

Opinnäytetyö AMK

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

NBIELs13

2016

Hanna Helminen

# ANTIBIOOTTISEULONTATESTIN KEHITTÄMINEN

Hanna Helminen

## ANTIBIOOTTISEULONTATESTIN KEHITTÄMINEN

Antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen ja kasvava ongelma, johon tarvitaan ratkaisuja. Tutkimuksen ja kehityksen merkitys on suuri, sillä tarvitaan diagnostisia menetelmiä, joiden avulla voidaan vähentää turhaa antibioottien käyttöä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää antibioottiseulontatesti, joka olisi nopea, helppokäyttöinen ja siihen tarvittava laitteisto löytyisi lähes jokaisesta laboratorion. Menetelmä perustuu epästabiileihin lantanidikelaatteihin ja aikaerotteisen fluoresenssin mittaamiseen. Seulontatesti suoritetaan suodatinkuoppalevyllä, jossa mediumissa olevat bakteerit suodatetaan ja pestään pesuliuksella. Menetelmän kehitykseen kuului olosuhteiden optimointi. Menetelmässä käytetty suodatin- ja siirtokuoppalevy, näytetilavuus, pesuliukset ja kelaattiliuoksen koostumus optimoitiin.

Verrattaessa kehitettyä menetelmää tunnettuun absorbanssin mittaamiseen, huomattiin menetelmän havaitsevan antibiootin vaikutus bakteerien kasvuun noin kaksi tuntia nopeammin. Kehitetty menetelmä on myös absorbanssimenetelmää herkempi. Antibioottiseulontatesti havaitsee 30 000 *E. coli* solua/ml ja siksi sillä voidaan seuloa potilasnäytteisiin tehoavia antibiootteja riippuen näytteessä olevasta bakteerimäärästä.

### ASIASANAT:

aikaerotteinen fluoresenssi, antibioottiresistenssi, antibioottiseulonta, bakteeri, epäspesifinen sitoutuminen, lantanidikelaatti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology

Supervisors: Haajanen Kari, Pihlasalo Sari

2016 | 36

Hanna Helminen

## DEVELOPMENT OF ANTIBIOTIC SCREENING TEST

Antibiotic resistance is a global and increasing problem which requires solutions. Research and development are crucial to resolve antibiotic resistance. New methods to reduce the unnecessary use of antibiotics are needed.

The aim of the thesis was to develop an antibiotic screening test that is fast and easy to use and exploits devices found in almost every laboratory. The method is based on the nonspecific interaction of unstable lanthanide chelate with bacteria and measurement of time-resolved fluorescence. The test is carried out on filter plates where samples are washed. The method development included optimization of conditions. The filter and transfer microtiter plates used as well as sample volume, washing solutions and composition of chelate solution were optimized.

Comparing the developed method with the previously known absorbance measurement, it was discovered that the effect of the antibiotic on the growth of bacteria was detected about two hours faster with the developed method. The new method is also more sensitive than the absorbance method. The antibiotic screening test detects 32,000 *E. coli* cells/ml and patient samples can thus be screened, depending on the amount of bacteria in the sample.

### KEYWORDS:

antibiotic resistance, antibiotic screening, bacteria, lanthanide chelate, nonspecific binding, time-resolved fluorescence

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT TERMIT JA LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 ANTIBIOOTTIRESISTENSSIONGELMA</b>	<b>9</b>
<b>3 KÄYTÖSSÄ OLEVAT MENETELMÄT</b>	<b>12</b>
<b>4 MENETELMÄT</b>	<b>14</b>
4.1 Epästabiilit lantanidikelaatit	14
4.2 Aikaerotteinen fluoresenssi	16
<b>5 KEHITYSPROSESSI</b>	<b>17</b>
5.1 Bakteerien kasvatus	17
5.2 Näytteiden valmistus	17
5.2.1 Näytteen bakteeripitoisuus	17
5.2.2 Kelaattiliuosten valmistus	18
5.3 Käytettyjen kuoppalevyjen optimointi	19
5.4 Näytetilavuuden variaatiot	19
5.5 Pesujen olosuhteet	19
5.6 Pesuliuosten vaikutus bakteereihin	21
5.7 Mittauksen parametrit	21
<b>6 TULOKSET JA ARVIOINTI</b>	<b>22</b>
6.1 Kuoppalevyjen valinta	22
6.2 Näytetilavuuden määrittäminen	24
6.3 Pesuolosuhteiden optimointi	25
6.4 Kelaattiliuoksen koostumus	25
6.5 Absorbanssimittaukseen vertaaminen	27
<b>7 PÄÄTELMÄT</b>	<b>30</b>
<b>8 LÄHDELUETTELO</b>	<b>31</b>

## LIITTEET

Liite 1. Suodatin- ja siirtolevytyypit.

Liite 2. Pesuolosuhteiden vaikutus signaalisuhteeseen.

## KAAVAT

Kaava 1. Oikean absorbanssin määrittäminen näyteliuokseen.	18
Kaava 2. Bakteerien lukumäärä kaivoissa.	18
Kaava 3. Signaalisuhteen laskeminen.	22

## KUVAT

Kuva 1. MRSA:n esiintyvyys Euroopan osallistujamaissa vuonna 2014. Muokattu ja suomennettu (European Centre for Disease Prevention and Control, EARS-Net, 2005-2016).	10
Kuva 2. Karbapenemaasille resistentit bakteeritapaukset Euroopassa vuonna 2013. Muokattu ja suomennettu (European Centre for Disease Prevention and Control, EARS-Net, 2005-2016).	11
Kuva 3. A. Siirrostuksen jälkeen antibioottikiekot on lisätty elatusainelevylle ja malja on kuvattu ennen inkubointia. B. Inkuboinnin jälkeen estovyöhykkeet näkyvät (iKnowledge, 2015).	12
Kuva 4. Menetelmän periaate: bakteerien vaikutus epästabiliin kelaattiin ja signaaliin. Kuvassa on esitetty yksi esimerkkivuorovaikutus, mutta useat eri vuorovaikutusmekanismit ovat mahdollisia.	14
Kuva 5. Europiumkloridin kemiallinen rakenne (ChemSpider, 2015).	15
Kuva 6. 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftyyli)-1,3-butaanidionin (NTA) kemiallinen rakenne (Sigma Aldrich, 2016).	15
Kuva 7. Trioktyylifosfiinioksidin (TOPO) kemiallinen rakenne (Sigma Aldrich, 2016).	15
Kuva 8. Terbiumkloridin kemiallinen rakenne (Royal Society of Chemistry, 2015).	15
Kuva 9. 4,5-dihydroksi-1,3-bentseenidisulfonihapon dinatriumsuolan monohydraatin (Tiron) kemiallinen rakenne (Sigma Aldrich, 2016).	16
Kuva 10. Aikaerotteisen fluoresenssin periaate. (Pihlasalo, 2011)	16

## KUVIOT

Kuvio 1. Suodatinlevyjen vertailu.	23
Kuvio 2. Menetelmän toimivuus käytettäessä erilaisia siirtolevyjä.	24
Kuvio 3. Näytetilavuuksien vertailu.	25
Kuvio 4. Kelaattiliuoksen Triton X-100 pitoisuuden vaikutus signaalisuhteeseen.	26
Kuvio 5. Kelaattiliuoksen Eu:NTA:TOPO suhteen vaikutus signaalisuhteeseen. Liuoksen Eu-pitoisuus oli vakio 0,12 µM.	26
Kuvio 6. Kelaattiliuoksen europiumpitoisuuden vaikutus signaalisuhteeseen. Lantanidin määrää vaihdellaan, mutta Eu:NTA:TOPO suhde pysyy 1:27:27.	27

Kuvio 7. Ampisilliinipitoisuuden vaikutus <i>E. coli</i> -bakteerien kasvuun absorbanssimittauksessa.	28
Kuvio 8. Ampisilliinipitoisuuden vaikutus <i>E. coli</i> -bakteerien kasvuun mitattaessa kehitetyllä menetelmällä.	28
Kuvio 9. <i>E. coli</i> -bakteerien kasvu, kun ampisilliinia ei ole läsnä.	29
Kuvio 10. Pesuolosuhteiden vaikutus signaalisuhteeseen kaivossa, jossa on 960 000 <i>E. coli</i> -solua/ml.	36

## TAULUKOT

Taulukko 1. Erilaiset pesuvaihtoehdot. Kaikki liuokset on valmistettu 0,15 M NaCl:iin.	20
Taulukko 2. Suodatinlevytyypit.	34
Taulukko 3. Siirtolevytyypit.	35

## KÄYTETYT TERMIT JA LYHENTEET

AU	absorbanssiyksikkö, engl. absorbance unit
Kelaatti	mikä tahansa yhdiste, johon on liittynään metallikeskusatomia (Encyclopædia Britannica, 2016)
Kompetenssi	bakteeri pystyy ottamaan sisäänsä DNA:ta (Suominen, et al., 2013)
Lantanidit	joukko harvinaisia maametalleja kemian jaksollisessa järjestelmässä (Helmenstine, 2016)
Ligandi	molekyyli, joka sitoutuu keskusmetalliatomiin muodostaen kompleksin (Chemicool, 2014)
NTA	4,4,4-trifluoro-1-(2-naftyyli)-1,3-butaanidioni
Pilus	bakteereilla esiintyvä pintasäie. Säikeen avulla bakteerit pystyvät siirtämään perintöainesta. (Tieteen termipankki, 2014)
Plasmidi	bakteerin kromosomin ulkopuolista perintöainesta, joka on suorarakenteinen DNA-molekyyli tai DNA-rengas. (Tieteen termipankki, 2014)
Tiron	4,5-dihydroksi-1,3-bentseenidisulfonihapon dinatriumsuola monohydraatti
TOPO	trioktyylifosfiinioksidi

# 1 JOHDANTO

Antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen ja kasvava ongelma. Resistenttien kantojen vähentämiseksi on ehdotettu monenlaisia ratkaisuja. Niistä tärkein on tutkimuksen ja kehityksen tukeminen, jotta pystytään kehittämään diagnostisia menetelmiä antibioottien turhan käytön vähentämiseksi.

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston Kemian laitoksella Detektioteknologian tutkimusryhmässä, jossa ohjaajana toimi FT, dosentti Sari Pihlasalo. Tutkimusryhmä kehittää erilaisia detektioon perustuvia tutkimusmenetelmiä. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää antibioottiseulonta testi, joka olisi nopea, helppokäyttöinen ja siihen tarvittava laitteisto löytyisi lähes jokaisesta laboratorion. Menetelmästä pyrittiin samaan mahdollisimman herkkä, koska ajateltiin myös mahdollista potilasnäytteiden testausmahdollisuutta. Nykyiset menetelmät ovat hitaita ja suurin osa antibioottien tehoa arvioivista menetelmistä perustuu standardoitujen estovyöhykkeiden kokojen mittaamiseen.

Seulontatesti perustuu epäspesifiseen sitoutumiseen ja epästabiiliin lantanidikelaatin aikaerotteisen fluoresenssin mittaamiseen. Menetelmää ei kuitenkaan aikaisemmin ole käytetty bakteerien kvantitointiin. Menetelmässä näytteet pipetoidaan suodatinkuoppalevyille ja pesujen jälkeen epästabiiliin lantanidikelaatin sisältämä liuos lisätään joko suodatinlevylle tai siirtokuoppalevyille testistä riippuen. Kuoppalevystä mitataan aikaerotteinen fluoresenssi noin 20 min inkuboinnin jälkeen. Kelaatin ja bakteerien vuorovaikutuksesta ei ole yksityiskohtaista tutkimustietoa ja päätelmät eroavat hieman toisistaan. Opinnäytetyössä oletetaan, että europiumkelaatti sitoutuu bakteerien pinnalla oleviin nukleiinihappoihin, fosfolipideihin, epäorgaanisiin polyfosfaatteihin ja proteiineihin.

Menetelmää verrattiin absorbanssin mittaamiseen. Vertailutesteissä yön yli kasvatetusta kannasta tehtiin jatkokasvatuksia, joihin oli lisätty eri antibioottipitoisuuksia. Jatkokasvatuksista otettiin valituissa aikapisteissä näytteitä ja näytteet mitattiin molemmilla menetelmillä.



