksi tutkimuksessa aineistona käytettiin 96 ulostenäytettä, jotka oli kerätty ripulioireisilta äskettäin matkalta palanneilta henkilöiltä. Löydöksiä verrattiin rutiinidiagnostiikan testien löydöksiin. PCR-pohjaisen menetelmän tuloksena bakteerikontrollikantojen herkkyys ja spesifisyys oli 100 %. Matkaripulioireisten ulostenäytteistä EPEC löytyi 47 %, EAEC 46 %, ETEC 22 % ja salmonella 2 %. Useita patogeeneja löytyi 37 näytteestä. Vähintään yksi patogeeni löytyi 76 %:lta matkaripulioireisista. Rutiinimenetelmä löysi patogeeneja vain 17 %:lta. Yleisimmät löytyneistä bakteereista olivat: EPEC, EAEC ja ETEC. Artikkelin mukaan uudella qPCR-menetelmällä on monia etuja: Menetelmällä voidaan tunnistaa samanaikaisesti 9 ripulia aiheuttavaa patogeenista bakteeria. Menetelmän suoritukseen kuluu aikaa neljä tuntia (rutiinidiagnostiikassa oleviin menetelmiin kuluu 1-7 päivää) ja yhdessä ajossa voidaan analysoida 48 näytettä. (Antikainen, Kantele, Pakkanen, Lääveri, Riutta, Vaara & Kirveskari 2013, 1300–1307.)

Artikkelissa ”Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species in fecal samples” Wiemer ym. esittelevät reaaliaikaisen multiplex-PCR-menetelmän, jonka avulla voidaan tunnistaa ripulia aiheuttavia bakteereita ulostenäytteestä. Menetelmällä voidaan tunnistaa *Campylobacter jejuni*, *salmonella*, *Shigella*/enteroinvasiivinen *E.coli* EIEC ja *Yersinia* laji samassa määrittämisessä. Tutkimuksen aineistona oli 137 kontrollikantaa ja 393 kliinisestä diagnostiikasta rutiinimenetelmin diagnosoitua ulostenäytettä. Reaaliaikaisen multiplex-PCR-menetelmän tuloksia verrattiin käytössä olevilla mikrobiologisilla menetelmillä saatuihin tuloksiin. PCR-tulokset saatiin kolmen tunnin kuluessa. PCR-menetelmällä löydettiin 79 *Campylobacter jejunia* 81:stä (97,5 %), 71 *Salmonellaa* 74:stä (96 %), 8 *Shigellaa* 8:sta (100

%) ja 10 *Yersinia* 10:stä (100 %) kliinisesti diagnosoiduista ulostenäytteistä. Viljely-negatiivisista näytteistä PCR-menetelmä löysi 2 *Shigellaa*, 1 *Salmonellan*, ja 5 *Campylobacter jejunia*. Artikkelin mukaan menetelmän etuja ovat luotettavat tulokset lyhyessä ajassa. (Wiemer, Loderstaedt, Wulffen, Priesnitz, Fischer, Tannich & Hagen 2011, 577–584.)



## 7 TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT

Fimlabin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa on tavoitteena tulevaisuudessa käyttää akuutin ripulin bakteeripatogeenien analysoinnissa PCR-pohjaista bakteerien tunnistusmenetelmää. Tällä hetkellä käytössä on viljelymenetelmiin perustuvat tutkimukset.

Opinnäytetyön tarkoituksena on testata kahden eri valmistajan Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay (Seegene) ja Amplidiag® Bacterial GE (Mobidiag) kaupallista PCR-menetelmää ja verrata niiden antamia tuloksia käytössä olevan viljelymenetelmän tuloksiin. Testattavat PCR-menetelmät ovat valmistajan koestamia, CE-merkittyjä ja IVD-hyväksytyjä, jolloin laboratorion laatu järjestelmän mukaisesti suppeampi koestus (verifiointi) riittää. Omana tavoitteena on saada samalla käyttökokemusta molekyylibiologisista menetelmistä.

Opinnäytetyön tehtävät

1. Kuinka yhdenmukaisia PCR-menetelmillä ja viljelymenetelmällä saadut tulokset ovat keskenään?
2. Kumpi PCR-menetelmistä on käyttöominaisuuksiltaan parempi?

## 8 OPINNÄYTETYÖN MENETELMÄT

Tutkimusotteet voidaan karkeasti jakaa kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen tutkimukseen. Tutkimusotteen valinta riippuu tutkittavasta ilmiöstä. Uuden ilmiön hahmottamisessa käytetään kvalitatiivista eli laadullista tutkimusta. Laadullisen tutkimuksen aineisto perustuu kirjoitettuihin teksteihin ja puheisiin. Se ei tavoittele absoluuttista, objektiivista totuutta kvantitatiivisen tutkimuksen tapaan. Kvantitatiivisen eli määrällisen tutkimuksen edellytyksenä on ilmiöön vaikuttavien tekijöiden tunteminen. Tutkittava ilmiö on määritettävä niin hyvin, että sitä voidaan mitata kvantitatiivisin tutkimuksen menetelmin. Mittauksia ei voida suorittaa, jos ei tiedetä mitä mitataan. Kvantitatiivisen tutkimuksen tavoitteena on tuottaa perusteltua, luotettavaa ja yleistettävää tietoa. (Kananen 2011, 12–14; Kananen 2008, 10.) Opinnäytetyöni on kvantitatiivinen ja vertaileva tutkimus. Työväni vertailen kahden eri molekyylibiologian menetelmän antamia tuloksia nykyisin käytössä olevan viljelymenetelmän tuloksiin. Opinnäytetyössä on myös kvalitatiivisen tutkimuksen piirteitä. Omana tavoitteenani on saada käyttökokemusta PCR-menetelmistä.

Kvantitatiivisen tutkimuksen edellytyksenä on ilmiön tunteminen, aiemmat teoriat ja mallit, joiden kautta syntyy esiyymmärrys tutkimusongelmasta. Tutkimusongelmasta johdetaan tutkimustehtävät, joihin saadaan vastaukset aineiston avulla. Aineiston keruu ja koejärjestelyt on tärkeää suunnitella siten, että havaintoaineisto soveltuu määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen. Otanta voidaan tehdä monin eri tavoin. Otoskoko vaikuttaa tulosten tarkkuustavoite. Sitä suurempi otos on otettava, mitä tarkemmin otoksen avulla saatujen tulosten halutaan vastaavan perusjoukon lukuja. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 1997, 140, 180; Kananen 2011, 27–28.) Kliinisen mikrobiologian laboratoriossa molekyylibiologiset menetelmät haastavat nykyiset käytössä olevat viljelymenetelmät mahdollistaen nopeammat vastausajat. Tarve uuden menetelmän käyttöönottamiseksi määritteli tutkimuksen tavoitteen, tarkoituksen ja tutkimustehtävät. Teoriatausta rakentuu nykyisestä viljelymenetelmästä ja koestettavista molekyylibiologisista menetelmistä.

