Bioaerosolien tunnistaminen mikrobispesifisillä koettimilla

Pro gradu **-tutkielma**
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Maaliskuu 2006
Maria Tuominen

Kiitokset

Tutkielma tehtiin Environics Oy:lle Puolustusvoimien teknillisessä tutkimuslaitoksessa Ylöjärvellä. Haluan kiittää Environics Oy:tä siitä, että sain mahdollisuuden tehdä tutkielman osana CBNS-teknologiaohjelmaa sekä Environics Oy:n tutkimus- ja tuotekehitystyötä. Lisäksi kiitän PvTT:ta puitteista ja välineistä, joilla työn toteutus oli mahdollista.

Kiitos työn ohjaajalle, dosentti Tarmo Humpille (PvTT), asiantuntevista neuvoista ja ohjauksesta sekä Tuuli Haatajalle avusta ja tuesta työn toteutuksessa. Kiitos myös kaikille muille työtovereille, joiden ansiosta Lakialassa on ollut mukava työskennellä.

Haluan kiittää myös professori Markku Kulomaata ja professori Seppo Parkkilaa (Tampereen yliopisto, IMT) opastuksesta tutkielman laatimisessa sekä työn kommentoinnista.

Lopuksi erityinen kiitos sisarelleni Tiinalle kärsivällisyydestä ja avusta tutkielman kirjoitustyössä sekä tietysti myös muulle perheelleni ja ystävilleni, jotka ovat kannustaneet minua koko työn ajan.

Tampere, maaliskuu 2006

Maria Tuominen

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka:	Tampereen Yliopisto, Lääketieteellisen teknologian instituutti Environics Oy Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos Räjähde- ja suojelutekniikkaosasto, Suojelutekniikan tutkimusala
Tekijä:	Tuominen, Maria Henriikka
Otsikko:	Bioaerosolien tunnistaminen mikrobispesifisillä koettimilla
Sivumäärä:	86
Ohjaaja:	Dosentti Tarmo Humppi, PvTT
Tarkastajat:	Professori Markku Kulomaa, Dosentti Tarmo Humppi
Aika:	Maaliskuu 2006

Tiivistelmä

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Biologisten taisteluaineiden käyttö on uhka, johon varaudutaan kehittämällä mahdollisimman nopeita ja tehokkaita menetelmiä taisteluaineagenssien havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi ympäristöstä. Tämän tutkielman tavoitteena oli kehittää virtaussytometriaan perustuva menetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa nopeasti *Bacillus anthracis (B.a.)* -itiöitä tai botuliinitoksiinin A-serotyyppiä veteen kerätyistä ilmanäytteistä.
Tutkimusmenetelmät: Tutkimuksessa testattiin kolmea eri tunnistusmenetelmää, kahta *B.a.*-itiöille sekä yhtä botuliinitoksiinille. *B.a.*-itiöiden tunnistusmenetelmistä toinen perustui vasta-ainetunnistukseen ja toinen spesifiseen peptidiligandiin. Botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmä perustui vasta-ainetunnistukseen. Tunnistusmenetelmiä testattiin näytteillä, jotka sisälsivät biologista taisteluainetta simuloivaa testiagenssia, eli joko inaktiivisia *B.a.*-itiöitä tai kaupallista botuliinitoksiinivalmistetta. Testinäytteet valmistettiin lisäämällä testiagenssia veteen kerättyyn ilmanäytteeseen. Näytteet analysoitiin kannettavalla virtaussytometrilla, jolla tunnistuksen onnistuminen havaittiin tunnistuskoettimiin liitettyjen fluoresoivien merkkiaineiden avulla. Tunnistusmenetelmille määritettiin detektiorajat, joita verrattiin kaupallisten immunokromatografisten pikatestien detektiorajoihin.
Tutkimustulokset: Tutkimuksessa testatuista kahdesta *B.a.*-vasta-aineesta toinen tunnisti hyvin *B.a.*-itiöitä ilmanäytteistä, ja lisäksi vasta-aineen epäspesifinen kiinnittyminen ilmanäytteen partikkeleihin tai muihin itiöihin oli varsin vähäistä. Sen sijaan toisella vasta-aineella ja peptidiligandikoettimella itiöiden tunnistus oli heikkoa. Botuliinitoksiinin tunnistus ilmanäytteestä onnistui erittäin hyvin tutkimuksessa käytetyllä menetelmällä ja testatuilla vasta-aineilla. Botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmän detektiorajaksi määritettiin parhaimmillaan 100 ng/ml. Virtaussytometriamenetelmällä saatiin alhaisempi detektioraja kuin kaupallisilla pikatesteillä sekä *B.a.*-itiöiden että botuliinitoksiinin tunnistuksessa.
Johtopäätökset: Virtaussytometria on erittäin käytännöllinen menetelmä bioaerosolien tunnistamisessa. Testatuista *B.a.*-itiöiden tunnistuskoettimista toinen vasta-aine on toimiva ja varsin tehokas. Sen sijaan toinen vasta-aine ja peptidiligandi eivät olleet käyttökelpoisia virtaussytometriaan perustuvassa tunnistusmenetelmässä. Tutkimuksessa kehitetty botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmä osoittautui tehokkaaksi ja spesifiseksi. Menetelmän kehitystyötä on aiheellista jatkaa, sillä menetelmästä voidaan mahdollisesti kehittää toimiva sovellus toksiinien tunnistamista varten.