## 2 ANTIBIOOTTIRESISTENSSIONGELMA

Antibiootit tehoavat vain bakteeri-infektioihin, mutta eivät tehoa viruksiin. Antibiootteja on kahta eri tyyppiä, bakteriosidejä ja bakteriostaatteja. Bakteriosidit ovat bakteereja tappavia antibiootteja, jotka esim. hajottavat bakteerien soluseinän. Bakteriostaatit hidastavat vain bakteerien kasvua ja lisääntymistä vaikuttamalla mm. bakteerien aineenvaihduntaan ja geeneihin. Jotta antibiootti tehoaa bakteeriin, sen on löydettävä bakteerin pinnalta reseptori, johon antibiootti voi kiinnittyä. (Lumio, 2015)

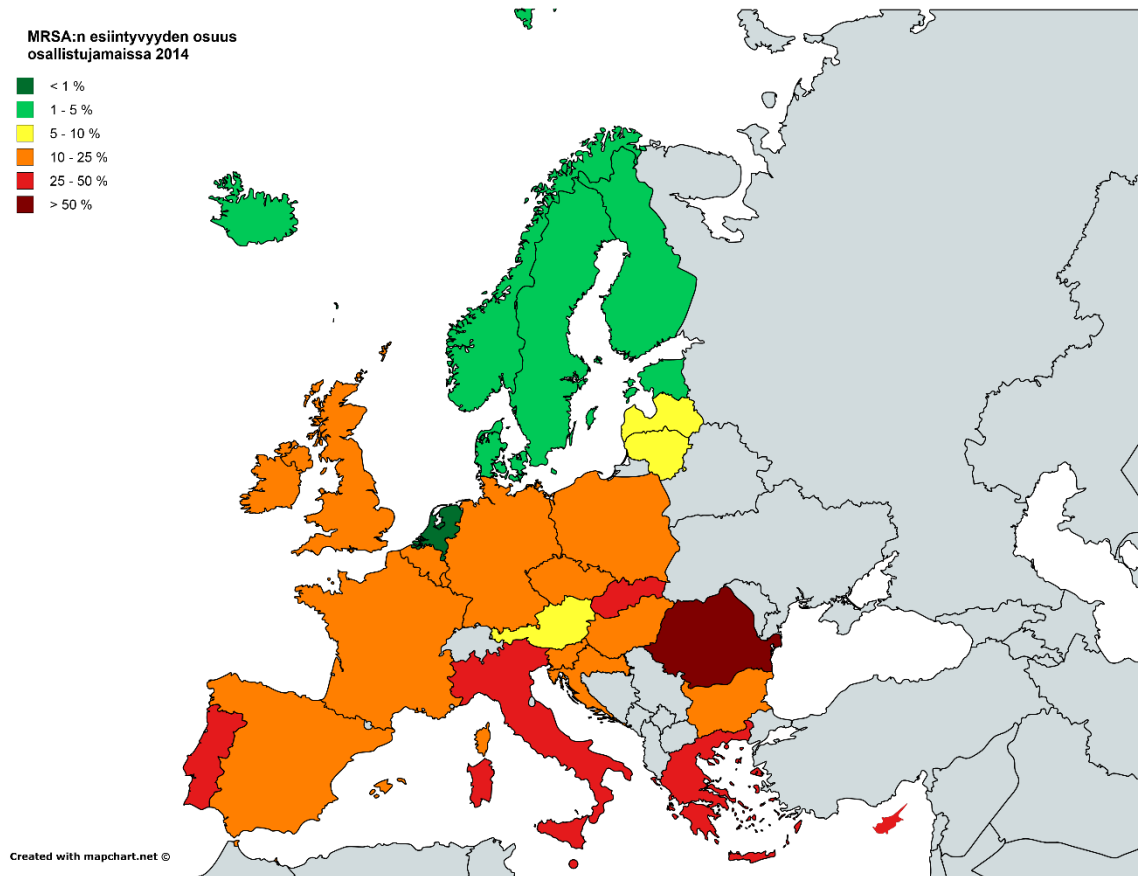
Antibiootit eivät pysty tappamaan tai hidastamaan antibioottiresistenttien bakteerien kasvua. Varsinainen ongelma on bakteerien muuttuminen resistenteiksi kaikille käytössä oleville antibiooteille. Tällaiset bakteerit aiheuttavat pidempiaikaisen sairastumisen ja pahimmassa tapauksessa jopa kuoleman. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016)

Antibioottiresistenssi kehittyy bakteereissa tapahtuvien geenien mutaatioiden seurauksena (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016). Jo kehittyneet mutaatiot voivat siirtyä bakteerista toiseen konjugaation, transduktion tai translaation avulla (MacGowan & Macnaughton, 2013). Konjugaatiossa plasmidi kopioituu bakteerista toiseen kiinteässä solukontaktissa piluksen avulla, kun taas transduktiossa geneettinen materiaali siirtyy bakteriofagien välityksellä bakteerien välillä. Mikäli bakteeri on kompetentti, se voi ottaa elinympäristössään vapaana olevan plasmidin sisälleen transformaatioissa. (Solunetti, 2006)

Antibioottiresistenttien bakteerien on myös todettu suojelevan antibiooteille heikompia lajitovereitaan. Välittäjäaineena toimii resistenttien bakteerien erittämä aineenvaihduntatuote, indoli. Antibioottiresistenssiin johtavien plasmidien jakaminen heikentää resistenttien bakteerien omaa lisääntymiskykyä, mutta edesauttaa koko bakteerikannan selviytymistä (Lääkärilehti, 2010). Antibioottiresistenssin kehittyminen on evolutiivista kehittymistä. Ihmiset pyrkivät kehittämään antibiootteja, jotka hajottaisivat bakteerien soluseinän ja tuhoaisivat ne, mutta bakteerit kehittävät antibioottia vastaan entsyymien, joka tuhoaa antibiootin (Aivelo, 2015). Antibioottiresistentit bakteerit voivat aiheuttaa mm. ihotulehduksia, keuhkokuumetta, ripulia, verenkierron infektioita ja virtsatie-tulehduksia. Infektiot vaihtelevat kuitenkin bakteerista ja potilaasta riippuen. Yleistä sairauksille on niiden vaikea hoito, sillä normaalisti määrättävät antibiootit eivät enää tehoa (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016).

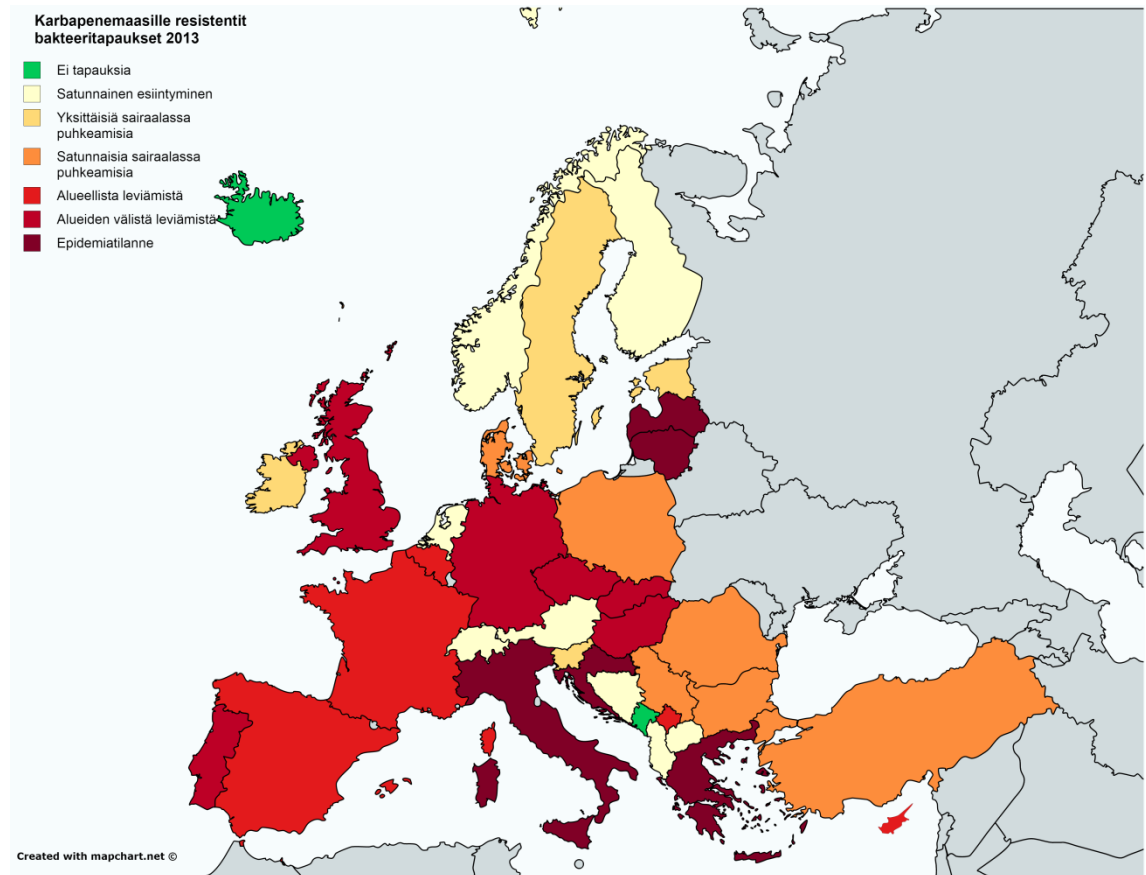
Ongelma on pahenemassa. Koko ajan syntyy uusia resistenttejä kantoja, jotka kehittävät vastustuskyvyn uusiin antibiootteihin. Tulevaisuuden kauhukuva on, että bakteerit muuttuvat vastustuskykyisiksi kaikille antibiooteille. Silloin jouduttaisiin tilanteeseen ennen antibioottien löytämistä, jolloin kemoterapiahoitoja, elinsiirtoja, tehohoitoja ja muita lääketieteellisiä toimenpiteitä ei enää pystyttäisi tekemään. Lisäksi kuolleisuus bakteeriperäisiin tauteihin, kuten keuhkokuumeeseen ja leikkausten jälkeisiin infektioihin kasvaisi. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016)

Tutuin antibioottiresistenteistä bakteereista on varmasti metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* eli MRSA. MRSA tunnetaan myös sairaalabakteerina ja se on monesti sairaaloissa leviävä, moniantibioottiresistentti bakteerikanta, joka saattaa aiheuttaa vakaviakin infektioita (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016). Kuva 1 on esitettyä MRSA:n esiintyvyys Euroopassa vuonna 2014.



Kuva 1. MRSA:n esiintyvyys Euroopan osallistujamaissa vuonna 2014. Muokattu ja suomennettu (European Centre for Disease Prevention and Control, EARS-Net, 2005-2016).

Antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen ongelma. Resistenssin esiintyvyys kuitenkin vaihtelee eri maiden välillä. Vaikeusasteeseen vaikuttaa maan tapa käyttää antibiootteja. Yleisesti antibioottiresistenssi on suurempi ongelma maissa, joissa antibiootteja käytetään enemmän (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016). Kuva 2 on esitettyä antibioottiresistenssin asteet karbapenemaasille Euroopan eri maissa vuonna 2013. Karbapenemaasi on antibiootti, jota lääkärit käyttävät vasta, kun mikään muu antibiootti ei enää tehoa (European Centre for Disease Prevention and Control, joulite, 2005-2016).



Kuva 2. Karbapenemaasille resistentit bakteritapaukset Euroopassa vuonna 2013. Muokattu ja suomennettu (European Centre for Disease Prevention and Control, EARS-Net, 2005-2016).

Asiaan voidaan kuitenkin vielä vaikuttaa. Hyviä esimerkkejä ovat mm. maailmanlaajuiset mainoskampanjat, puhtaudesta huolehtiminen niin sairaaloissa kuin muuallakin, tarpeettomien antibioottien käytön rajoittaminen maataloudessa sekä rokotteiden lisääminen. Suuri merkitys on kuitenkin tutkimuksella ja sen tukemisella. On tärkeää antaa taloudellista tukea tutkimuksiin, joissa etsitään uusia antibiootteja sekä kehitetään diagnostisia testejä antibioottien vähentämiseksi. (Lääkärilehti, 2016).