Tutkimuksen luotettavuuden arvioinnissa käytetään validiteetti- ja reliabiliteettikäsitteitä. Validiteetti (validity) eli pätevyys tarkoittaa tutkimusmenetelmän kykyä mitata sitä, mitä tutkimuksessa on tarkoituskin mitata eli oikeita asioita tutkimusongelman kannalta. Systemaattisia virheitä ei saisi olla. Reliabiliteetti (reliability) eli luotettavuus tarkoittaa tulosten tarkkuutta ja mittaustulosten toistettavuutta. Saadut tulokset eivät johdu sattumasta, vaan käytetty mittari tuottaa samat tulokset eri mittauskerroilla. (Kananen 2011,

118–119 & Vilka 2015, 193–194.) Opinnäytetyön reliabiliteetin arviointi perustuu useisiin PCR-ajoihin. Samoja näytteitä ei pystytty resurssien puuttumisen takia toistamiseen määrittämään. Eri näytteillä toistui kuitenkin samanlaiset määritykset useaan kertaan. Validiteetti koestettaville menetelmille on jo valmistajan hankkima. Kumpikin koestettavista menetelmistä on validoitu. Opinnäytetyön validiteettia arvioitaessa saatuja mittaus-tuloksia verrataan käytössä olevaan tietoon mitattavista tuloksista.

Kvantitatiivinen tutkimus selvittää määriä, riippuvuuksia ja syuseuraussuhteita. Tilastollisen päättelyn perustana on ajatus, että saadut tulokset voidaan yleistää koskemaan perusjoukkoa, josta on poimittu havaintoyksiköt. Tulosten tilastolliset jakaumat toistuvat ja vastaavat perusjoukon jakaumia. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa joudutaan usein tyytymään suppeaan osaan perusjoukkoa eli otokseen, jonka avulla tehdään johtopäätökset. (Kananen 2011, 85.) Otoksen koon ( $n=170$ ) määritti kahteen nukleiinihappojen eristykseen tarvittavien näytteiden määrä sekä testausta varten tilattujen PCR-kittien määrä. Otokseen pyrittiin saamaan mahdollisimman paljon positiivisia näytteitä mukaan.

## 9 KOKEELLISEN OSUUDEN TOTEUTUS

### 9.1 Näytteiden kerääminen ja valmistelu

Koestuksessa käytettävän aineiston keräys aloitettiin kliinisen mikrobiologian ulosteviljelytyöpisteessä koestusta edeltävällä viikolla huhtikuun 2016 alussa. Ulosteviljelytyöpisteessä säilytetään primääriulostenäytteitä viikon ajan näytteiden viljelystä lukien jääkaappilämpötilassa. Koestukseen tarvittava näytemäärä oli noin 170 ulostenäytettä. Näytteiksi koestukseen kelpasi ulostetta näytepurkissa. Näytteiden käsittely tehtiin kahdessa osassa. Siten saatiin kerättyä riittävä näytemäärä koestusta varten. Näytteet järjesteltiin näytenumeron mukaisesti pienemmästä numerosta suurimpaan ja laadittiin taulukko, jonka avulla viljelyvastaukset saatiin haettua taulukkoon laboratoriossa käytettävästä C5LIMS ATK-järjestelmästä. Osalla näytteistä ei ollut viljelyvastausta, koska jatkotutkimukset olivat vielä kesken tai vastaus oli annettu alustavana ja tarkempi bakteerin nimi oli tulossa myöhemmin jatkotutkimusten valmistuttua. Nämä puutteelliset vastaukset kirjattiin taulukossa alustavina tuloksina, joihin palattaisiin myöhemmin. Tarkkaa ajankohtaa näytteiden esikäsittelyn suorittamiseksi ei vielä tässä vaiheessa ollut. Tämän takia näytteet siirrettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n pakastimeen säilytettäväksi. Koestuksen suunnittelua jatkettiin tehdyn taulukon avulla. Ensimmäiseen eristysajoon tarvittiin 94 ulostenäytettä. Eristysajoon valittiin mukaan kaikki ulostenäytteet, joista viljelymenetelmällä oli löytynyt patogeeninen bakteeri. Loput ensimmäiseen eristykseen tarvittavista näytteistä valittiin summittaisesti.

Näytteiden esikäsittely tehtiin Abbott m2000sp -pipetointiautomaatilla, joka mahdollistaa DNA:n ja RNA:n eristyksen ja puhdistuksen. Eristysajoa varten näytteet siirrettiin TE (Tris-EDTA)-puskuriputkiin. Pakastetut ulostenäytteet sulatettiin. Sulaneita näytteitä käsiteltiin vetokaapissa kastamalla puolet pumpulitikun päästä ulostenäytteeseen ja sekoittamalla näytetikkoa TE-puskuriputkeen. Abbott m2000sp -pipetointiautomaatti tarvitsee näytteiden identifioimiseen viivakoodillisen näytetarran. Jokaista yksittäistä ulostenäytettä käsiteltäessä numeroitiin samalla TE-puskuriputki viivakoodillisella näytenumerotarralla, joka voidaan yhdistää näytteeseen. Ensimmäisessä eristysajossa näytteiden numeroiksi tuli 1–96, joista 94 ensimmäistä näytenumeroa vastasivat potilasnäytteitä ja kaksi viimeistä näytenumeroa kuului ainoastaan TE-puskuria sisältäville reagenssiputkille, joiden tilalle PCR-ajossa laitettaisiin positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Puskuri-

putket sekoitettiin koeputkiravistelijalla näytteiden siirrostamisen jälkeen. Näyttemateriaalin laskeutuessa putken pohjalle havaittiin putkien sisältävän liikaa näytettä ja sen vuoksi poistettiin ylimääräinen näytesakka puskuriputken pohjalta. Eristysajossa pipetointiautomaatin kärjet saattavat tukkeutua liiallisesta näyttemateriaalista, jolloin eristysautomaatti jättää kyseisen näytteen pipetoimatta. Pipetointiautomaatti sekoittaa näytteet eristysajossa ennen näytteiden pipetointia, joten uutta putkien sekoitusta ei enää tarvittu.