MASTER'S THESIS

Place:	University of Tampere, Institute of Medical Technology Environics Oy Finnish Defence Forces Technical Research Centre Explosives and NBC Technology Division
Author:	Tuominen, Maria Henriikka
Title:	Identifying Bioaerosols with Microbe Specific Probes
Pages:	86
Supervisor:	Docent Tarmo Humppi, PvTT
Reviewers:	Professor Markku Kulomaa, Docent Tarmo Humppi
Date:	March 2006

Abstract

Background and Aims: *Bacillus anthracis (B.a.)* spores and botulinum neurotoxin (BoNT) are lethal agents that can be used as biological weapons. It is very important to be able to detect their presence in unknown samples rapidly. The aim of this study was to develop a flow cytometry-based technique for the detection of *B.a.* spores and BoNT from air samples.

Methods: The detection techniques developed in this study are based on specific fluorescence-labelled probes. *B.a.* spores were examined with two types of probes – antibodies and a peptide ligand – and BoNT with one probe type (antibodies). The test samples in the study were air samples collected into water, and the test agents (*B.a.* spores or BoNT) were added into the samples before flow cytometer analysis. The samples were analysed by using a portable flow cytometer. Detection limits for the techniques were determined and the results were compared to the detection limits determined for commercial immunochromatographic tests.

Results: One of the two *B.a.* antibodies tested in the study recognized the *B.a.* spores quite well from the air samples. The other antibody and the peptide ligand did not recognize *B.a.* spores adequately. The botulinum toxin identification technique was effective and specific and was found to have a detection limit of 100 ng/ml.

Conclusions: Flow cytometry is a good technique for analysing bioaerosols. Antibodies can be used as detection probes for both *B.a.* and BoNT. The botulinum toxin detection technique used in this study is particularly useful and looks promising for further development.

Sisällysluettelo

LYHENTEET 6

1. JOHDANTO 7

2. KIRJALLISUUSKATSAUS 9

2.1. Biologiset taisteluaineet 9
2.1.1. Yleistä 9
2.1.2. Bioaerosolit 11

2.2. *Bacillus anthracis* ja botuliinitoksiini biologisina taisteluaineina 12
2.2.1. *Bacillus anthracis* 12
2.2.1.1. Pernarutto 12
2.2.1.2. Rakenne ja toiminta 14
2.2.1.3. *Bacillus anthracis* taisteluaineena 16
2.2.2. Botuliinitoksiini 17
2.2.2.1. Botulismi 17
2.2.2.2. Botuliinitoksiinin rakenne ja toiminta 19
2.2.2.3. Botuliinitoksiinin käyttö taisteluaineena 19

2.3. Bioaerosolien havaitseminen ja tunnistus 20
2.3.1. Aerosolin havaitseminen ja alustava tunnistus 21
2.3.2. Näytteenotto 22
2.3.3. Bioaerosolien tunnistaminen 23
2.3.3.1. Mikrobiologiset menetelmät 23
2.3.3.2. Molekyylibiologiset menetelmät 23
2.3.3.3. Immunologiset menetelmät 27
2.3.3.4. Muut menetelmät 30

2.4. Virtaussytometria 31
2.4.1. Toimintaperiaate 31
2.4.1.1. MICROCYTE® field -virtaussytometri 33
2.4.2. Virtaussytometrian käyttö 33
2.4.2.1. Leimaustekniikat 34
2.4.3. Virtaussytometria bioaerosolien tutkimisessa 36