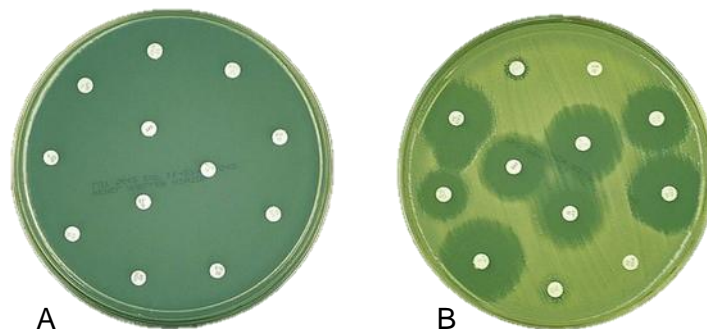
Myös itse antibioottien oikealla käytöllä on suuri merkitys resistenssin kurissa pitämisessä. Antibiootteja tulisi käyttää maltillisesti ja harkiten. Myös kapeakirjoisten antibioottien käyttö vähentää antibioottiresistenssin syntyä (Norden, 2011). Erittäin tärkeää on noudattaa lääkärin antamia ohjeita antibioottikuurista. Kuuri tulee aina syödä loppuun ja ottaa ohjeiden mukaisesti. Muussa tapauksessa kehossa ei ole riittävästi antibioottia tuhoamaan bakteerit ja silloin ne kehittävät helpommin resistenssin antibiootille. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016).

Mikäli asiaan ei puututa, on ennustettu, että vuonna 2050 antibioottiresistentit bakteerit aiheuttavat 10 miljoonan ihmisen kuoleman, joka on enemmän kuin kuolleisuus syöpätauteihin. (Lääkärilehti, 2016).

### 3 KÄYTÖSSÄ OLEVAT MENETELMÄT

Antibioottiresistenssin arviointiin on kehitetty useita menetelmiä. Nykyisin pyritään kehittämään seulonta- ja arviointimenetelmiä antibioottien aktiivisuudelle. On kehitetty erilaisia ohutkerroskromatografioita (TLC) sekä laimennos- ja diffuusiomenetelmiä. Hyvin tunnettuja ja yleisesti käytettyjä menetelmiä ovat kiekkoherkkyyssmenetelmä, kuoppadiffuusiomenetelmä sekä kasvatusliuos- ja agarlaimennosmääritys. (Mounyr, et al., 2016)

Kiekkoherkkyyssmenetelmää (disk-diffusion) käytetään monissa laboratorioissa antibioottien rutiinimäärityksissä. Se on käytetty menetelmä yksinkertaisuutensa ja edullisuutensa takia. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) on julkaissut menetelmälle monia standardeja bakteerien ja hiivojen testausta varten. Menetelmää käytetään *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* ja *Neisseria meningitidis* -mikrobeille (Mounyr, et al., 2016). Menetelmässä elatusainemaljalle siirrostetaan tutkittavaa mikrobia. Maljalle asetetaan kiekko, jossa on tietty pitoisuus haluttua antibioottia. Antibiootti imeytyy kiekosta maljalla olevaan elatusaineeseen (Nykäsenoja & Pekkanen, 2014). Maljoja inkuboidaan sopivissa olosuhteissa. Inkuboinnin jälkeen kiekkojen ympärille muodostuneiden estovyöhykkeiden halkaisija mitataan ja arvoja verrataan standardiin. Menetelmä määrittelee mikrobin alttiiksi, keskitasoiseksi tai resistentiksi tutkittavalle antibiootille. (Mounyr, et al., 2016) Kuva 3 on esitettyä kiekkoherkkyyssmenetelmän kasvatuslevyt ennen ja jälkeen inkuboinnin.



Kuva 3. A. Siirrostuksen jälkeen antibiootikiekot on lisätty elatusainelevylle ja malja on kuvattu ennen inkubointia. B. Inkuboinnin jälkeen estovyöhykkeet näkyvät (iKnowledge, 2015).

Kiekkoherkkyyssmenetelmää muistuttavaa kuoppadiffuusiomenetelmää (well-diffusion method) käytetään kasvi- ja mikrobiuutteiden antibioottiaktiivisuuden havaitsemiseen. Elatusainemaljalle siirrostetaan tutkittavaa mikrobia. Elatusaineeseen tehdään aseptisesti 6-8 mm reikä steriilillä korkkiporalla tai kärjellä, jonka jälkeen reikään pipetoidaan 20-100 µl halutun konsentraation omaavaa liuosta. Maljoja inkuboidaan sopivissa olosuhteissa ja tämän jälkeen estovyöhykkeen halkaisija mitataan kuten kiekkoherkkyyssmenetelmässä ja vyöhykkeen kokoa verrataan standardiin. (Mounyr, et al., 2016)

Kasvatusliuoksen laimennosmäärityksessä (broth dilution) antibiootista valmistetaan laimennoksia. Makrolaimennoksiin pienin tilavuus on 2 ml, mutta mikrolaimennoksissa voi-

daan käyttää pienempiä tilavuuksia. Mikrolaimennoksissa testi tehdään 96-levyllä. Mikrobisuspensiosta valmistetaan laimennokset 0,5 McFarland mittakaavassa. Mikrobilaimennokset siirrostetaan antibioottilaimennoksiin ja sekoitetaan hyvin. Putkia tai 96-kuoppalevyjä inkuboidaan testimikrobille sopivissa olosuhteissa yleensä ilman sekoitusta. Antibiootin vaikutusta testimikrobiin tutkitaan paljain silmin. Mikrolaimennoksien lukemiseen 96-kuoppalevytä voidaan käyttää erilaisia laitteita, joiden avulla bakteerien kasvu kaivoissa voidaan helposti havaita. (Mounyr, et al., 2016)

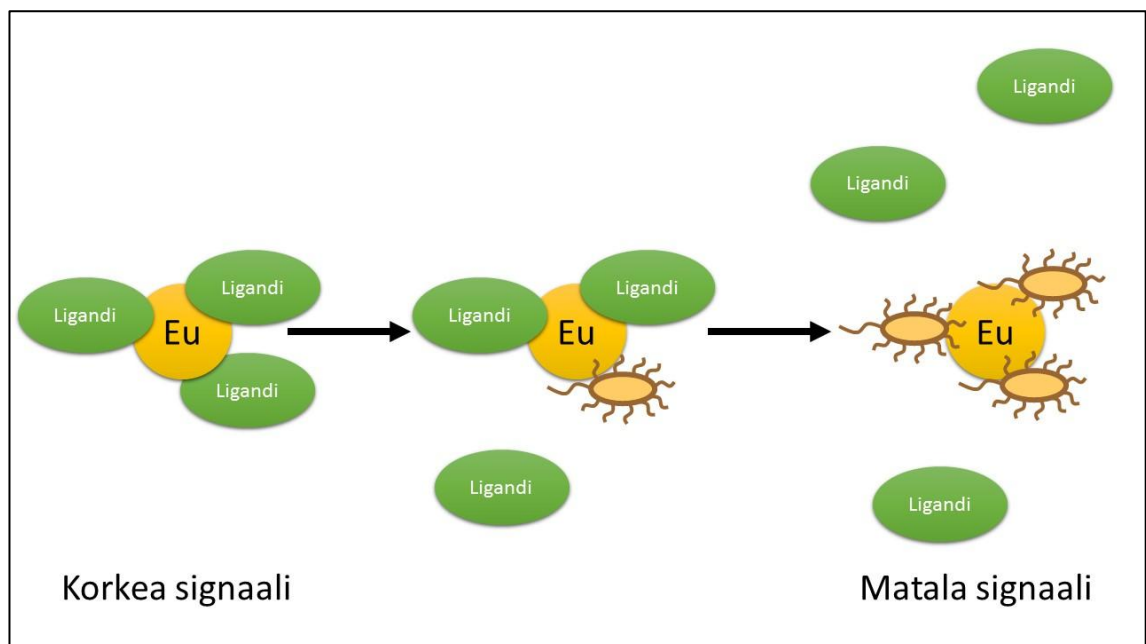
Agarlaimennosmenetelmässä (agar dilution) antibiootista valmistetaan haluttuja vaihtelevia konsentraatioita kasvatusliuokseen. Kasvatusliuos valetaan maljalle ja päälle siirrostetaan mikrobisuspensio. Maljoja inkuboidaan testimikrobille suotuisissa olosuhteissa. (Mounyr, et al., 2016)

## 4 MENETELMÄT

Kehitetty antibioottiseulontatesti perustui epäspesifiseen sitoutumiseen ja epästabiilin lantanidikelaatin aikaerotteisen fluoresenssin mittaamiseen.

### 4.1 Epästabiilit lantanidikelaatit

Epästabiilien lantanidikelaattien käyttäminen perustuu siihen, että lantanidi-ioni ja ligandi muodostavat kompleksin. Virityksen jälkeen kompleksi emittoi eli säteilee valoa ympäristöönsä. Syntynyttä valosignaalia pystytään mittaamaan aikaerotteisena fluoresenssina. Kelaatti koostuu lantanidista ja ligandista. Virityksen tapahtuessa ligandi siirtää viritysenergiansa lantanidille. Lantanidi emittoi ja signaali voidaan mitata. Bakteerit häiritsevät kuitenkin kelaattia sammuttaen, stabiloiden tai destabiloiden ja emissiosignaali muuttuu. On ehdotettu, että europiumkelaatti sitoutuu bakteerien pinnalla oleviin nukleihin, fosfolipideihin, epäorgaanisiin polyfosfaatteihin ja proteiineihin (W.L. Scaff, et al., 1969). Menetelmää on havainnollistettu Kuva 4.

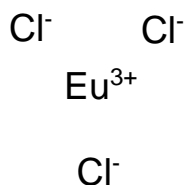


Kuva 4. Menetelmän periaate: bakteerien vaikutus epästabiiliin kelaattiin ja signaaliin. Kuvassa on esitetty yksi esimerkkivuorovaikutus, mutta useat eri vuorovaikutusmekanismit ovat mahdollisia.

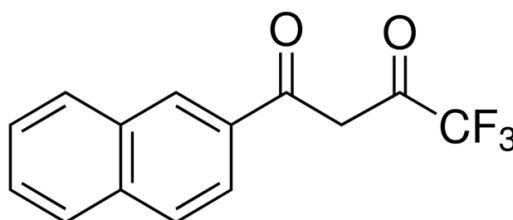
Lantanidikelaattien fluoresenssin mittaaminen perustuu ligandien viritykseen. Siinä perustilan elektroni siirtyy ligandin virittyneelle tilalle, mitä kutsutaan sisäiseksi siirtymäksi. Energia siirtyy ligandin virittyneeltä tasolta kelatoituneen ionin virittyneelle resonanssitasolle ja siitä syntyy ionille ominainen emissio eli säteily. (Hemmilä, et al., 1994)

Kelaatin muodostumiseksi lantanidin pariin tarvitaan ligandi. Aromaattisia  $\beta$ -diketoneita käytetään laajalti lantanidien kelatoimiseen.  $\beta$ -Diketoneit ovat yhdisteitä, joilla on kaksi

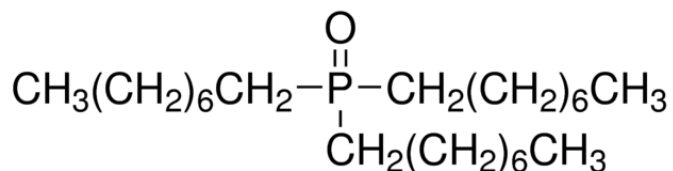
ketoryhmää  $\beta$ -asemissa toisiinsa nähden (Hemmilä, et al., 1994). Ketoryhmässä happiatomi on sitoutunut hiileen kaksoissidoksella (Terveyskirjasto, 2016). Kuvassa 5 on esitettyä europiumkloridin kemiallinen rakenne. Kuvissa 6 ja 7 on esitettyä sille käytettävien ligandien kemialliset rakenteet.



Kuva 5. Europiumkloridin kemiallinen rakenne (ChemSpider, 2015).

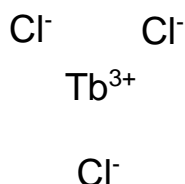


Kuva 6. 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftyyli)-1,3-butaanidionin (NTA) kemiallinen rakenne (Sigma Aldrich, 2016).