Koestus jatkui seuraavalla viikolla toisella eristysajolla. Toiseen eristysajoon valittiin uudelleen näytteet, joista oli saatu ristiriitainen tulos ensimmäisessä ajossa PCR-menetelmällä viljelymenetelmään verrattuna. Näytteitä oli nyt kerättyä ulostelaboratoriossa enemmän kuin ensimmäisen testauksen aloituksessa. Tämä mahdollisti myös suuremman viljelymenetelmällä positiiviseksi tulleiden näytteiden määrän ja saannin koestusta varten. Jokaiselle näytteelle haettiin näytenumeron avulla ATK-järjestelmästä viljelyvastaus, joka kirjattiin uuteen Excel-taulukkoon. Mukaan saatiin myös yksi laaduntarkkailunäyte. Näytelaimennokset tehtiin TE-puskuriin ja samalla numeroitiin näytteet viivakoodillisilla tarroilla, joissa olivat numerot 97–100 ja 1–90. Vastaavat numerot siirrettiin kunkin näytteen kohdalle taulukkoon. Laimennoksia TE-puskuriin tehtäessä otettiin vähemmän ulostenäytettä pumpulitikkuun kuin ensimmäisellä kerralla. Kaksi viimeistä näyteputkea sisälsi pelkkää TE-puskuria. Nämä näyteputket varasivat eristysajossa PCR-ajoon tarvittaville kontroleille paikat.

## 9.2 Nukleiinihappoeristys

Näytteiden esivalmistelun jälkeen käsittelyyn tulevat näyteputket laitettiin Abbott m2000sp -laitteen näyteputkitelineisiin siten, että viivakooditarra oli laitteen luettavissa ja näytetelineet oikealla paikallaan. Automaattiin lisättiin riittävä määrä pipetinkärkiä telineissään, reaktioputkia ja kuoppalevy eluaattia varten. Eristys tehtiin CTNG-ohjelmalla, jossa käytetään Abbott mSample Preparation System DNA -reagensseja. Eristysreagenssikitti sisältää lyysispuskurin, kaksi pesuliuosta, mikropartikkelit ja eluointiliuoksen. Reagenssikittejä tarvittiin 96:n näytteen eristysajoa varten kaksi. Reagenssit kaadettiin huolellisen sekoittamisen jälkeen omiin viivakooditarroilla merkittyihin reagenssiasioihinsa. Pesupuskuri 2:een lisättiin absoluuttista etanolia siten, että reagenssiasia täyttyi yläosassa olevaan viivaan asti. Magneettipartikkeleita ja lyysisreagenssia käytettiin vain yksi pullo, muita reagensseja kaksi pulloa. Laitteen eristysohjelmaa käynnistettäessä tar-

kistettiin vielä, että kaikki näytteet, reagenssit ja tarvikkeet olivat oikeilla paikoillaan automaatissa. Eristysajo kesti kokonaisuudessaan n. 3,5 tuntia, jonka jälkeen eluaattilevy siirrettiin jääkaappiin odottamaan jatkokäsittelyä.

### 9.3 Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay – määrittämisen kulku

PCR-ajojen valmistelut aloitettiin Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay (Seegene) – ohjeen mukaisesti. Yhdellä Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay -tutkimuspakkauksella voidaan analysoida 48 näytettä. Kahden tutkimuspakkauksen avulla oli mahdollisuus 96 näytteen (mukana kontrollit) määrittämiseen samassa PCR-ajossa. Reagenssit säilytetään pakastettuna (-20 °C) ja käyttöön otetaan vain tarvittava määrä reagensseja kerralla. Testausta varten kaksi tutkimuspakkausta otettiin pakastimesta. Niistä positiiviset ja sisäiset kontrollit siirrettiin säilytettäväksi jääkaappiin. Loput pakkauksen reagenssit vietiin molekyylibiologiassa sijaitsevaan puhdistilaan, jossa valmistetaan reaktioseokset (engl. mastermix) erilaisia DNA- ja RNA-tutkimuksia varten. Puhdistilassa on pakastin, jossa säilytetään käyttöön tarvittava määrä reagensseja.

PCR-tutkimuksissa käytettävät reagenssi- ja näytemäärät voivat olla erittäin pieniä. Useat reagenssit ovat kalliita, ja niiden tarvittava määrä on laskettava hyvin tarkkaan kustannustehokkuutta ajatellen. On huomioitava, että reagenssimääriä laskettaessa mukana on myös pipetointivara. Reaktioseoksesta voi saada huolellisella pipetoinnilla enemmän määrittämiä tehtyä kuin mitä tutkimuspakkauksessa luvataan. Yhdestä Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay -tutkimuspakkauksesta saa valmistajan ohjeen mukaan reaktioseoksen 48 näytteelle. Jokaista ajoa varten tarvittava reaktioseos tulee tehdä erikseen. Tarvittava määrä saadaan kertomalla reaktioseokseen tulevien liuosten määrät näytteiden määrällä. Taulukon 1. mukaisesti reagenssitarve yhdestä tutkimuspakkauksesta laskettiin kertomalla 48:lla yhden näytteen tarvitsema reagenssimäärä: 5x GI-B(I) MOM 240 µl (5x48), 5x Anyplex PCR Master Mix 240 µl (5x48) ja RNase-free Water 480 µl (10x48). Reaktioseoksen pipetointi tehtiin kahdesta tutkimuspakkauksesta molekyylibiologian puhdistilassa näytteiden kontaminoitumisen minimoimiseksi puhtaisiin Eppendorf-putkiin.

TAULUKKO 1. Allplex™ GI-Bacteria (I) Assay -reaktioseos

Reaktioseos	Tilavuus ( $\mu$ l)/reaktio
5X GI-B(I) MOM	5
5X Anyplex PCR Master Mix (with UDG)	5
Rnase-free Water	10
Yhteensä	20

Tutkimuksen suoritusta jatkettiin molekyylibiologian laboratorion vetokaapissa lisäämällä reaktioseosputkeen 48  $\mu$ l sisäistä kontrollia. PCR-määrittystä varten näytteet ja reaktioseos pipetoidaan kuoppalevylle, joka voidaan asettaa PCR-laitteeseen. Automaattipipettiä apuna käyttäen pipetoitiin 20  $\mu$ l reaktioseosta jokaiseen kuoppalevyn 96 kuoppaan. Tämän jälkeen haravapipetillä pipetoitiin 5  $\mu$ l jokaista eristettyä näytettä omaan kuoppaansa pipetointisuunnitelman mukaisesti. Eristettyjen näytteiden eluaattilevy oli säilyvyyden parantamiseksi siirretty jääkaapista pakastimeen, josta se oli aamulla siirretty sulamaan jääkaappiin. Pipetoinnin jälkeen kuopat suljettiin tiiviisti korkeilla sitä mukaa, kun rivi oli pipetoitu valmiiksi kontaminaation estämiseksi. Viimeisen kuoppalevyn rivin kaksi viimeistä kuoppaa jätettiin pipetoimatta. Näistä kuopista toiseen pipetoitiin 5 $\mu$ l positiivista kontrollia ja toiseen 5 $\mu$ l negatiivista kontrollia, joka oli nukleaasivapaata vettä. Ennen siirtymistä PCR-laitehuoneeseen tuli tarkistaa, että korkit olivat tiiviisti kuoppien päällä. PCR-laitehuoneessa kuoppalevy sentrifugoitiin vielä levysentrifuugilla. Bio Radin CFX96™ Real - Time PCR-laitteesta (kuva 6) valittiin haluttu ajo-ohjelma ja järjestelmään syötettiin näytteiden ajolista, jonka jälkeen PCR-ajo voitiin käynnistää.