2.5. Tutkimuksessa käytettävien tunnistusmenetelmien teoreettinen tausta 37
2.5.1. *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistaminen 37
2.5.1.1. Vasta-ainetunnistus 37
2.5.1.2. Tunnistus peptidiligandilla 38
2.5.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen 39

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET 41

4. MENETELMÄT 42

4.1. Testiagenssit 42
4.1.1. Itiöt 42
4.1.2. Botuliinitoksiini 43

4.2. Ilmanäytteet 44

4.3. *Bacillus anthracis* -itiöiden vasta-ainetunnistus 44
4.3.1. Vasta-aineet 44
4.3.2. Tunnistusreaktio 45

4.4. *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistus peptidiligandilla 46
4.4.1. Peptidiligandi 47
4.4.2. Tunnistusreaktio 47

4.5. Botuliinitoksiinin vasta-ainetunnistus 48
4.5.1. Vasta-aineet 48
4.5.2. Tunnistusreaktio 49

4.6. Virtaussytometria 50

4.7. Immunokromatografiset pikatestit 51
4.7.1. Testinäytteet 51
4.7.2. Pikatestit 51

5. TULOKSET 53

5.1. *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistaminen 53
5.1.1. Vasta-ainetunnistus 53
5.1.1.1. Vasta-aineiden testaus 53
5.1.1.2. *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistaminen ilmanäytteestä 56
5.1.2. Tunnistus peptidiligandilla 60

5.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen 65
5.2.1. Tunnistusmenetelmän testaus 65
5.2.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen ilmanäytteestä 68

5.3. Immunokromatografiset pikatestit. 69

6. POHDINTA 70

6.1. *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistaminen 70
6.1.1. Vasta-ainetunnistus 70
6.1.2. Tunnistus peptidiligandilla 74

6.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen 75

7. JOHTOPÄÄTÖKSET 79

8. LÄHDELUETTELO 80

Lyhenteet

B.a.	*Bacillus anthracis*
B.s.	*Bacillus subtilis*
B.t.	*Bacillus thuringiensis*
BoNT	Botulinum neurotoxin (botuliinitoksiini)
CBNS	Chemical, Biological, Nuclear, Status (tilannetieto)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Yhdysvaltain tartuntatautikeskus)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FLAPS	Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer
FLISA	Fluorescence-linked immunosorbent assay
IMS-ECL	Immunomagnetic separation-electrochemiluminescence assay
kDa	Kilodalton
LCR	Ligase chain reaction
LIDAR	Light detection and ranging
MSA	Mangaanisulfaattiagar
NA	Nutrient Agar -kasvatusalusta
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
PBS	Phosphate-buffered saline (fosfaattipuskuroitu suolaliuos)
PCR	Polymerase chain reaction (polymeraasiketjureaktio)
PMY	Pesäkkeen muodostava yksikkö
SASS	Smart Air Sampler System
TRF	Time-resolved fluorescence assay
TSA	Tryptone Soya Agar -kasvatusalusta
TSB	Tryptone Soya Broth -kasvatusliuos
VOAG	Vibrating orifice aerosol generator

1. Johdanto

Erilaisia biologista alkuperää olevia aineita on historiallisesti käytetty usein niin taisteluaineina sotatilanteessa kuin terrorismin välineinäkin (Guillemin, 2005). Biologiset taisteluaineet ovat vieläkin todellinen uhka, vaikka useimmat valtiot ovatkin allekirjoittaneet bioaseet kieltävän sopimuksen (Sims, 2001). Kansainväliset sopimukset eivät estä terroristijärjestöjä tai sopimukseen kuulumattomia maita kehittämästä biologisia taisteluaineita, joten niiden mahdolliseen käyttöön pitää varautua.