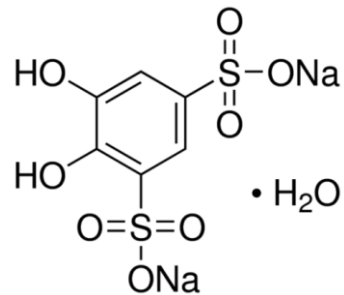


Kuva 7. Trioktyylifosfiinioksidin (TOPO) kemiallinen rakenne (Sigma Aldrich, 2016).

Aromaattiset  $\beta$ -diketonit eivät sovi kuitenkaan  $\text{Tb}^{3+}$ -kelaatille matalan triplettilan takia. Siksi  $\text{Tb}^{3+}$ -kelaatille käytetäänkin alifaattisia  $\beta$ -diketoneita, joiden virituskolmoistaso on korkeampi. Nämä voivat toimia ligandeina kaikille fluoresoiville lantanideille. (Hemmilä, et al., 1994) Kuvassa 8 on esitettyä terbiumkloridin kemiallinen rakenne ja kuvassa 9 on esitettyä sille käytetyn ligandin rakennekaava.



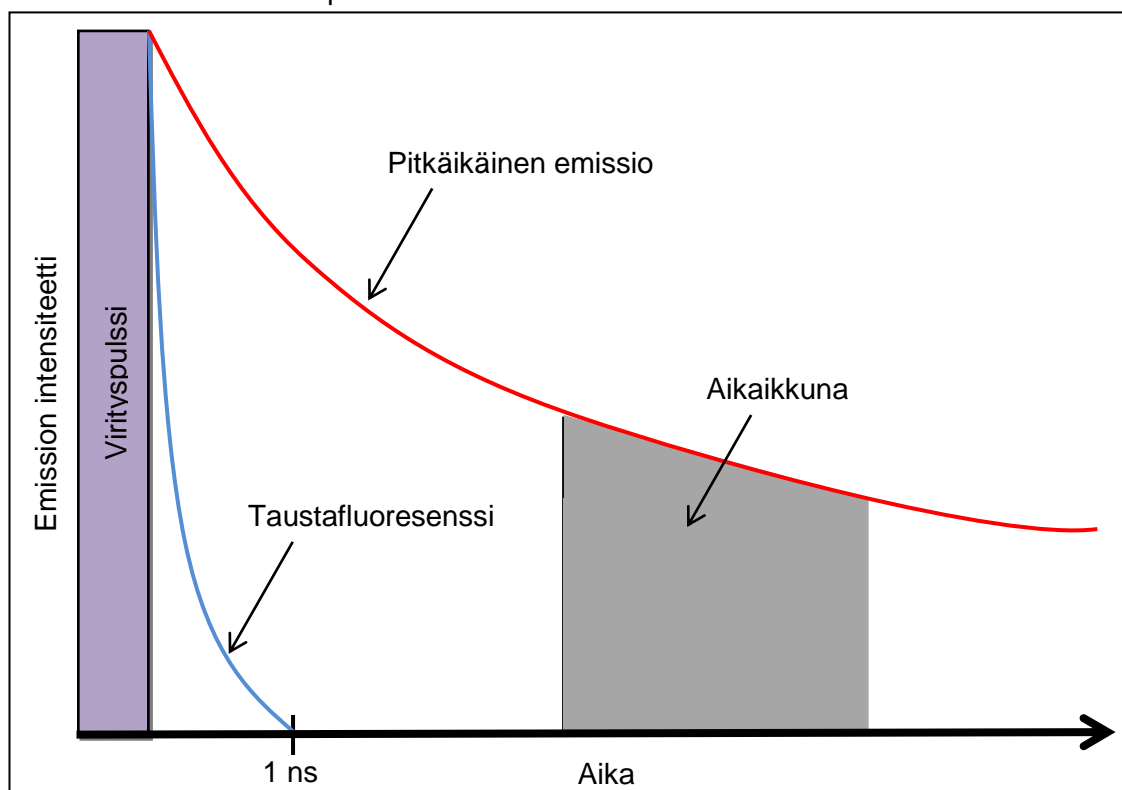
Kuva 8. Terbiumkloridin kemiallinen rakenne (Royal Society of Chemistry, 2015).



Kuva 9. 4,5-dihydroksi-1,3-bentseenidisulfonihapon dinatriumsuolan monohydraatin (Tiron) kemiallinen rakenne (Sigma Aldrich, 2016).

#### 4.2 Aikaerotteinen fluoresenssi

Aikaerotteisessa fluorometriassa käytetään useasti lantanideja, jotka omaavat pitkäikäisen emissio. Esimerkiksi europium-kelaatin emissio kestää yhden tai useampia millisekunteja. Näytteessä olevilla autofluoresoivilla yhdisteillä emissio kestää vain muutamia nanosekunteja ja tätä kutsutaan taustafluoresenssiksi. Mittauksessa lantanidi viritetään Xenon-pulssilampulla, joka säteilee UV-valoa. Europium-kelaatille ominainen viritysaallonpituus on 340 nm. Laitteisto odottaa joitakin mikrosekunteja, että taustafluoresenssi ehtii hävitä, ennen mittauksen aloittamista (Kivelä, 2003). Kuva 10 on esitettyä aikaerotteisen fluoresenssin periaate.



Kuva 10. Aikaerotteisen fluoresenssin periaate. (Pihlasalo, 2011)



## 5 KEHITYSPROSESSI

### 5.1 Bakteerien kasvatus

Ensimmäiseksi valmistettiin kanta, josta jatkokasvatukset valmistettiin.

Noin 40 millilitraan LB-mediumia siirrostettiin 1 µl silmukalla *Escherichia coli* JM109 -kantaa. Kasvatusliuos vietiin inkuboitumaan 21 tunniksi +37 °C:een ja ravistelijan kierrosluvuksi asetettiin 250 rpm. Inkuboinnin jälkeen kasvatusliemi sentrifugoitiin (Heraus Megafuge 1.0) 4 min, 4 000g. LB-mediumin poiston jälkeen pelletti suspensoitiin 350 µl 20 % glyserolia. Liuos siirrettiin kryoputkeen ja varastoitiin lämpötilassa -80 °C.

Aina testiä edeltävänä päivänä bakteerit siirrostettiin 1 µl silmukalla pakkasessa säilytetystä kannasta kasvatusputkeen, jossa oli noin neljä millilitraa LB-mediumia. Kasvatusliuos vietiin inkuboitumaan +37 °C:een ravistelun ollessa 250 rpm. Inkuboitui yon yli.

### 5.2 Näytteiden valmistus

Testien koot vaihtelivat suuresti ja näyteliuoksia valmistettiin erilaisia määriä. Tilavuuksista riippuen näytteet valmistettiin 1,5 ml ja 2 ml Eppendorf-putkiin sekä suuret tilavuudet 50 ml Falcon-putkiin. Erilaisten bakteerinäytteiden lisäksi nollanäytteinä käytettiin MilliQ-vettä ja LB-mediumia.

Kehitysprosessin aikana testattiin useita erilaisia olosuhteita, jolloin kokeiltiin myös erilaisia bakteeripitoisuuksia. Bakteerimäärät näytteissä olivat testistä riippuen välillä  $3 \times 10^4$  –  $8 \times 10^6$  solua/ml.

Näytteet pipetoitiin ensin suodatinkuoppalevyille. LB-medium suodatettiin pois, jonka jälkeen levyille tehtiin erilaisia pesuja. Pesujen jälkeen kuoppiin pipetoitiin 50 µl MilliQ-vettä ja levyä ravisteltiin. Kun testattiin siirtolevyjen vaikutusta, näytteet siirrettiin 96- tai 384-kuoppalevyille, jonne pipetoitiin kelaattiliuos. Kun siirtolevyjä ei käytetty, kelaattiliuos lisättiin suoraan suodatinkuoppalevyille. Kelaattiliuoksen lisäyksen jälkeen levyä ravisteltiin ja sen jälkeen levy oli valmis mitattavaksi.

#### 5.2.1 Näytteen bakteeripitoisuus

Yön yli kasvaneesta suspensiosta määritettiin bakteeripitoisuus mittaamalla LB-mediumiin valmistettu 1:10-laimennoksen absorbanssi (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) aallonpituudella 620 nm.

Testeissä käytettiin laskennallisia absorbanssiarvoja välillä 0,01-0,00004 laimentamalla yön yli kasvanutta bakteerisuspensiota. Yön yli kasvatetun suspension laskennallinen absorbanssi oli noin 2,3 ja absorbanssimittauksissa käytettiin 1:10-laimennosta. Haluttu absorbanssi saadaan näyteliuoksiin kaavasta 1.

Kaava 1. Oikean absorbanssin määrittäminen näyteliuokseen.

$$(10 * A_1) * V_1 = A_2 * V_2$$

$$V_1 = \frac{A_2 * V_2}{10 * A_1}$$

jossa

$A_1$  = kasvatusliuoksen 1:10-laimennoksen absorbanssi

$V_1$  = näyteliuoksen tekoon tarvittava kasvatusliuoksen tilavuus

$A_2$  = näyteliuokseen määritettävä absorbanssi

$V_2$  = näyteliuoksen kokonaistilavuus

On selvitetty, että 1 AU vastaa  $8 * 10^8$  solua/ml (Agilent Technologies, 2016)

Kaavalla 2 saadaan laskettua bakteerien määrä näytekaivoissa.

Kaava 2. Bakteerien lukumäärä kaivoissa.

$$x = A * s * V$$

jossa

$x$  = bakteerien määrä näytekaivossa

$A$  = näyteliuoksen absorbanssi

$s$  = bakteerien määrä absorbanssiyksikköä kohden =  $8 * 10^8$  solua/ml

$V$  = näytetilavuus kaivossa

### 5.2.2 Kelaattiliuosten valmistus

Kelaattiliuoksissa käytettiin fluoresoivina lantanideina  $\text{Eu}^{3+}$ - ja  $\text{Tb}^{3+}$ -ioneja (europium(III)kloridi hydraatti, Alfa Aesar ja terbium(III)kloridi heksahydraatti, Sigma-Aldrich).  $\text{EuCl}_3$ - ja  $\text{TbCl}_3$ -kelaattiliuokset valmistettiin lisäämällä ligandit samaan liuokseen lantanidien kanssa, jonka jälkeen liuos pipetoitiin kuoppalevyille.

Liuoksissa käytettiin kolmea erilaista ligandia. Europiumkelaatille ligandeina käytettiin 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftyyli)-1,3-butaanidionia (NTA, Acros Organics) ja trioktyylifosfiinioksidia (TOPO, Sigma-Aldrich). Terbium-kelaatille ligandina käytettiin 4,5-dihydroksi-1,3-bentseenidisulfonihappodinatrimiumsuolan monohydraattia (Tiron, Acros Organics).

Menetelmän kehityksen aikana testattiin monia erilaisia kelaattiliuoksen koostumuksia. Kelaattiliuoksessa vaihdeltiin liuoksen Triton X-100 -pitoisuutta,  $\text{Eu}^{3+}$  määrää ja  $\text{Eu:NTA:TOPO}$  -suhdetta.

Kelaattiliuosta pipetoitiin kuoppiin tulevien näytetilavuuksien suhteessa. 96-kuoppalevyn kaivoihin pipetoitiin 5  $\mu\text{l}$  kelaattiliuosta, 384-levyille 1  $\mu\text{l}$  ja suoraan suodatinlevyltä analysoitaessa 5  $\mu\text{l}$ .

### 5.3 Käytettyjen kuoppalevyjen optimointi

Menetelmää optimoitaessa kokeiltiin neljää erilaista suodatinkuoppalevyä. Levyjen ominaisuudet vaihtelivat suodattimen materiaalin, hiukkaskoon ja kuoppien määrän osalta. Näytteiden pipetoinnin, suodatuksen ja pesujen jälkeen kokeiltiin myös näytteiden siirtoa erilaisille 96- tai 384-levyille. Siirtokuoppalevyjen ominaisuudet vaihtelivat levyn materiaalin, valmistajan, kaivon muodon ja levyn materiaalin sitovuuden osalta. Erilaiset suodatin- ja siirtokuoppalevyjen vaihtoehdot on esitettyä liitteessä 1.

### 5.4 Näytetilavuuden variaatiot

Suodatinkuoppalevyjä testattaessa näytetilavuuksina testattiin 300 ja 1200  $\mu\text{l}$ . Suodatinlevyjen kaivoihin mahtui kertapipetointina vain 300  $\mu\text{l}$ . Näytetilavuudella 1200  $\mu\text{l}$  kaivon pipetoitiin 300  $\mu\text{l}$  ja suodatettiin. Tämä toistettiin neljä kertaa.