KUVA 6. Bio-Rad CFX96™ Real-Time System -laite

Eristetyn näytesarjan toisen osan testaus Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay -testillä suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäinen testaus. Kolmanteen testaukseen käytettiin kaikki jäljellä olevat reagenssit. Uuteen reaktioseokseen yhdistettiin edellisistä tutkimuspakkauksista ylimääräiseksi jääneet reagenssit. Reaktioseos saatiin riittämään vielä 63 näytteen määrittämiseen. Reagenssien pipetointi ja näytteiden ja kontrollien lisääminen tehtiin samalla tavalla kuin edellisilläkin kerroilla.

#### 9.4 Amplidiag® Bacterial GE – määrittämisen kulku

Toinen testattavista menetelmistä oli Amplidiag® Bacterial GE -testi. Ennen PCR-ajojen aloittamista CFX96™ Real- Time PCR-laitteelle oli tehtävä kalibrointiajo käyttäen erillistä kalibraatiokitteä. Kittipakkaus sisälsi neljä kalibraatioDNA-standardia, joita käytettiin ajossa näytteiden asemesta. Eri reaktioseoksia Amplidiag® Bacterial GE PCR -määrittämisessä tarvitaan aina kolme. Jokaisesta standardista tehtiin rinnakkainen määrittäminen kolmella eri reaktioseoksella. Negatiivisena kontrollina käytettiin nukleaasivapaata vettä.

Kalibraation jälkeen aloitettiin näytteiden PCR-ajot. Amplidiag® Bacterial GE-kitillä oli mahdollista tehdä 30 näytettä yhdellä kuoppalevyllä. Kuvion 2 mukaisesti jokaista yksittäistä näytettä pipetoitiin kolmeen kuoppaan, joissa oli eri reaktioseokset. Kuoppalevyn viimeisillä paikoilla olivat negatiivinen (Negative Control, NC) ja positiivinen (Positive Control, PC) kontrolli.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EC	EC	EC	8	8	8	16	16	16	24	24	24
B	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
C	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
D	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
E	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
F	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
G	6	6	6	14	14	14	22	22	22	NC	NC	NC
H	7	7	7	15	15	15	23	23	23	PC	PC	PC

Reaktioseos 1

Reaktioseos 2

Reaktioseos 3

NC=Negatiivinen kontrolli

PC=Positiivinen kontrolli

EC=Kontrollikanta

KUVIO 2. Amplidiag® Bacterial GE- pipetointikaavio

Käytössä oli kaksi tutkimuspakkausta. Yhdestä pakkauksesta sai valmistajan ohjeen mukaan tehtyä 96 määrittystä. Koska jokaiseen PCR-ajoon tuli negatiivinen ja positiivinen



kontrolli mukaan, oli heti alussa selvillä, ettei kahdella tutkimuspakkauksella pysty analysoimaan kaikkia näytteitä. Lisäksi jokaista PCR-ajoa varten olisi määrittäksessä pitänyt olla mukana tunnettu salmonella-kanta (Extraction Control, EC), jota määrittäksessä olisi käytetty kontrollina. Tämän salmonella-kannan paikka oli määritetty ensimmäiselle paikalle kuoppalevyllä. Kontrollikannan puuttuminen vaikutti ainoastaan kyseisen paikan tulokseen. Ensimmäiseltä paikalta ei siten saisi suoraan tulosta, jos paikalla olisi potilasnäyte. Näyte määritettäisiin kuitenkin samalla tavalla kuin muut näytteet. Tulokseksi tulisi siten ”failed” eli ohjelma hylkäisi paikan. Teimme päätöksen, ettei tätä valmistajan ohjetta noudateta, vaan tilalle laitetaan potilasnäyte, jonka tulos etsitään monistuskäyristä. Tällä tavalla saatiin mahdollisuus määrittää muutama näyte lisää.

Reagensseja säilytettiin pakastimessa, josta otettiin sulamaan tarvittava määrä. Taulukon 2. mukaisesti jokainen tutkimuspakkaus sisälsi reagenssit kolmea eri reaktioseosta varten. Jokaisessa reaktioseoksessa käytettiin samaa 2x PCR Master Mixiä, mutta Assay Mixejä oli kolme erilaista. Ne oli merkitty numeroilla 1–3. Ennen puhdistilaan menoa laskettiin reaktioseosten tarvittavat määrät. Yhtä reaktiota varten 2xPCR Master Mixiä tarvittiin 10 µl ja Assay Mixiä 5 µl. Näytteitä pystyi yhdellä kuoppalevyllä määrittämään 30. Kontrolleja oli positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Pipetointivara oli huomioitava reaktioseoksen tarvetta laskettaessa. Päädyttiin tekemään reaktioseos 35 näytteelle eli 2xPCR Master Mixiä tarvittiin 350 µl/reaktioseosputki ja Assay Mixiä 175 µl/reaktioputki. Ennen pipetointia steriileihin putkiin reagenssit sekoitettiin huolellisesti. Näitä reaktioseoksia tehtiin kolme (1,2 ja 3). Reaktioseokset pipetoitiin automaattipipetillä kuoppalevyllä jo puhdistilassa valmistajan antaman pipetointikaavion mukaisesti. Kuoppalevy tuotiin puhdistilasta pois näytteiden pipetointia varten.

TAULUKKO 2. Amplidiag® Bacterial GE reaktioseokset

Reaktioseos 1	Tilavuus (µl)/reaktio	Reaktioseos 3	Tilavuus (µl)/reaktio	Reaktioseos 2	Tilavuus (µl)/reaktio
2X PCR Master Mix	10	2X PCR Master Mix	10	2X PCR Master Mix	10
Assay Mix 1	5	Assay Mix 3	5	Assay Mix 2	5
Yhteensä	15	Yhteensä	15	Yhteensä	15

Näytettä lisättiin 5 µl jokaiseen kuoppaan käyttäen apuna haravapipettiä. Jokaisesta näytteestä pipetoitiin kolmeen eri kuoppaan, joissa oli kolmea eri reaktioseosta valmiina. Jokaisen kuoppalevyn yksittäisen rivin pipetoinnin jälkeen suljettiin kuopat korkeilla. Kuoppalevyn toiseksi viimeisiin kuoppiin pipetoitiin negatiivinen kontrolli ja viimeiseen positiivinen kontrolli. Valmis kuoppalevy sentrifugoitiin levysentrifuugilla ja siirrettiin PCR-reaktioita varten CFX96™ Real-Time PCR-laitteeseen. PCR-laitteesta valittiin oikea PCR-ohjelma ja käynnistettiin ajo. Ajon aikana syötettiin näytteiden näytenumerot laitteeseen oikeille paikoilleen ja tallennettiin tiedot. CFX96™ Real-Time PCR-laitteella käytettiin kaikissa PCR-ajoissa näytteille alussa annettuja juoksevia näytenumeroita. Saadut tulokset siirrettiin Excel-taulukkoon, jonka avulla jatkettiin tulosten käsittelyä.