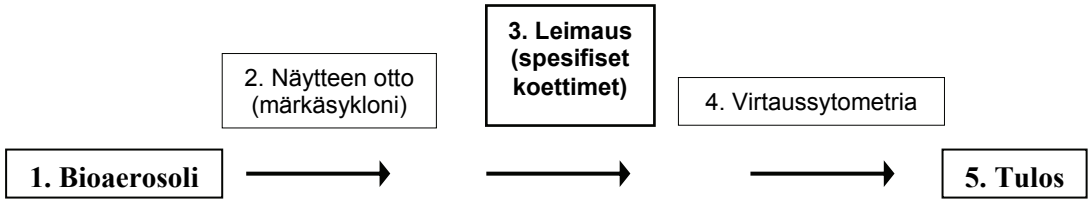
Biologiseen uhkaan varauduttaessa on tärkeää kehittää tehokas välineistö taisteluaineen havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi. Ensimmäinen havainto biologisen taisteluaineen käytöstä pitäisi saada mahdollisimman aikaisessa vaiheessa, jotta joukot voitaisiin suojata ja he voisivat jatkaa toimintaansa. Tällöin myös altistuneet henkilöt saataisiin hoitoon riittävän ajoissa ja muut altistumiset voitaisiin estää. Koska bioaerosoli on yksi todennäköisimmistä biologisten taisteluaineiden levitysmuodoista, olisi havainto taisteluaineen käytöstä parasta tehdä suoraan ilmasta. Nykyisellä välineistöllä biologiset taisteluaineet havaitaan todennäköisesti vasta ensimmäisten oireiden ilmettyä ihmisillä tai eläimillä. Tällöin on usein jo liian myöhäistä parantaa tauti altistuneilta henkilöiltä sekä suojata muut. Tämä johtuu siitä, että oireet voivat ilmetä vasta useiden päivien kuluttua altistumisesta. Tästä johtuen onkin erittäin tärkeää kehittää uusia, nopeampia ja tehokkaampia biologisten agenssien ja erityisesti bioaerosolien tunnistus- ja havaitsemismenetelmiä.

Tämä *pro gradu* -tutkielma on osa Suomen puolustusvoimien CBNS-teknologia-ohjelmaa. Teknologiaohjelman tavoitteena on kehittää kemiallisten ja biologisten aineiden ilmaisuun ja tunnistamiseen laitteita, joista voidaan lopulta rakentaa yleiseen valvontajärjestelmään kytkettävissä oleva liikutettava valvonta- ja mittausasema. CBNS-teknologiaohjelmassa on puolustusvoimien lisäksi mukana suomalaisia tiede-yhteisöjä sekä yrityksiä. Päävastuussa laitteiston valmistuksesta on kaasuntunnistus-laitteisiin erikoistunut Environics Oy. (Mäkinen, 2004.)

Tässä tutkimuksessa testataan, onko biologisia taisteluaineita mahdollista tunnistaa virtaussytometriaan perustuvalla nopealla menetelmällä. Virtaussytometriaa käytetään monissa solubiologisissa tutkimuksissa, ja viime aikoina sitä on yhä enemmän sovel-lettu myös mikrobiologisiin mittauksiin. Virtaussytometrin avulla voidaan saada

monenlaista tietoa tutkittavasta näytteestä, esimerkiksi näytteessä olevien partikkelien määrästä sekä kokojakaumasta. Tämän lisäksi virtaussytometrilla voidaan havaita erillisiä solupopulaatioita näytteen seasta, mikäli halutunlaiset solut tunnistetaan jollakin spesifisellä koettimella.

Tutkimuksessa kehitetään bioaerosolien tunnistusmenetelmä, jossa aerosolinäyte kerätään märkäsyklonikeräimellä ja biologiset agenssit tunnistetaan näytteestä spesifisten tunnistuskoettimien sekä virtaussytometrian avulla. Kaavio kehitettävästä tunnistusmenetelmästä on kuvassa 1.1. Tutkimuksen painopiste on kuvan kohdassa 3, sillä tutkimuksessa keskitytään erilaisten tunnistuskoettimien (vasta-aineiden ja peptidiligandin) ominaisuuksien testaamiseen.



Kuva 1.1. Tutkimuksessa kehitettävä bioaerosolien tunnistusmenetelmä

Tunnistusmenetelmästä voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti kehittää automatisoitu järjestelmä, jossa kaikki tunnistuksen osa-alueet on yhdistetty samaan laitteeseen. Tällöin bioaerosolit voitaisiin tunnistaa suoraan ilmasta, mikä olisi paras tilanne biologisten taisteluaineiden havaitsemisessa. Tällöin olisi myös mahdollista seurata jatkuvasti ilman bioaerosolien koostumusta.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1. Biologiset taisteluaineet

2.1.1. Yleistä

Biologiseksi sodankäynniksi katsotaan toiminta, jossa mikro-organismeja tai biologista alkuperää olevia toksiineja käytetään tarkoituksellisesti aiheuttamaan haittaa joko ihmisille, karjalle tai viljelykasveille. Biologiset taisteluaineet ovat sodankäynnin välineenä monella tavoin muita taisteluaineita tehokkaampia, muun muassa siksi, että ne ovat varsin helposti saatavilla sekä vaikeasti havaittavissa. (DaSilva, 1999.)