96-siirtolevyillä näytetilavuutena oli 50  $\mu\text{l}$  ja 384-siirtokuoppalevyillä 10  $\mu\text{l}$ .

### 5.5 Pesujen olosuhteet

Suodatinlevy 5027 (AcroWell™, 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF) käytettäessä ensimmäiseksi tehtiin suodattimen vaatima esipesu. Kaivoihin pipetoitiin 100  $\mu\text{l}$  99 % etanolia ja sen annettiin vaikuttaa 10 min. Tämän jälkeen kaivot huuhdeltiin kahdesti 100  $\mu\text{l}$ :lla MilliQ-vettä.

Pesuja kokeiltiin paljon erilaisia, jotta saataisiin selville sellaiset kemialliset aineet, joiden käytön jälkeen kelaatit sitoutuisivat mahdollisimman hyvin bakteereihin. Erilaiset pesuvaihtoehdot on esitettyä taulukossa 1.

Taulukko 1. Erilaiset pesuvaihtoehdot. Kaikki liuokset on valmistettu 0,15 M NaCl:iin.

Nro	Pesu 1		Pesu 2		Pesu 3		Pesu 4	
1	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl				
2	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl
3	99 %	EtOH	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl
4	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100
5	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100		
6	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100				
7	0,01 g/l	Triton X-100						
6	0,01 g/l	Triton X-100	0,01 g/l	Triton X-100				
8	0,03 g/l	Triton X-100	0,03 g/l	Triton X-100				
9	0,1 g/l	Triton X-100	0,1 g/l	Triton X-100				
10	0,3 g/l	Triton X-100	0,3 g/l	Triton X-100				
11	1 g/l	Triton X-100	1 g/l	Triton X-100				
12	3 g/l	Triton X-100	3 g/l	Triton X-100				
13	0,3 g/l	BSA	0,3 g/l	BSA	0,15 M	NaCl	0,15 M	NaCl
14	3 g/l	Triton X-100	3 g/l	Triton X-100	3 g/l	Triton X-100		
15	0,1 g/l	Triton X-100	0,1 g/l	Triton X-100	0,1 g/l	Triton X-100		
16	3 g/l	SDS	3 g/l	SDS	3 g/l	Triton X-100		
17	3 g/l	CTAB	3 g/l	CTAB	3 g/l	Triton X-100		
18	3 g/l	Benzalkonium chloride	3 g/l	Benzalkonium chloride	3 g/l	Triton X-100		
19	3 g/l	1-Hexadecylpyridium chloride	3 g/l	1-Hexadecylpyridium chloride	3 g/l	Triton X-100		
20	3 g/l	Tween20	3 g/l	Tween20	3 g/l	Triton X-100		
21	3 g/l	Igepal Ca-360	3 g/l	Igepal Ca-360	3 g/l	Triton X-100		
22	3 g/l	CHAPS	3 g/l	CHAPS	3 g/l	Triton X-100		
23	3 g/l	Triton X-114	3 g/l	Triton X-114	3 g/l	Triton X-100		
24	20 g/l	Triton X-100	20 g/l	Triton X-100	3 g/l	Triton X-100		
25	20 g/l	Tween20	20 g/l	Tween20	3 g/l	Triton X-100		
26	20 g/l	CHAPS	20 g/l	CHAPS	3 g/l	Triton X-100		
27	99 %	EtOH	99 %	EtOH	3 g/l	Triton X-100		
28	99 %	EtOH 10 min			3 g/l	Triton X-100		
25	20 g/l	Tween20	20 g/l	Tween20	3 g/l	Triton X-100		
29	20 g/l	Tween20	3 g/l	Triton X-100				
30	20 g/l	Tween20	20 g/l	Tween20				
31		Näytteessä 20 g/l Tween20	20 g/l	Tween20	20 g/l	Tween20		
32		Näytteessä 20 g/l Tween20	20 g/l	Tween20				

Näytteiden pipetoinnin ja suodatuksen jälkeen kaivoihin pipetoitiin 300 µl ensimmäistä pesuliuosta, joka suodatettiin heti. Tarvittavat lisäpesut suoritettiin samalla tavalla. Viimeisessä suodatuksessa oli aina pesuliuosta.

Triton X-100 ja Tween 20 ovat heikkoja, ei-ionisia detergenttejä, jotka eivät juuri denaturoi proteiineja. Niitä käytetään liuottamaan bakteerin kalvon proteiineja. Yleisesti näitä käytetään proteiinivuorovaikutusten entsyymimäärityksissä sekä immunomäärityksissä, joissa on tärkeää säilyttää alkuperäinen proteiinin rakenne ja toiminta. (Thermo Fisher Scientific, 2015)

## 5.6 Pesuliuosten vaikutus bakteereihin

Mikroskooppitarkastelua varten valmistettiin kolme näytettä. Ensimmäisessä näytteessä oli *E. coli* -bakteereja LB-mediumissa. Toinen näyte oli *E. coli* -bakteereja 20 g/l Tween20-liuoksessa ja kolmas näyte *E. coli* -bakteereja 3 g/l Triton X-100 -liuoksessa.

## 5.7 Mittauksen parametrit

Kuoppalevyt mitattiin Labrox-levylukijalla. Mittausprotokollaan oli määritetty seuraavat ominaisuudet: 340 nm europium virityssuodatin, 616 nm europium emissiosuodatin, mitausikkunan pituus 400  $\mu$ s ja viiveaika 400  $\mu$ s.

## 6 TULOKSET JA ARVIOINTI

Tavoitteena oli kehittää testi, jolla pystyttäisiin testaamaan antibioottien vaikutus bakteerien kasvuun. Antibioottiseulontatestin kehittäminen perustui epäspesifiseen sitoutumiseen ja epästabiiliin lantanidikelaatin aikaeroitteisen fluoresenssin mittaamiseen. Optimoinnin aikana kokeiltiin erilaisia suodatin- ja siirtokuoppalevyjä, muutettiin pesuolosuhteita ja optimoitiin kelaattiliuoksen koostumus. Kuvioissa käytetyt virhepalkit on laskettu kertomalla signaalisuhde suhteellisella virheellä.

Tuloksien vertailtavuuden takia mitatut signaalit esitetään signaalisuhteina. Signaalisuhde on laskettu kaavalla 3. Testeistä saadaan pieniä signaalisuhteita, kun bakteerit saavat kasvaa ilman antibioottia eli bakteerit lisääntyvät niille ominaisella jakautumisvauhdilla. Antibiootti taas rajoittaa bakteerien kasvua ja tällaisissa olosuhteissa signaalisuhde on korkea. Olosuhteiden optimoinnissa haetaan mahdollisimman pientä signaalisuhdetta. Antibiootin vaikutusta testattaessa suuri signaalisuhde kertoo antibiootin rajoittavan bakteerin kasvua.

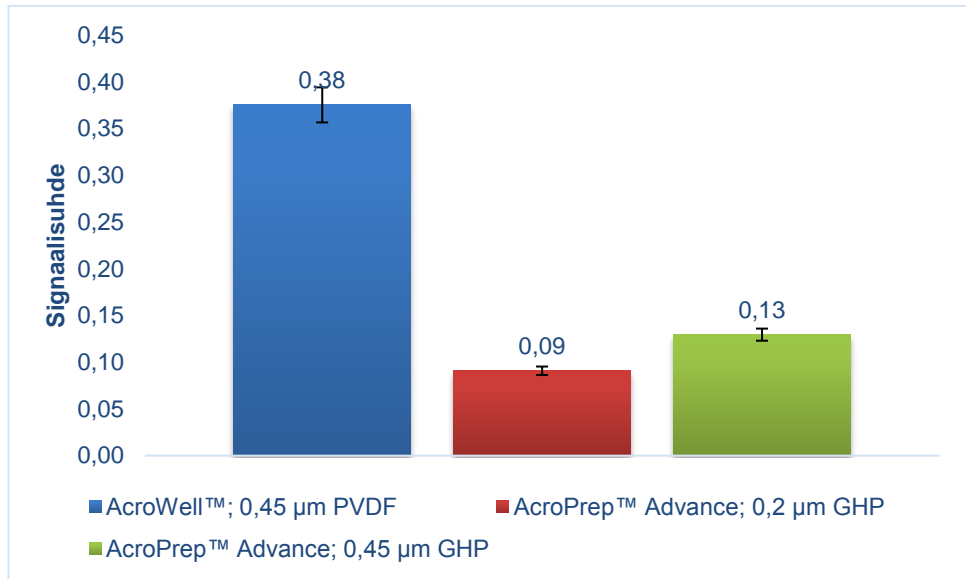
Kaava 3. Signaalisuhteen laskeminen.

$$\text{Signaalisuhde} = \frac{\text{bakteerinäytteen signaali}}{\text{nollanäytteen signaali}}$$

### 6.1 Kuoppalevyjen valinta

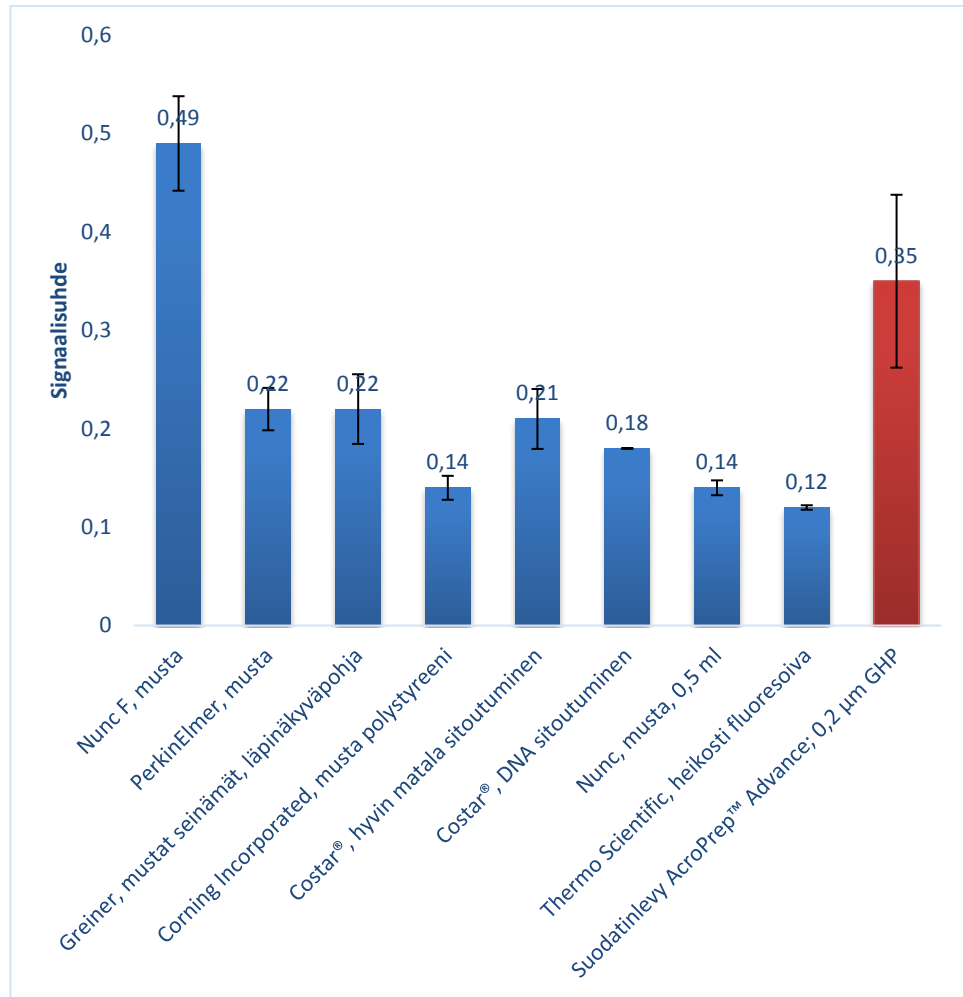
Menetelmää kehitettäessä testattiin erilaisia suodatin- ja siirtokuoppalevyjä. Testatut levyt on lueteltuna liitteessä 1.