## 10 MENETELMÄVERTAILUN TULOKSET

Analysoitujen ulostenäytteiden kahden ajon kokonaismäärä oli 168. Näytteet oli aikaisemmin tutkittu viljelymenetelmällä ja ne identifioitiin uudelleen numeroilla 1-94. Näytteitä käsiteltiin eristysvaiheessa kahdessa eri osassa. Jokaiselle näytteelle suoritettiin samanlainen esikäsitely ja testattiin Allplex™ GI-Bacteria (I) Assay – testillä, josta jatkossa käytän lyhennettä Allplex PCR-menetelmä. Amplidiag® Bacterial GE-testistä käytän lyhennettä Amplidiag PCR-menetelmä. Tätä testiä ei riittänyt kaikkien näytteiden testaamiseen. Viljelymenetelmällä ja Allplexin PCR-menetelmällä negatiivisen tuloksen antaneista näytteistä valittiin 10 näytettä, jotka jäivät Amplidiagin PCR-menetelmällä tekemättä. Tämän vuoksi Amplidiag PCR-menetelmällä testattavien näytteiden kokonaismääräksi jäi 158.

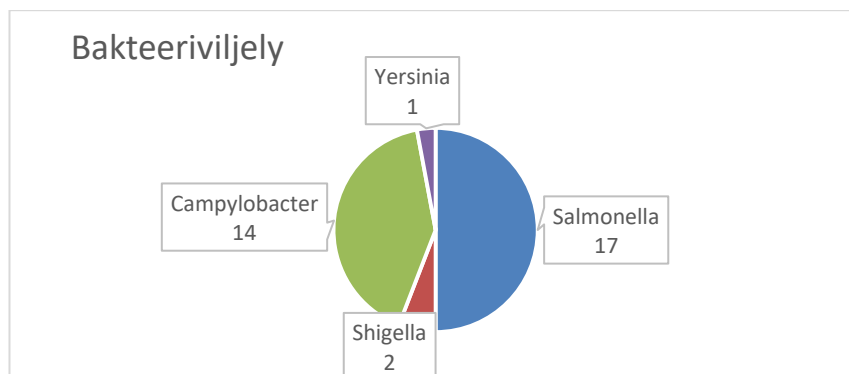
Viljelymenetelmällä positiivinen bakteriologinen tulos, jossa oli yhtä tai useampaa patogeenista bakteerilajia saatiin yhteensä 34 näytteestä. Näistä 30 näytteessä oli yhtä ja kahdessa näytteessä kahta eri bakteerilajia. Allplex PCR-menetelmällä positiivinen tulos, jossa havaittiin yhden tai useamman taudinaiheuttajan DNA:ta, saatiin 39 näytteestä. Näistä 35 näytteessä havaittiin yhtä ja kahdessa näytteessä kahta eri bakteerilajia. Amplidiag PCR-menetelmällä positiivisen tuloksen antoi yhteensä 35 näytettä. Näistä 33 näytteessä havaittiin yhtä ja yhdessä näytteessä kahta eri bakteerilajia.

Tulosten yhteenveto on esitelty taulukossa 3. Negatiivisia tuloksia oli saatu viljelymenetelmällä 136 näytteestä. Allplex PCR-menetelmä antoi negatiivisen tuloksen 126 näytteestä. *Clostridium diffile* löytyi kuudesta näytteestä. Näitä näytteitä käsitellään tässä työssä tulokseltaan negatiivisina, koska käytössä olevalla viljelymenetelmällä ei voida *C. difficileä* löytää. Amplidiag PCR-menetelmällä 115 näytettä oli tulokseltaan negatiivisia. Testi tunnistaa myös *EHEC*-kannan sekä ns. ripuli-*E.coli* – kannat (*ETEC*, *EAEC*, *EIEC* ja *EPEC*), joita löytyi yhteensä kahdeksasta eri näytteestä. Näitä suolistopatogeenisia *E.coli* – bakteereita ei voi nykyisellä ulosteviljely1- tutkimuksella löytää, joten myös niitä käsitellään tässä työssä negatiivisina näytteinä.

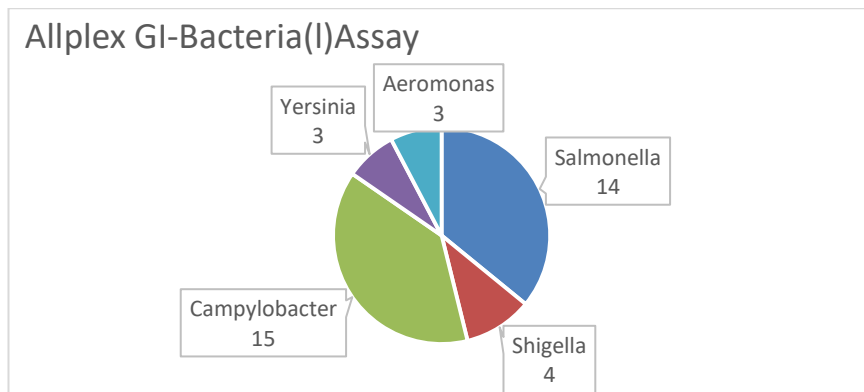
TAULUKKO 3. Yhteenvedo eri menetelmien tuloksista

	Viljelytulokset	Allplex™ GI-Bacteria(I)	Amplidiag®Bacterial GE
Salmonella	17	14	14
Shigella	2	4	2
Campylobacter	14	15	18
Yersinia	1	3	1
Aeromonas	0	3	0
Negatiivinen	136	133	123
Yhteensä	170	172	158