Biologisia agensseja on käytetty sodassa jo vuosisatoja sitten. Esimerkiksi 1300-luvulla nykyisen Ukrainan alueella tataarit sinkosivat ruttoon kuolleiden ihmisten ruumiita Kaffan kaupunkiin tarkoituksenaan levittää tautia vihollisen keskuuteen. Myös muita vastaavia tapauksia on ollut eri puolilla maailmaa. Systemaattinen biologisten taisteluaineiden kehitystyö alkoi vasta 1900-luvulla modernien tutkimusmenetelmien kehittyessä. 1900-luvun alkupuolella useat valtiot kehittivät biologisia taisteluaineita sotilaalliseen käyttöön. Ensimmäisen maailmansodan jälkeen biologisten taisteluaineiden käyttö kuitenkin kiellettiin Geneven sopimuksella (1925). Tästä huolimatta biologisten taisteluaineiden kehitystyö jatkui muun muassa useissa suurvalloissa, kuten USA:ssa ja Neuvostoliitossa. Kehitystyö johti biologisten taisteluaineiden käyttöön valtioiden välisissä sotatilanteissa ainoastaan kerran, kun Japani levitti ruttoa ja koleraa Kiinassa 1940-luvulla. Vuonna 1972 useat valtiot allekirjoittivat sopimuksen (Biological Weapons Convention), joka kieltää biologisten taisteluaineiden kehitystyön. Biologisista taisteluaineista onkin viime aikoina tullut uhka lähinnä sopimukseen kuulumattomien valtioiden sekä yksityisten terroristijärjestöjen toiminnan vuoksi. (DaSilva, 1999; Sims, 2001; Guillemin, 2005.)

On olemassa useita erilaisia biologista alkuperää olevia aineita, joita voidaan mahdollisesti käyttää biologisena taisteluaineena. Yhdysvaltain terveysministeriön alainen tartuntatautikeskus CDC on laatinut listan mahdollisista biologisista taisteluaineista (Centers for Disease Control and Prevention, 2004). Listalla on noin 40 erilaista taisteluaineagenssia, joista valtaosa on biologisiksi taisteluaineiksi soveltuvia mikrobeja

ja toksiineja. Taulukossa 2.1 on lueteltu tunnetuimpia biologisiksi taisteluaineiksi soveltuvia agensseja ja niiden aiheuttamia tauteja.

Taulukko 2.1. Mahdollisia biologisia taisteluaineita

	Agenssi	*Tauti*
Bakteerit	*Bacillus anthracis*	Pernarutto
	Yersinia pestis	Rutto
	Brucella suis	Bruselloosi
	Francisella tularensis	Tularemia
	Burkhoideria pseudomallei	Melioidoosi
Riketsiat	*Coxiella burnetii*	Q-kuume
Virukset	Isorokkovirus	Isorokko
	Venezuelan hevosenkefaliittivirus	
	Läntinen hevosenkefaliittivirus	
Toksiinit	Botuliinitoksiini	Botulismi
	Stafylokokkienterotoksiini B (SEB)	
	Risiinitoksiini	

Mahdolliset biologiset taisteluaineet, jotka on tarkoitettu aiheuttamaan vahinkoa ihmisille, ovat joko bakteereja, viruksia, riketsioita tai toksiineja. Biologisten taisteluaineiden vaarallisuus perustuu paitsi niiden aiheuttamien tautien vakavuuteen, myös siihen, että jo pienellä määrällä biologista ainetta voidaan saada aikaan mittavia vahinkoja. Biologisia taisteluaineita tarvitaan vain murto-osa esimerkiksi kemiallisten taisteluaineiden määrästä, jotta saadaan aikaan samanlainen tuhovaikutus. Lisäksi useita biologisia taisteluaineita on varsin helppo hankkia ja valmistaa yksinkertaisissakin mikrobiologisissa laboratorioissa, kun taas kemiallisten taisteluaineiden valmistus vaatii yleensä ammatillista erityisosaamista sekä erityisvälineistön. (Kortepeter & Parker, 1999; Huovinen, 2003.)