Herkimmät tulokset bakteerinäytteille saatiin suodatinlevyltä 8082 (AcroPrep™ Advance; 0,2 µm GHP), jolla bakteerinäytteen ja nollanäytteen signaalien suhde oli kaikkein pienin. Levyllä 8082 signaalit erottuivat parhaiten toisistaan ja signaaleihin saatiin suurimmat muutokset. Kuvio 1 on esitettyinä signaalien erot vertailtaessa samojen olosuhteiden signaalisuhteita eri suodatinlevyillä valmistettuina.



Kuvio 1. Suodatinlevyjen vertailu.

Suodatinlevyltä näytteet siirrettiin siirtolevyille. Siirtolevyjen vaikutus on esitetty Kuvio 2. Siirtolevyjen testauksen jälkeen todettiin, että Thermo Scientificin heikosti fluoresoivalta levyistä saadaan parhaimmat signaalisuhteet. Menetelmä toimii myös kohtuullisesti mitattaessa suoraan suodatinlevyltä.



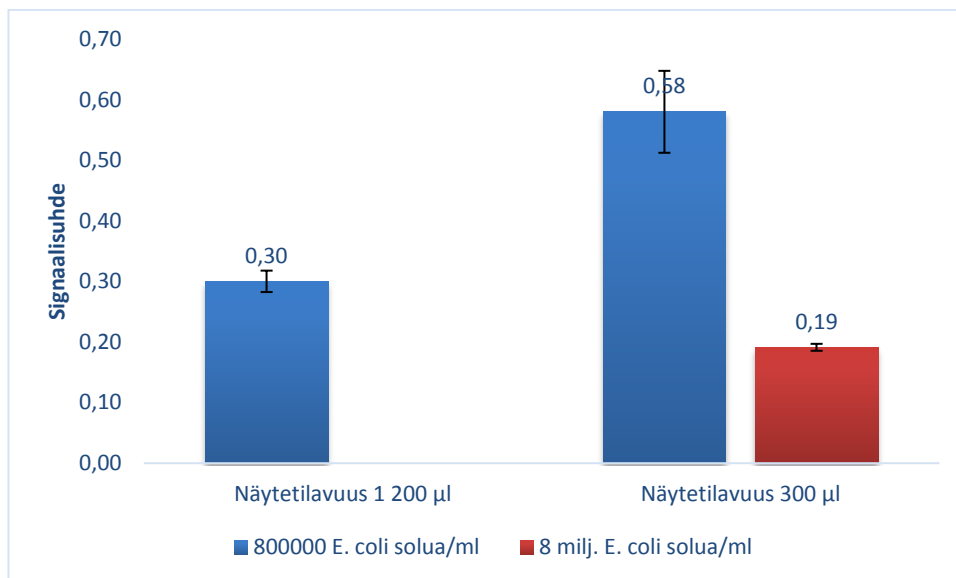
Kuvio 2. Menetelmän toimivuus käytettäessä erilaisia siirtolevyjä.

## 6.2 Näytetilavuuden määrittäminen

Testatut näytetilavuudet on lueteltuna kappaleessa 5.4 Näytetilavuuden variaatiot.

Testatuista näytetilavuuksista parhaimmat erot saatiin näytetilavuudella 1200 µl. Menetelmä toimii kuitenkin myös näytetilavuudella 300 µl. Näytetilavuuksien suhteiden vertailu on esitettyä Kuvio 3.





Kuvio 3. Näytetilavuuksien vertailu.

### 6.3 Pesuolosuhteiden optimointi

Menetelmän kehityksen aikana testatut erilaiset pesuolosuhteet on lueteltuna kappaleessa 5.5. Pesujen olosuhteet.

Pesuolosuhteiden vaikutusta signaalisuhteeseen on vertailtu liitteessä 2. Pesuja testattiin hieman erilaisilla näytetilavuuksilla ja bakteerinäytteillä. Tulosten yhdenmukaistamiseksi testatuista olosuhteista määritettiin bakteerien määrä kaivossa ja määrä muutettiin vakioksi suhdeluvun avulla.

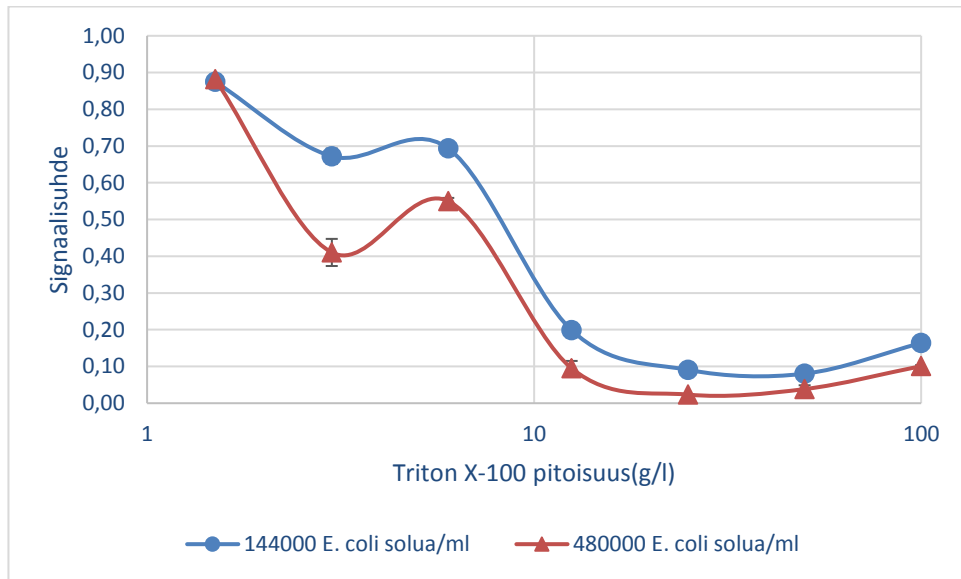
Kahdella erilaisella pesukombinaatiolla saatiin lähes yhtä hyvät tulokset. Peseminen kerran tai kaksi 20 g/l Tween20 ja sen jälkeen peseminen 3 g/l Triton X-100 -liuoksella lasivat suhdelukuja huomattavasti. Pesutilavuutena käytettiin 300 µl.

Mikroskoopitarkastelua varten valmistettiin kolme näytettä. Ensimmäisessä näytteessä oli E. coli -bakteereja LB-mediumissa. Toinen näyte oli E. coli -bakteereja 20 g/l Tween20-liuoksessa ja kolmas näyte E. coli -bakteereja 3 g/l Triton X-100 liuoksessa. Näytteitä tarkasteltiin silmämääräisesti mikroskoopin avulla. Näytteissä ei huomattu merkittäviä muutoksia, mutta bakteerien määrä ja liikehdintä saattoi hieman vähentyä detergentin läsnä ollessa.

### 6.4 Kelaattiliuoksen koostumus

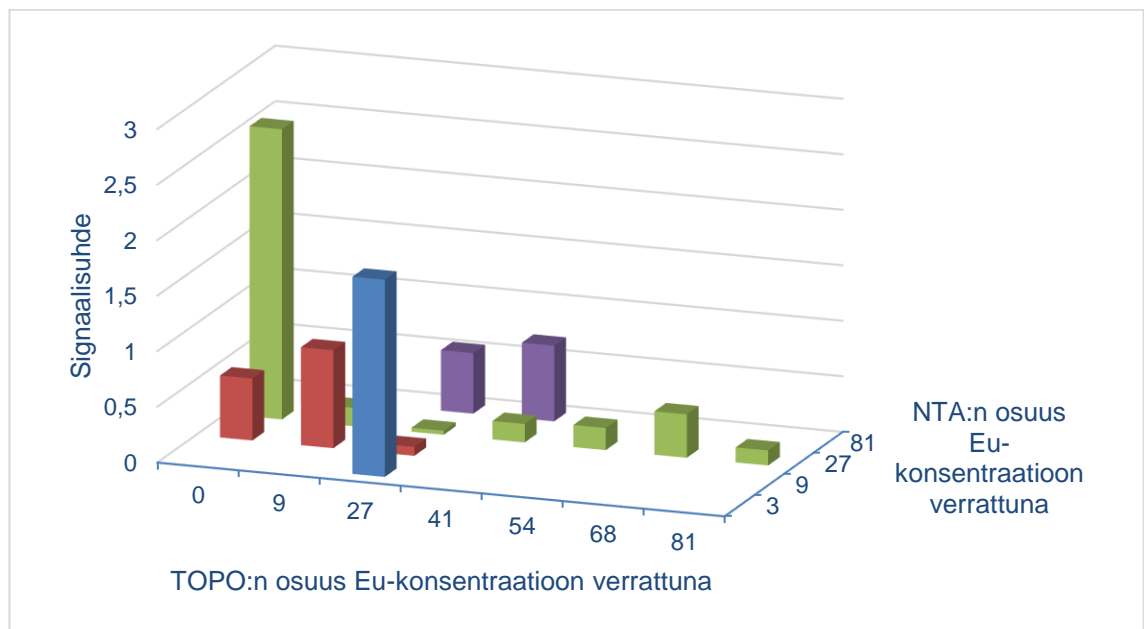
Erilaiset kelaattiliuoksen variaatiot löytyvät kappaleesta 5.2.2 Kelaattiliuosten valmistus. Liuos optimoitiin muuttaen Triton X-100 -pitoisuutta, Eu:NTA:TOPO-suhdetta ja Eu-konstraatiota.

Kelaattiliuoksen Triton X-100 -pitoisuuden vaikutus signaalisuhteeseen on esitetty Kuvio 4. Signaalisuhteita vertailtaessa huomattiin pitoisuuksien 25 g/l ja 50 g/l toimivan lähes yhtä hyvin. Optimointia jatkettiin pitoisuudella 25 g/l.



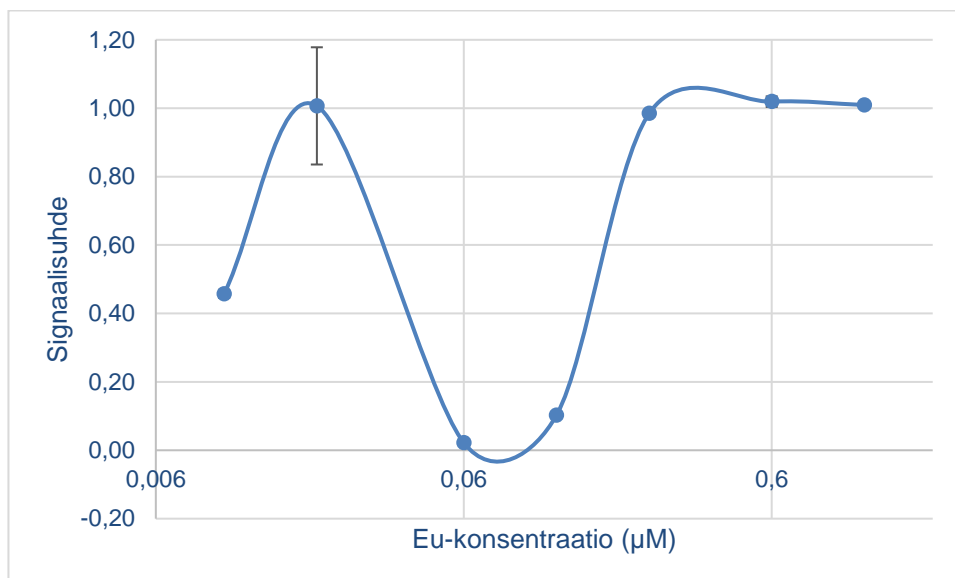
Kuvio 4. Kelaattiliuoksen Triton X-100 pitoisuuden vaikutus signaalisuhteeseen.

Optimoitaessa kelaattiliuoksen Eu:NTA:TOPO suhdetta, parhaimmaksi suhteeksi osoitautui 1:27:27, jolloin liuoksessa oli 0,12  $\mu\text{M}$  Eu, 3,3  $\mu\text{M}$  NTA ja 3,3  $\mu\text{M}$  TOPO konsentraatiot. Vertailu on esitetty Kuvio 5.



Kuvio 5. Kelaattiliuoksen Eu:NTA:TOPO suhteen vaikutus signaalisuhteeseen. Liuoksen Eu-pitoisuus oli vakio 0,12  $\mu\text{M}$ .

Optimaalisen Eu:NTA:TOPO suhteen löydyttyä testattiin Eu-pitoisuuden vaikutus. Vertailu on esitettyä Kuvio 6. Kelaattiliuoksen parhaimmaksi Eu-konsentraatioksi osoittautui 0,06  $\mu\text{M}$  Eu.