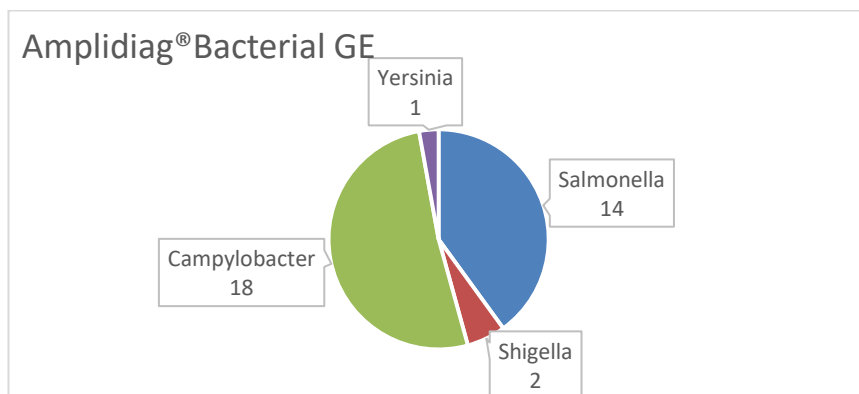
Menetelmäkohtaiset löydökset on havainnollistettu kuvioissa 4, 5 ja 6. Yleisimmät ulos-tenäytteistä löydettyt bakteerilajit olivat *Campylobacter* ja *Salmonella*. *Campylobacter* löytyi viljelymenetelmällä 14 näytteestä, Allplex PCR-menetelmällä 15 näytteestä ja Amplidiag PCR-menetelmällä 18 näytteestä. *Salmonellaa* löytyi eniten viljelymenetelmällä, yhteensä 17 näytteestä. Allplex ja Amplidiag PCR-menetelmät löysivät kumpikin 14 *Salmonellaa*. Tosin Allplex PCR-menetelmä löysi kaksi salmonelloista vasta uusinta-ajon kautta, kun näytteen määrää suurennettiin. *Shigella* löytyi sekä viljelymenetelmällä että Amplidiag PCR-menetelmällä kahdesta näytteestä. Allplex PCR-menetelmä löysi *Shigellaa* neljästä näytteestä ja *Yersinia* kolmesta näytteestä. Viljelymenetelmä ja Amplidiag PCR-menetelmä löysivät kumpikin yhden *Yersinia*-kannan. *Aeromonas* löytyi ainoastaan Allplex PCR-menetelmällä kolmesta näytteestä. Kaikilla menetelmillä löytyi yhdestä näytteestä kaksi eri bakteerilajia: *Salmonella* ja *Campylobacter*. Allplex PCR-menetelmä löysi lisäksi yhdestä näytteestä sekä *Shigellan* että *Campylobakteerin*.



KUVIO 3. Viljelymenetelmä löydökset



KUVIO 4. Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay -löydökset



KUVIO 5. Amplidiag® Bacterial GE -löydökset

### 10.1 Tulosten analysointi

Tulosten analysoinnissa on huomioitava, ettei kaikkia eri menetelmillä saatuja tuloksia voi verrata suoraan toisiinsa. PCR-menetelmillä oli erilaiset testipaneelit ja sen vuoksi osittain erilaiset löydökset kuin viljelymenetelmällä.

Viljelymenetelmässä käytetään salmonellan viljelyssä apuna seleniittirikastuslientä, joka suosii salmonellojen kasvamista. Tämä mahdollistaa salmonellojen suuremman löydösmäärän viljelymenetelmällä PCR-menetelmiin verrattuna. Viljelymenetelmällä saatiin 17 salmonellalöydöstä. Molemmat PCR-menetelmät tunnistivat 14 salmonellaa. Näistä kaksi näytettä olivat melko niukkoja viljelyn jäljiltä PCR-koestukseen otettaessa. Molemista tuli negatiivinen tulos kummallakin PCR-menetelmällä. Salmonellojen osalta viljely oli herkin menetelmistä.

PCR-menetelmät ilmoittavat tunnistamansa *Campylobacter* löydökset *Campylobacter spp*:nä. Allplex PCR-menetelmä tunnistaa *Campylobacter jejuni* ja *Campylobacter coli*, samoin Amplidiag PCR-menetelmä. Koestuksessa Amplidiag- menetelmä tunnisti myös *C. upsaliensis*, jota Allplex-menetelmä ei tunnistanut. PCR-menetelmillä *Campylobacter* löydöksiä oli enemmän kuin viljelymenetelmällä. Viljelymenetelmällä laji-tunnistus tehdään maldi-tofilla, jonka avulla voidaan apatogeeniset kampylobakteerilajit erottaa patogeenisista. PCR-menetelmien haittana on harvinaisten patogeenisten kampylobakteerilajien kuten *C. lari* jääminen tunnistamatta.

Amplidiagin PCR-menetelmässä patogeenisten yersinioiden tunnistaminen perustuu plasmidissa sijaitsevan virF-geenin tunnistamiseen. Menetelmä tunnistaa siten ainoastaan virulentit bakteerikannat. Positiivisia *Yersinia* tuloksia saatiin yksi sekä viljelymenetelmällä että Amplidiagin PCR-menetelmällä. Seegenen PCR-menetelmä tunnistaa *Yersinia enterocolitica*, joita menetelmällä löytyi kolmesta näytteestä. Menetelmä ei erottele virulenteja kantoja ei-virulenteista. PCR-menetelmillä saatiin enemmän *Yersinia*-löydöksiä kuin viljelymenetelmällä. PCR-positiiviset, mutta viljelynegatiiviset näytteet viljeltiin uudelleen ja *Yersinia*t saatiin tunnistettua myös maljoilta.

*Aeromonas* positiivisia näytteitä ei viljelymenetelmällä havaittu lainkaan. Allplex PCR-menetelmä löysi kolmesta näytteestä *Aeromonas*. Amplidiagin tunnistuspaneeliin *Aeromonas* ei sisälly. *Aeromonaksen* roolia suolistoinfektion aiheuttajana pidetään kiistanalaisena. Se voi kuitenkin joissakin tapauksissa aiheuttaa suolistoinfektion. Viljelymenetelmällä löydetty *Aeromonakset* vastataankin huomautuksella ”löydöksen kliininen merkitys epävarma”. Allplex PCR-menetelmä löysi siis *Aeromonakset*, joita ei viljelyssä havaittu.

*Shigellaa* löytyi viljelymenetelmällä ja Amplidiagin PCR-menetelmällä kaksi. Allplex PCR-menetelmällä saatiin jopa neljä shigellalöydöstä. Yksi Allplexin *Shigella* löydöksistä saatiin näytteestä, jolle menetelmät antoivat ristiriitaiset tulokset. PCR-menetelmät eivät erottele *Shigella spp:tä* ja *EIEC* (enteroinvasiivista *E.colia*) toisistaan.

Liitteenä on tulostaulukko positiivisista näytteistä. Taulukosta selviää, että muutamasta yksittäisestä näytteestä tuli ristiriitainen tulos eri menetelmien välillä. Näyte, josta viljelymenetelmällä oli saatu kaksi eri patogeenista bakteeria: *Salmonella* ja *Campylobacter*

määritettiin kaksi kertaa molemmilla PCR-menetelmillä. Allplex PCR-menetelmä antoi ensimmäisellä kerralla tulokseksi *Campylobacter* ja toisella kerralla *Campylobacter* ja *Salmonella*. Amplidiag PCR-menetelmällä ensimmäisen ajon tulokseksi saatiin *Salmonella* ja *Campylobacter* ja toisen ajon tulos oli *Campylobacter*. Salmonellan tunnistaminen siis vaihteli eri määritysten välillä.