Mikäli biologista alkuperää olevia aineita halutaan käyttää taisteluaineina, ne tulee ensin saattaa muotoon, jossa ne ovat helposti levitettävissä. Mahdollisia asemuotoja biologisille agensseille ovat esimerkiksi jauhe ja aerosoli, joista aerosolia pidetään usein todennäköisimpänä vaihtoehtona. Sopivaan asemuotoon saattamisen lisäksi biologinen taisteluaine pitää siis myös saada levitettyä mahdollisimman tehokkaasti tarkoitettuun kohteeseen. Levityskeinoja on useita, ja ainakin laajamittaista lentokoneesta tapahtuvaa aerosolilevitystä pidetään sotatilanteessa mahdollisena. (Kortepeter & Parker, 1999.) Lisäksi on olemassa tarkemmin kohdistettuja levitysmuotoja. Yksi esimerkki tällaisesta on USA:ssa vuonna 2001 tapahtunut pernaruton levittäminen kirjeiden mukana. (Jernigan ym., 2001; Griffith ym., 2003).

Aerosolin katsotaan usein olevan toimivin muoto biologisten taisteluaineiden levittämiseen. Aerosolina taisteluaine saadaan levitettyä varsin helposti ja huomaamattomasti laajallekin alueelle, jolloin tuhovaikutus on mahdollisimman suuri. Tässä on kuitenkin myös haittapuolia, sillä aerosolin levitystä on vaikea kohdistaa tarkasti, ja siksi myös levittäjä ja sivulliset voivat altistua taisteluaineelle. Lisäksi vaikutukset havaitaan hitaasti ja niitä on vaikea ennakoida, koska kohteen altistumisesta ei voida olla täysin varmoja. (Guillemin, 2005.)

2.1.2. Bioaerosolit

Aerosolit koostuvat kaasuun suspensoituneesta materiaalista. Bioaerosoleissa nämä kaasussa olevat partikkelit ovat peräisin biologisesta lähteestä tai ovat biologisesti aktiivisia, eli ne voivat vaikuttaa eläviin organismeihin aiheuttamalla esimerkiksi allergisen reaktion. Bioaerosoli voi sisältää muun muassa bakteereja, viruksia tai niiden osia, sieni-itiöitä, siitepölyä tai erilaisten eliöiden tuottamia aineita. (Hirst, 1995.) Bioaerosolit muodostuvat usein luonnollisesti, kuten siitepöly. Niitä voidaan kuitenkin myös valmistaa keinotekoisesti, mikä mahdollistaa biologisten taisteluaineiden aerosolimuotoisen tuottamisen (Mohr, 2005).

Bioaerosolien partikkelit ovat kooltaan varsin vaihtelevia. Ne voivat olla halkaisijaltaan 0,5–100 µm (Hirst, 1995). Ihmiselle vaarallisimpia ovat alle 5 µm:n kokoiset partikkelit, koska ne voivat kulkeutua syvälle keuhkoihin, keuhkorakkuloihin asti ja aiheuttaa hengitystiesairauksia (Haug ym., 1999).

Bioaerosolit ovat fysikaalisilta ominaisuuksiltaan samanlaisia kuin muut aerosolit. Fysikaaliset ilmiöt, kuten painovoima tai sähköiset voimat, vaikuttavat siis bioaerosolien aerodynaamiseen käyttäytymiseen samalla tavalla kuin muihin aerosoleihin. (Cox, 1995a.) Fysikaalisilla ilmiöillä voi olla vaikutusta myös bioaerosolien koostumukseen. Bioaerosoleille on usein tärkeää, että niiden sisältämät mikro-organismit säilyvät elinkykyisinä. Esimerkiksi ympäristön ilmankosteus, lämpötila, happipitoisuus sekä sähkömagneettinen säteily vaikuttavat mikrobien elinkykyyn. (Cox, 1995b; Mohr, 2005.)

Biologista alkuperää olevat aineet voidaan saattaa aerosolimuotoon useilla eri tekniikoilla. Eri tekniikoilla on mahdollista valmistaa partikkelikooltaan erilaisia aerosoleja. Bioaerosolien tuottamiseen käytetyt aerosoligeneraattorit ovat joko kuiva-

tai märkägeneraattoreita. Usein käytettyjä aerosoligeneraattoreita ovat esimerkiksi kuivageneraattori VOAG sekä märkägenerointiin perustuva paineilmasumutin (*nebulizer*). (Mitchell, 1995.)