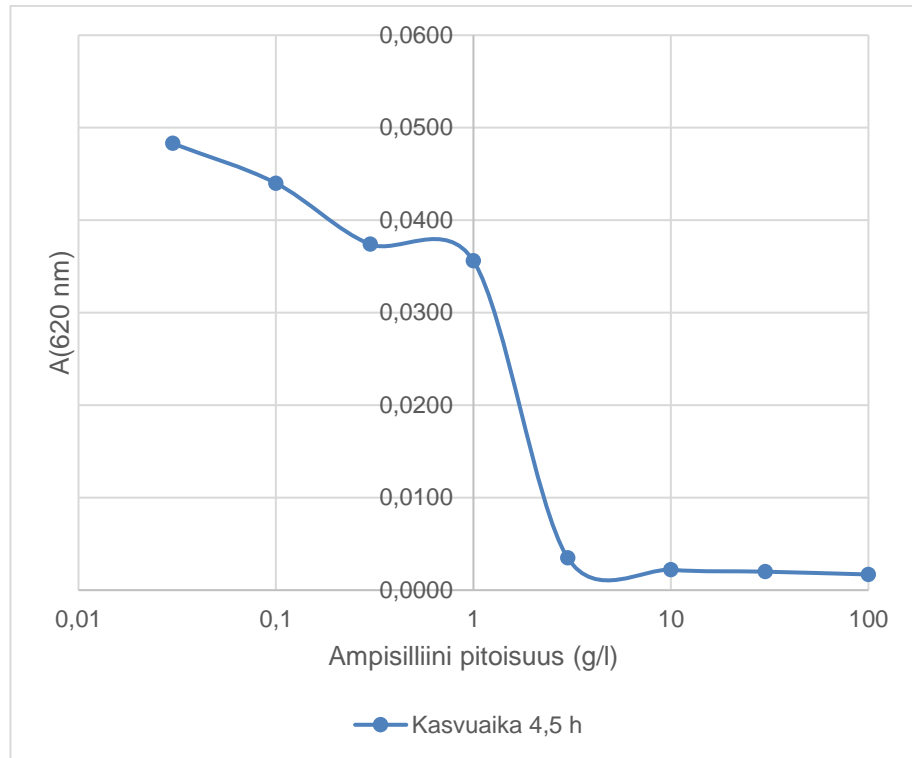


Kuvio 6. Kelaattiliuoksen europiumpitoisuuden vaikutus signaalisuhteeseen. Lantanidin määrää vaihdellaan, mutta Eu:NTA:TOPO suhde pysyy 1:27:27.

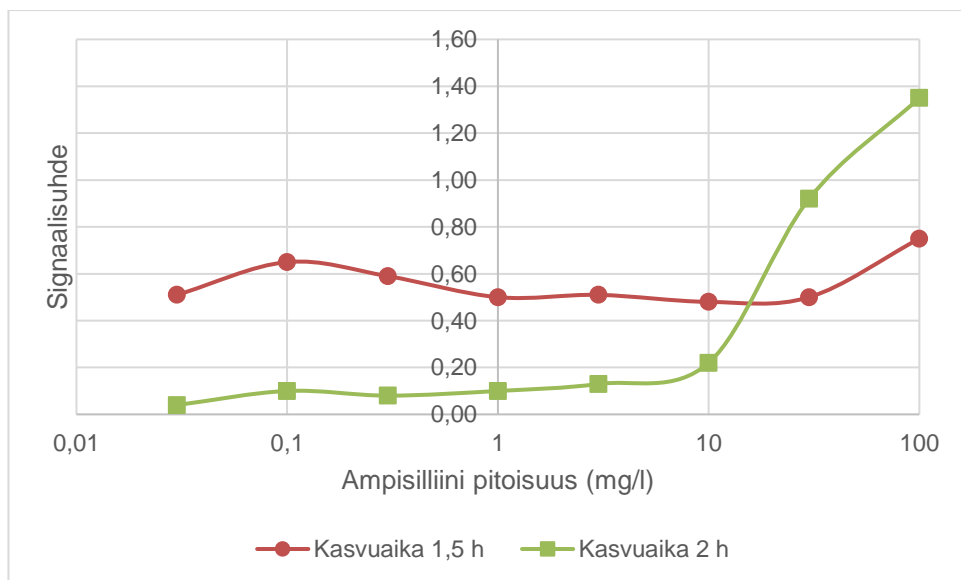
Optimoidun kelaattiliuoksen koostumus oli 0,06  $\mu\text{M}$  Eu, 1,6  $\mu\text{M}$  NTA, 1,6  $\mu\text{M}$  TOPO, jossa Eu:NTA:TOPO suhde oli 1:27:27 ja Triton X-100 pitoisuus 25 g/l.

### 6.5 Absorbanssimittaukseen vertaaminen

Kehitettyä menetelmää verrattiin bakteerinäytteiden absorbanssin mittaamiseen. Vertailutilanteessa yön yli kasvatetusta kannasta valmistettiin jatkokasvatuksia erilaisiin ampisilliinipitoisuuksiin. Yön yli kasvatetusta kannasta mitattiin absorbanssi ja siitä valmistettiin antibioottisarjoihin absorbanssi 0,00004, joka vastaa 32000 *E. coli* -solua/ml. Valmistetusta ampisilliinisarjasta otettiin näytteitä halutuin väliajoin ja näytteet analysoitiin sekä absorbanssimittauksella että kehitetyllä menetelmällä. Absorbanssia mitattaessa korkea bakteeripitoisuus näkyy korkeana signaalina, kun kehitetyssä menetelmässä matala signaalisuhde kertoo suuremmasta bakteeripitoisuudesta näytteessä. Kuvio 7 on absorbanssimenetelmän tulokset. Kuvio 8 on tulokset kehitetystä menetelmästä. Optimoiduilla olosuhteilla menetelmä havaitsee antibiootin suuren konsentraation vaikutuksen *E. coli* kasvuun jo kahden tunnin kuluttua. Menetelmällä on siis mahdollista havaita antibioottien vaikutus bakteerien kasvuun aikaisemmin kuin absorbanssin mittauksella.



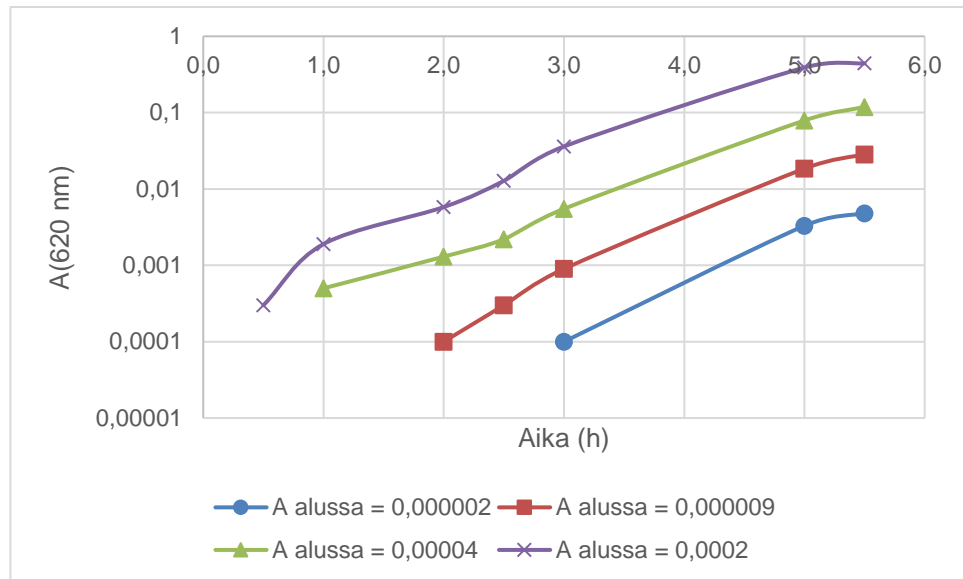
Kuvio 7. Ampisilliinipitoisuuden vaikutus *E. coli*-bakteerien kasvuun absorbanssimittauksessa.



Kuvio 8. Ampisilliinipitoisuuden vaikutus *E. coli*-bakteerien kasvuun mitattaessa kehitetyllä menetelmällä.

Menetelmät havaitsevat bakteerien kasvun luotettavasti eri nopeudella. Absorbanssia mitattaessa (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) absorbanssia 0,02 voidaan pitää jo

luotettavana. Kehitetyllä menetelmällä pystytään havaitsemaan bakteerimäärä, joka vastaa laskennallisena absorbanssina 0,00004:ää. Luotettavasti havaittavien absorbanssiarvojen ero vaikuttaa nopeuteen havaita bakteerien kasvu. Kuvio 9 on esitettyä *E. coli*-bakteerien kasvu, kun ampicilliinia ei ole läsnä. Kuvioista pystytään vertaamaan, kuinka nopeasti nämä eri menetelmät havaitsevat muutoksia. Esimerkiksi verrattaessa menetelmien nopeutta havaita kasvu, kun absorbanssiarvo on ollut alussa 0,000002, voidaan kuvioista arvioida, että kehitetty menetelmä havaitsee kasvun noin kahden ja puolen tunnin kuluttua, vastaavasti absorbanssimenetelmä havaitsee kasvun viiden ja puolen tunnin jälkeen.



Kuvio 9. *E. coli*-bakteerien kasvu, kun ampicilliinia ei ole läsnä.

Antibiottiseulontatestimenetelmän tarkkuus on 9,1 % ja herkkyys 32000 *E. coli* solua/ml. Menetelmän tarkkuus on laskettu kaikkien arvojen suhteellisen virheen keskiarvona. Herkkyys on laskettu kaavalla 2, käyttäen absorbanssiarvona 0,00004 ja näytetilavuutena 300  $\mu$ l.

## 7 PÄÄTELMÄT

Antibioottiresistenssin voittamiseksi on tärkeää kehittää menetelmiä, joilla vältetään turhien antibioottien käyttö. Kehittämällä menetelmiä antibioottien tehon tarkistamiseksi kyseiseen bakteeriin ennen lääkekuurin aloittamista vähennetään antibioottiresistenssin syntymahdollisuutta. Kehitettyä menetelmää voidaan käyttää antibioottien seulontaan. Menetelmä havaitsee bakteerien kasvun ja indikoi antibiootin vaikutuksen bakteeriin.

Verrattuna muihin antibioottien seulontaan tarkoitettuihin menetelmiin kehitetty menetelmä on helppokäyttöinen ja siinä on käytetty useista laboratorioista löytyviä instrumentteja. Menetelmän avulla on mahdollista havaita muutokset bakteerien jakautumisessa nopeammin kuin mittaamalla absorbanssia. Menetelmän perustuessa 96-kuoppalevyihin mahdollistuu suurien näytemäärien testaaminen yhtäaikaaisesti.

Menetelmä perustuu epäspesifiseen sitoutumiseen ja epästabiliin lantanidikelaatin aikaerotteisen fluoresenssin mittaamiseen. Menetelmä suoritetaan PALL Life Sciencesin valmistamalla AcroPrep™ Advance; 0,2 µm GHP 96-suodatinkuoppalevyllä, jonne pipetoidaan 1200 µl näytteitä. Näytteet suodatetaan ja sen jälkeen ne pestään 20 g/l Tween 20 ja 3 g/l Triton X-100 -liuoksilla. Pesutilavuutena käytetään 300 µl. Kuoppiin pipetoidaan 50 µl MilliQ-vettä ja levy laitetaan ravistelijaan. Kuoppiin lisätään 5 µl kelaattiliuosta, jossa on 0,06 µM Eu, 1,6 µM NTA ja 1,6 µM TOPO konsentraatiot, Eu:NTA:TOPO-suhteena 1:27:27 ja Triton X-100 -pitoisuutena 25 g/l. Kuoppalevy laitetaan ravisteluun. Inkubointiaika on noin 20 minuuttia. Levy mitataan aikaerotteisena fluoresenssina, jonka parametrit ovat 340 nm europium eksitaatiosuodatin, 616 nm europium emissiosuodatin, ikkunan leveys 400 µs ja viiveaika 400 µs.