Kaikilla vertailtavilla menetelmillä eri tuloksen sai yksi näytteistä, joka viljelymenetelmällä oli ollut negatiivinen. Allplex PCR-menetelmä antoi tulokseksi *Shigellan* ja Amplidiagin PCR-menetelmä kampylobakteerin. Harmillista oli, että kyseinen näyte oli määritettävänä viimeisissä sarjoissa, eikä mahdollisuutta uusintamäärityksille ollut.

Käyttöominaisuuksiltaan testeissä ei ollut suuria eroja. PCR-työskentely eteni ohjeita noudattaen. Amplidiag PCR-menetelmä tuli useiden toistojen kautta tutummaksi ja sitä kautta miellyttävämmäksi tehdä kuin Allplex PCR-menetelmä, jota tehtiin ainoastaan kolme kertaa.

## 11 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata kahden eri valmistajan kaupallista nukleiinihappojen osoitukseen perustuvaa tutkimuspakkausta. Testattavina olivat PCR-pohjaiset Allplex™ GI-Bacteria (I) Assay ja Amplidiag® Bacterial GE – tutkimuspakkaukset. Opinnäytetyön tehtävinä oli vertailla kuinka yhdenmukaisia PCR-menetelmillä ja käytössä olevalla viljelymenetelmällä saadut tulokset ovat keskenään sekä pohtia kumpi PCR-menetelmistä on käyttööminaisuuksiltaan parempi.

Opinnäytetyön aineisto rajautui 170 kliniseen näytteeseen, joista oli alun perin pyydetty F-BaktVi1- tutkimus. Näytteiden kerääminen oli aloitettu mikrobiologian laboratoriossa koestusta edeltävällä viikolla. Koestusta varten näytteet identifioitiin uudelleen numeroilla 1-94. Nukleiinihappojen eristys tapahtui Abbott m2000sp – eristysautomaatilla ja monistusreaktiot suoritettiin CFX-96™ Real-Time PCR-laitteella. Eristyksiä tehtiin kaksi sarjaa, joissa kummassakin käytettiin samoja näyttenumeroita. Tuloksia tulkittaessa oli huomioitava, että eri eristyssarjoissa olevilla näytteillä oli samoja näyttenumeroita.

Testien tulokset siirrettiin tulosten analysointia varten Excel-taulukkoon. Viljelymenetelmällä positiivisia löydöksiä oli yhteensä 34. Negatiivisia näytteitä oli viljelymenetelmällä vastattu 136. Allplex™ GI-Bacteria(I) PCR-menetelmällä saatiin 39 positiivista löydöstä ja 133 negatiivista näytettä. Amplidiag® Bacterial GE PCR-menetelmä löysi 35 positiivista löydöstä ja negatiivisia näytteitä oli 123. Tulokset olivat samansuuntaisia kuin Antikaisen ym. ja Wiemerin ym. julkaisemissa artikkeleissa.

Tutkimuspakkauksen positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä reaktioseoksen sisäinen kontrolli oli mukana jokaisessa PCR-ajossa. Tulokset voitiin hyväksyä, koska kaikki kontrollit toimivat ajoissa odotetulla tavalla. PCR-menetelmät osoittautuivat viljelymenetelmää herkemmiiksi *Shigellan*, *Yersinian* ja *Campylobacterin* kohdalla. *Salmonellan* tunnistuksessa viljelymenetelmä oli herkin johtuen salmonellan rikastamisesta ennen viljelyä. Kahdesta näytteestä tuli ristiriitaiset tulokset eri menetelmien välillä. Ensimmäinen ristiriitaisen tuloksen antaneista näytteistä määritettiin kahteen kertaan. Tässä näytteessä salmonellan tunnistaminen vaihteli PCR-menetelmien välillä. Toinen näyte oli viljelymenetelmällä jäänyt negatiiviseksi, mutta antoi PCR-menetelmillä ristiriitaiset tulokset. Amplidiagin reagenssien loppumisen ja koestukseen varatun ajan päättymisen vuoksi ei näytettä enää voitu määrittää uudestaan.



Testien suoritukset etenivät kunkin testin ohjeiden mukaisesti. Periaatteiltaan testit olivat samankaltaisia. Työskennellessä oli oltava huolellinen ja huomioitava yleiset PCR-työskentelyn ohjeet sekä muiden laboratorioissa työskentelevien aikataulut. Koestuksen suoritus pyrittiin sovittamaan siten, ettei rutiinianalytiikka häiriintynyt. Koestuksen aikana Amplidiagin testi tuli tutummaksi useiden PCR-ajojen kautta ja sain myös opetella PCR-ajon käynnistyksen CFX96-laitteelta. Miellyttäväksi testin suorituksen teki myös se, että reaktioseoksen sai pipetoida automaattipipetillä valmiiksi näytelevyn kuoppiin jo puhdistilassa. Amplidiagin testi oli siten käytettävyydeltään mielestäni parempi. Allplex-testin osalta PCR-ajon käynnistäminen CFX96-laitteelta jäi oudoksi. Tämän vuoksi en saanut kunnollista kokonaiskuvaa testin suorittamisesta.

PCR-diagnostiikan käyttöönoton avulla mahdollistuu tehokkaampi toiminta ja vastaukset saadaan nopeammin tutkimusten tilaajille. Nykyisellä viljelymenetelmällä vastausten saaminen vie 2-4 vrk, PCR-menetelmällä positiivinen vastaus on mahdollista saada saman päivän aikana. PCR-positiiviset tulee kuitenkin jatkossa viljellä maljoille tarkempaa lajinimeä ja antibioottiherkkyyttä varten. Tulevaisuudessa uuden menetelmän käyttöönotto vaatii myös työntekijöiden perehdytyksen. Osaamista molekyylibiologisten menetelmien suorittamisesta löytyy, sillä osa kliinisen mikrobiologian ulostediagnostiikasta tehdään jo nykyisin PCR-pohjaisilla menetelmillä. Eri tutkimusten nukleiinihappoeristykset voi olla mahdollista tehdä samalla kertaa, mikä tehostaa toimintaa. Markkinoilla on myös täysautomaatioon perustuvia laitteita, joihin ainoastaan ladataan näytteet ja reagenssit. Täysautomaatti tekee näytteen esikäsittelyn, nukleiinihappojen eristuksen ja – monistuksen sekä detektion.

Nukleiinihappojen osoitukseen perustuvan menetelmän valinnassa on huomioitava myös testien käyttöominaisuudet. Analysoitavien näytteiden määrä ja laitekapasiteetin riittävyys vaikuttaa testien hinnan lisäksi menetelmän valintaan. Allplex™ GI-Bacteria-testillä voi samassa ajossa analysoida 94 näytettä, kun taas Amplidiag® Bacterial GE-testillä on mahdollista analysoida 32 näytettä kerralla. Testipaneelit menetelmien välillä olivat erilaiset. Menetelmää valittaessa onkin pohdittava, mitä bakteeripatogeenia PCR-menetelmällä on tarpeen analysoida.