2.2. Bacillus anthracis *ja botuliinitoksiini biologisina taistelu-aineina*

Bacillus anthracis sekä botuliinitoksiini ovat pelättyjä biologisia taisteluaineita. Molemmat ovat erittäin vaarallisia, ja jo pienillä määrillä näitä agensseja voidaan altistaa suuri joukko ihmisiä ja/tai eläimiä (Guillemin, 2005).

2.2.1. *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis on bakteeri, joka aiheuttaa erittäin vakavan infektiosairauden, pernaruton. *Bacillus anthracis* on gram-positiivinen, itiöitä muodostava aerobinen bakteeri, ja se kuuluu *Bacillus*-sukuun. *Anthracis*-nimi tulee kreikankielen sanasta *anthrakis*, joka tarkoittaa hiiltä. Nimi johtuu siitä, että pernarutossa esiintyy hiiltä muistuttavia mustia ihovaurioita. (Murray ym., 2002, s.240.)

2.2.1.1. Pernarutto

Pernarutto on *Bacillus anthracis* -bakteerin aiheuttama infektiosairaus, jota esiintyy lähinnä karjaeläimillä. Pernaruttoa ei juuri esiinny länsimaissa, mutta se on varsin yleinen karjatauti Etelä-Amerikassa ja Afrikassa. Myös muualla maailmassa on satunnaisia karjan pernaruttotapauksia vuosittain. (Pile ym., 1998; Eskola ym., 2000.)

Pernarutto puhkeaa, kun bakteerin itiöitä kulkeutuu elimistöön, missä ne alkavat lisääntyä. Elimistön makrofagit ottavat itiöt sisäänsä ja kuljettavat ne imusolmukkeisiin. Itiöt kehittyvät eläviksi bakteereiksi makrofagien sisällä. Vegetatiiviset bakteerit vapautuvat makrofageista imukudokseen, lisääntyvät siellä ja kulkeutuvat vereen aiheuttaen lopulta verenmyrkytyksen. Bakteerien myrkyllisyys johtuu niiden vapauttamista toksiineista, jotka aiheuttavat toksemian joutuessaan verenkiertoon. Hoitamattomana myrkytystila johtaa eliön kuolemaan. (Dixon ym., 1999; Hanna & Ireland, 1999; Murray ym., 2002, s.240.)

Pernarutto voi tarttua myös ihmiseen, mikä tapahtuu yleensä sairastuneen eläimen tai *B.a.*-bakteerin itiöitä sisältävän eläinperäisen tuotteen välityksellä. Ihmisestä toiseen tauti ei kuitenkaan tartu. Tartunnan aiheuttavat itiöt voivat joutua ihmisen elimistöön

kolmea eri reittiä, mistä johtuen pernaruttoa esiintyy ihmisellä kolmessa eri kliinisessä muodossa: ihoinfektiona, ruuansulatuskanavan infektiona sekä hengitystieinfektiona. Näistä ihoinfektiota esiintyy eniten (noin 95 % kaikista pernaruttotapauksista), ja se on myös helpoin diagnosoida ja hoitaa. Ruuansulatuskanavan infektiota esiintyy ihmisellä todella vähän, mutta eläimillä tämä on taudin yleisin muoto. (Murray ym., 2002, s.241.) Myös hengitysteitse tarttunut pernarutto on nykyään erittäin harvinainen. Tapauksia on ollut viime vuosikymmeninä vain muutamia. (Inglesby ym., 2002).

Bakteeritartunnan saamista seuraa yleensä latenttiaika ennen pernaruton puhkeamista. Latenttiaika voi kestää muutamasta päivästä jopa kuukausiin. Ihopernaruton ja ruuansulatuskanavan pernaruton oireet ilmenevät nopeasti tartunnan jälkeen, mutta hengitysteiden pernarutto voi olla pitkään oireeton. Pernaruton ensimmäiset oireet ovat varsin vaikeita tunnistaa. Hengitysteitse tarttuneen pernaruton alkuvaiheessa esiintyy lähinnä flunssaa muistuttavia oireita (esimerkiksi kuumetta, päänsärkyä ja yskää), ja vakavammat oireet, kuten nopeasti nouseva kova kuume sekä välikarsinan imusolmukkeiden voimakas suurentuminen, ilmenevät vasta myrkytystilan edetessä. Ihotartunta on hieman helpompi tunnistaa ihovaurioiden erikoisen, hiiltä muistuttavan, mustan ulkonäön takia. Suoliston pernaruttotartunnan oireita ovat muun muassa suun ja ruokatorven haavaumat, pahoinvointi sekä verioksentelu. (Eskola ym., 2000; Murray ym., 2002, s.242.)