Antibioottiseulontamenetelmän tarkkuus on 9,1 % ja herkkyys 32000 *E. coli* solua/ml. Menetelmää voidaan käyttää potilasnäytteisiin riippuen näytteessä olevasta bakteerimäärästä. Esimerkiksi virtsatulehduksen yhteydessä otetussa virtsanäytteessä on päivän inkuboinnin jälkeen 1000-100000 bakteeria/ml (Eskelinen, 2016). Tällaisilla potilasnäytteiden bakteerimäärillä menetelmää pystytään käyttämään oikean antibiootin ja pitoisuuden löytämiseen.

## 8 LÄHDELUETTELO

Agilent Technologies, 2016. *Biocalculators*. [Online]

Available at: <http://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp>

[Haettu 18 syyskuu 2016].

Aivelo, T., 2015. *Tiede*. [Online]

Available at:

[http://www.tiede.fi/blogit/kaiken takana on loinen/antibiootit ovat haviamassa kilpav arustelun bakteereille](http://www.tiede.fi/blogit/kaiken_takana_on_loinen/antibiootit_ovat_haviamassa_kilpav_arustelun_bakteereille)

[Haettu 15 elokuu 2016].

Chemicool, 2014. [Online]

Available at: <http://www.chemicool.com/definition/ligand.html>

[Haettu 16 elokuu 2016].

ChemSpider, 2015. [Online]

Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.23194.html>

[Haettu 10 syyskuu 2016].

Encyclopædia Britannica, 2016. [Online]

Available at: <https://global.britannica.com/science/chelate>

[Haettu 16 elokuu 2016].

Eskelinen, S., 2016. *Terveyskirjasto*. [Online]

Available at: [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk03153](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03153)

[Haettu marraskuu 2016].

European Centre for Disease Prevention and Control, EARS-Net, 2005-2016. [Online]

Available at:

[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/database.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx)

[Haettu 15 elokuu 2016].

European Centre for Disease Prevention and Control, juliste, 2005-2016. *Euroopan antibioottipäivä*. [Online]

Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/antibiotics-infographic-carbapenems-epi-stages.pdf>

[Haettu 10 elokuu 2016].

European Centre for Disease Prevention and Control, 2005-2016. *Euroopan antibioottipäivä*. [Online]

Available at: <http://ecdc.europa.eu/fi/eaad/antibiotics-get-informed/factsheets/Pages/general-public.aspx>

[Haettu 9 8 2016].

Helmenstine, A. M., 2016. *About Education*. [Online]

Available at: <http://chemistry.about.com/od/chemistryglossary/a/lanthanidesdef.htm>

[Haettu 16 elokuu 2016].

Hemmilä, I., Ståhlberg, T. & Mottram, P., 1994. *Bioanalytical applications of labelling technologies*. Turku: Wallac Oy.

iKnowledge, 2015. *Chapter 12 Laboratory Methods and Strategies for Antimicrobial Susceptibility Testing*. [Online]

Available at: <http://clinicalgate.com/laboratory-methods-and-strategies-for-antimicrobial-susceptibility-testing-2/>

[Haettu 27 lokakuu 2016].

Kivelä, P., 2003. Monileimalaskimet. *Analyysi*, 2003(4), p. 8.

Lumio, J., 2015. *Terveyskirjasto*. [Online]

Available at: [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01177](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01177)

[Haettu 11 elokuu 2016].

Lääkärilehti, 2010. *Vastustuskykyiset bakteerit suojelevat heikompiaan*. [Online]

Available at: <http://www.laakarilehti.fi/ajassa/ajankohtaista/vastustuskykyiset-bakteerit-suojelevat-heikompiaan/>

[Haettu 9 syyskuu 2016].

Lääkärilehti, 2016. *Raportti mikrobilääkeresistenssistä: 10 miljoonaa kuolee 2050*.

[Online]

Available at: <http://www.laakarilehti.fi/ajassa/ajankohtaista/raportti-mikrobilaakeresistenssista-10-miljoonaa-kuolee-2050/>

[Haettu 9 elokuu 2016].

MacGowan, A. & Macnaughton, E., 2013. Antibiotic resistance. *Medicine*, marraskuu, Issue 41, p. 642–648.

Mounyr, B., Moulay, S. & Saad Koraichi, I., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, huhtikuu, Volume 6, pp. 71-79.

Norden, 2011. *Globaali antibioottiresistenssi kuriin pohjoismaisella mallilla*. [Online]

Available at: <http://www.norden.org/fi/ajankohtaista/uutiset/globaali-antibioottiresistenssi-kuriin-pohjoismaisella-mallilla>

[Haettu 9 elokuu 2016].

Nykäsenoja, S. & Pekkanen, K., 2014. *Menetelmäohje Evira 3484/9: Bakteerien antibioottiherkkyden tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmällä*, s.l.: Evira.

Pihlasalo, S., 2011. *Quantification of proteins and cells - Luminometric Nonspecific Particle-Based Methods*. Turku: Turun Yliopisto.

Royal Society of Chemistry, 2015. *ChemSpider*. [Online]

Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.55380.html>

[Haettu 16 elokuu 2016].

Sigma Aldrich, 2016. [Online]

Available at: <http://www.sigmaaldrich.com>

[Haettu 16 elokuu 2016].

Solunetti, 2006. [Online]

Available at: <http://www.solunetti.fi/fi/>

[Haettu 11 elokuu 2016].



Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J., 2013. *Geenitekniikka*. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.

Terveyskirjasto, 2016. *Lääketieteen sanasto*. [Online]

Available at: [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ltt01566](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01566)

[Haettu 16 elokuu 2016].

Thermo Fisher Scientific, 2015. *Cell Lysis Solutions*. [Online]

Available at: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/cell-lysis-solutions.html#>

[Haettu 16 elokuu 2016].

Tieteen termipankki, 2014. [Online]

Available at: <http://tieteentermipankki.fi>

[Senest hentet eller vist den 28 elokuu 2016].

W.L.Scaff, JR D.L.Dyer & K.Mori, 1969. Fluorescent Europium Chelate Stain. *Journal of Bacteriology*, huhtikuu, Volume 98, pp. 246-248.

## Suodatin- ja siirtolevytyypit

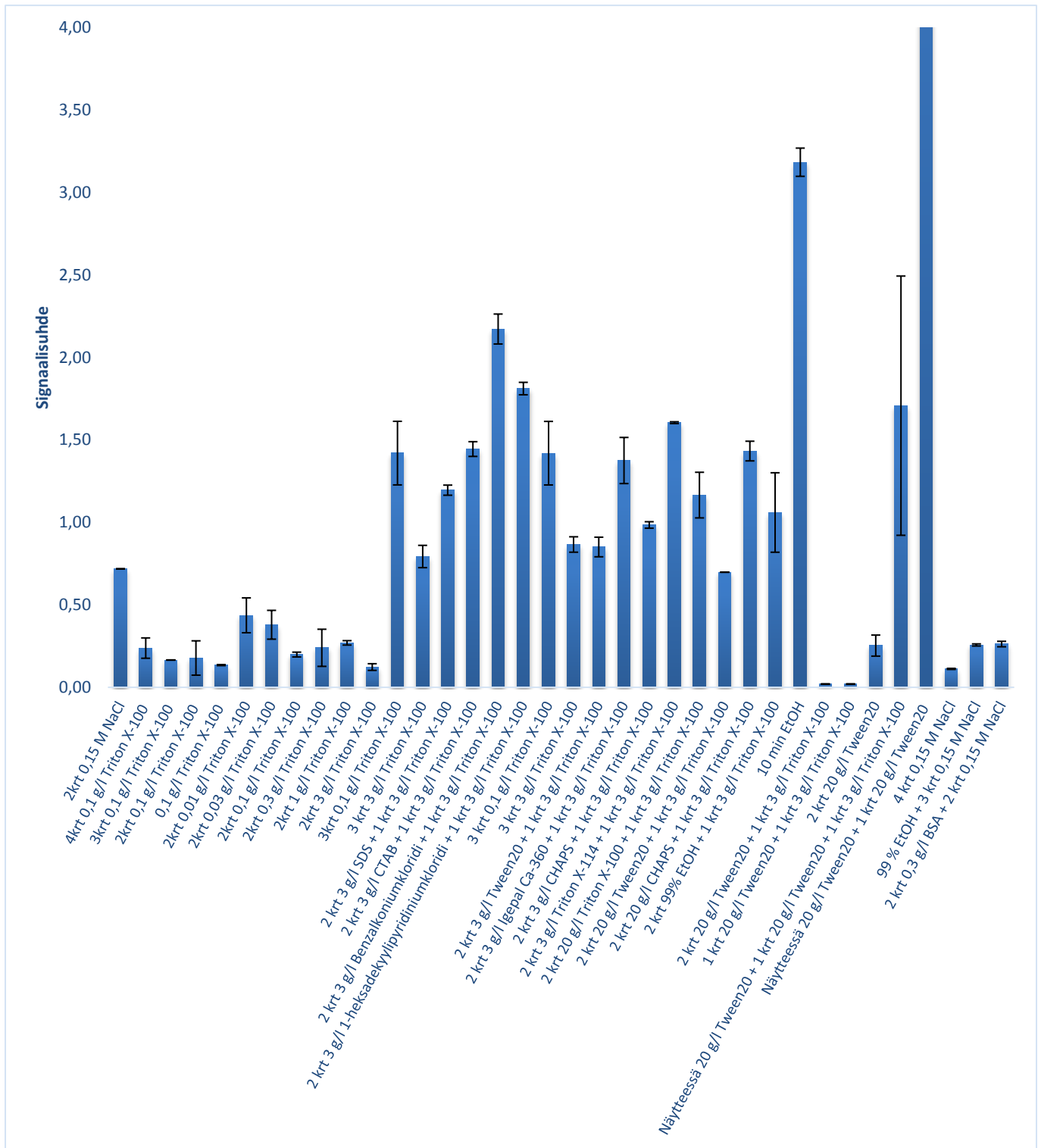
Taulukko 2. Suodatinlevytyypit.

Nimi	Levy- tyyppi	Tiedot
5020	96	AcroWell™ 96 suodatinlevy, GHP:stä valmistettu 0,45 µm suodatin, NTRL, 350 µl kaivot, PN 5020, Lot. 07550564, PALL Life Sciences
5027		AcroWell™ 96 suodatinlevy, BioTrace PVDF:stä valmistettu 0,45 µm suodatin, WHT, 350 µl kaivot, PN 5027, Lot. A10422338, PALL Life Sciences
8082		AcroPrep™ Advance 96 suodatinlevy, GHP:stä valmistettu 0,2 µm suodatin, NTRL, 350 µl kaivot, PN 8082, Lot. FZ7398, PALL Life Sciences
8084		AcroPrep™ Advance, GHP:stä valmistettu 0,45 µm suodatin, 350 µl kaivot, PN 8084, Lot. 317003, PALL Life Sciences
S5070	384	AcroPrep™ 384 suodatinlevy, GHP:stä valmistettu 0,45 µm suodatin, 100 µl kaivot, PN S5070, Lot. 023601, PALL Life Sciences

Taulukko 3. Siirtolevytyypit.

Nro	Levy- tyyppi	Tiedot
1	96	Nunc™, Musta 96
2		PerkinElmer, OptiPlate™, Musta 96
3		Greiner, musta 96, läpinäkyvä pohja, Lot. 07200119,
4		Corning Incorporated, 96 Half area -kaivo, ei LID, tasainen pohja, ei sitova pinta, mustaa polystyreeniä, Lot.. 01408003, 3993
5		Costar®, Ultra low cluster 3474, äärimmäisen alhainen sitovuus, 96 LID kuoppalevy, 34096210
6		Costar®, DNA-Bind, N-oksosukkinimidipinta amiinisidokselle, 96 kuoppalevy, 2525, 02699017
7		Nunc™, u-mallinen kaivo, mustaa polypropyleeniä, 96, 0,5 ml
8		Thermo Scientific, Low fluor maxi, läpinäkyvät keltaiset kaivot, 445600, C12, Lot. 141917, 2020-02
10	384	PerkinElmer, OptiPlate™, musta
11		Corning, Läpinäkyvä
12		Corning, NBS levy, musta polystyreeni
13		Nunc™, musta, matala kuoppalevy

# Pesuolosuhteiden vaikutus signaalisuhteeseen



Kuvio 10. Pesuolosuhteiden vaikutus signaalisuhteeseen kaivossa, jossa on 960 000 *E. coli* -solua/ml.