## LÄHTEET

Abbott Molecular Inc. 2005. Abbott m2000sp. Operations Manual.

Antikainen, J., Kantele, A., Pakkanen, S. H., Lääveri, T., Riutta, J., Vaara, M. & Kirveskari, J. 2013. A Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of 9 Pathogens Directly from Stools of Travelers with Diarrhea. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 11(10), 1300–1307.

Carlson, P. & Koskela, M. 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S & Vaara, M. (toim.) *Infektiosairaudet: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kirja 3. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016a. Toimintakäsikirja.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016b. *Campylobacter*, viljely. Ohjekirja.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016c. *Salmonella*, viljely. Ohjekirja.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016d. *Shigella*, viljely. Ohjekirja.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016e. Bakteeri, viljely 1 ulosteesta (tavallinen ulosteviljely). Ohjekirja.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016f. Ulosteen ripulivirukset, nukleinihappo. Ohjekirja

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016g. *Yersinia*, viljely. Ohjekirja.

Heikkilä, R. 2008. Biologisten menetelmien validointi. Luento. Finas-päivä 24.1.2008.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy.

Ikäheimo, I. 2002. Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifiointista. *Moodi* 1. 13–14.

Kananen, J. 2008. Kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylä: Jyväskylän Ammattikorkeakoulu.

Kananen, J. 2011. Kvantti- kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän Ammattikorkeakoulu.

Karhumäki, E., Jonsson, A. & Saros, M. 2009. Mikrobit hoitotyön haasteena. 2., uudistettu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Lee, M., Squirrel, D., Leslie, D & Brown, T. 2009. Homogenous Fluorescent Chemistries for Real-time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K & Saunders, N. (toim.) *Real-time PCR. Current Technology and Applications*. Great Britain: Cromwell Press, 23.

Liimatainen, O, 2002: Menetelmien validointi ja verifiointi Kliinisen mikrobiologian laboratoriossa: yleisiä periaatteita. Moodi 1. 12–13.

Mattila, L. & Järvinen, A. 2011. Maha-suolikanavan infektiot ja ripulitaudit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Infektiosairaudet: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 475–503.

Mobidiag. 2016. Amplifying Bacterial GE -tuote-esitys. Luettu 26.2.2016.  
<http://mobidiag.com/products/amplidiag/bacterial-ge/>

Porkka, K. 2009. Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR. Luento 15.10.2009. Pirkanmaan Ammattikorkeakoulu. Tampere.

Rautelin, H. 2010. Kampylobakteerit, aeromonakset ja Plesiomonas. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S & Vaara, M. (toim.) Infektiosairaudet: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 219 -220.

Sails, A.2009. Applications in Clinical Mikrobiology. Teoksessa Logan, J., Edwards, K & Saunders, N. (toim.) Real time PCR. Current Technology and Applications. Great Britain: Cromwell Press, 177.

Seegene. 2016a. Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay -reagenssipakkauksen käyttöohje.

Seegene. 2016b. MuDT™ Technology. Luettu 11.8.2016.  
[http://www.seegene.com/neo/en/introduction/core\\_mudt.php](http://www.seegene.com/neo/en/introduction/core_mudt.php)

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

Solunetti. 2006. Nukleiinihappojen monistaminen. Luettu 2.8.2016.  
[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen\\_monistaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/)

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

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K & Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2., korjattu painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Tartuntatautiasetus 31.10.1986/786. Luettu 13.8.2016.  
<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1986/19860786>

Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos. 2016. Bakteeritaudit. Salmonella. Luettu 10.8.2016.  
<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/salmonella>

Vilka, H. 2015. Tutki ja kehitä. Jyväskylä: PS-kustannus.

VITEK® MS 2016. BioMerieux-Diagnostics -tuote-esitys. Luettu 3.10.2016.  
<http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-ms>

Wiemer, D., Loderstaedt, U., Von Wulffen, H., Priesnitz, S., Fischer, M., Tannich, E., & Hagen, R. M. (2011). Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species in fecal samples. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7), 577–584.

Zoonosikeskus. 2016. Zoonosit. Luettu 15.10.2016.

<http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/zoonosit>

## LIITTEET

Liite 1. Tulostaulukko

Näytteet	Viljelytulokset	Allplex™ GI-Bacteria ( Assay	Allplex™ GI-Bacteria (I) Assay 10	Amplidiag® Bacterial GE
<b>1. Näytesarja</b>				
11	neg	Yer		neg
17	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
24	neg	Yer		neg
25	Salmonella enteritidis	Sal		Salmonella
59	neg	Aer		neg
70	neg	Cam		Campylobacter
77	Campylobacter coli	Cam		Campylobacter
79	neg	Aer		neg
83	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
85	Campylobacter upsaliensis	-		Campylobacter
86	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
87	Campylobacter jejuni ja salmonella O:8	Cam	Cam	EHEC/EPEC, Salmonella, Campylobacter
88	Salmonella O:7	Sal		Salmonella
89	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
90	Shigella flexneri	Sh/EI		Shigella/EIEC
91	Salmonella enteritidis	Sal		Salmonella
92	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
93	Yersinia enterocolitica	Yer		Yersinia
<b>2. Näytesarja</b>				
17	Salmonella enteritidis	Sal		Salmonella
18	Salmonella enteritidis	-	Sal	Salmonella
19	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
20	Salmonella enteritidis	Sal		Salmonella
21	Salmonella enteritidis	Sal		Salmonella
22	Salmonella enteritidis	-	-	neg
23	Salmonella java	-	Sal	EHEC/EPEC, salmonella
24	Salmonella O:9	Sal		Salmonella
30	Salmonella O:7	-		neg
37	Salmonella enteritidis	Sal		Salmonella
38	Campylobacter jejuni	Sh/EI, Cam		Campylobacter
42	Campylobacter jejuni	Cam, CdB		EHEC/EPEC, Campylobacter
44	neg	Cam, CdB		Campylobacter
52	Campylobacter jejuni	Cam		Campylobacter
56	Shigella sonnei	Sh/EI		Shigella/EIEC
57	neg	Cam		Campylobacter
58	Campylobacter upsaliensis	-		Campylobacter
59	Campylobacter jejuni ja salmonella O:8	Cam, Sal		Campylobacter
64	Salmonella O:9	Sal		Salmonella
71	neg	Sh/EI, CdB		Campylobacter
79	Salmonella O:4	Sal		Salmonella
81	Salmonella spp	Sal		EHEC, Salmonella, ETEC
90	neg	Aer		