Kaikki pernaruton muodot ovat erittäin vaarallisia ja tappavia, mutta kuolleisuus on erittäin suuri erityisesti hengitysteiden ja ruuansulatuskanavan pernarutossa. Näitä pernaruton muotoja on vaikea diagnosoida alkuvaiheen oireiden perusteella, jolloin hoito päästään aloittamaan yleensä liian myöhään. Esimerkiksi hengitysteiden pernarutossa vakavien oireiden ilmetessä myrkytystila on edennyt jo niin pitkälle, että lähes kaikki potilaat kuolevat kolmen päivän kuluessa. Kuolleisuus näissä pernaruton tyypeissä onkin lähes 100 %. Ihopernarutto sen sijaan saadaan lähes aina parannettua, koska se on helppo diagnosoida ihovaurioiden perusteella ja hoito saadaan aloitettua riittävän aikaisessa vaiheessa. Hoitamattomana kuitenkin myös ihopernarutossa kuolleisuus on 20 %. (Murray ym., 2002, s.242.)

Pernarutto diagnosoidaan tavallisesti mikroskooppisen analyysin (bakteerivärjäys), mikrobiologisten viljelymenetelmien tai geenimonistuksen (PCR) avulla. Lisäksi on kehitetty erilaisia vasta-aineisiin perustuvia bakteerintunnistusmenetelmiä, mutta ne

ovat vielä toistaiseksi vain harvoin kliinisessä käytössä. Yleensä taudin diagnosointiin kuluu aikaa noin kaksi vuorokautta. (Murray ym., 2002, s.242; Eskola ym., 2000; Huovinen, 2003.)

Pernaruttoa voidaan hoitaa perinteisten antibioottien avulla (esimerkiksi siprofloksasiinilla), mutta hoito on aloitettava mahdollisimman pian tartunnan saamisen jälkeen (jo ennen ensimmäisten oireiden ilmenemistä), jotta se tehoaisi. Pernaruttoa vastaan on olemassa myös rokote, jota voidaan antaa esimerkiksi sairaita eläimiä mahdollisesti käsitteleville ihmisille. Rokote on kuitenkin varsin epäpuhdas ja aiheuttaa paljon sivuoireita. Tästä johtuen rokote ei ole laajamittaisessa käytössä muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta (esimerkiksi USA:n sotilaiden rokotusohjelmat). (Eskola ym., 2000; Greenfield & Bronze, 2003.)

2.2.1.2. Rakenne ja toiminta

Bacillus anthracis -bakteeri on suurikokoinen, sauvamainen bakteeri. Bakteeri on 3–8 µm pitkä ja 1–1,5 µm leveä. *B.a.*-bakteeri voi muodostaa itiöitä, mikäli ympäristö ei ole suotuisa sen kasvulle ja lisääntymiselle. Nämä bakteerin varastomuodot kestävät erittäin hyvin erilaisia ympäristöstä aiheutuvia haittatekijöitä kuten lämpöä, kuivuutta, ultravioletti- ja gammasäteilyä sekä erilaisia desinfiointiaineita. Itiöt voivat säilyä esimerkiksi maaperässä elinkykyisinä kymmeniä vuosia. (Murray ym., 2002, s.240; Prescott ym., 2002, s.913–914.)

Itiöt muodostuvat vegetatiivisen bakteerin sisällä (sisäitiö, endospori) ja vapautuvat sieltä ympäristöön, kun emosolu hajoaa. Ympäristöön vapautuneita sisäitiöitä kutsutaan itiöiksi. Itiöt koostuvat viidestä kerroksesta. Uloin kerros, *eksosporium* (itiönverho), on ohut suojakerros, jonka alla on useista proteiinikerroksista koostunut paksumpi kerros, itiön kuori (proteiinikuori). Kuoren proteiinien ansiosta itiö kestää erinomaisen hyvin kemikaaleja. Seuraava kerros, korteksi, rakentuu peptidoglykaanista ja voi olla kooltaan jopa puolet koko itiön koosta. Korteksin sisäpuolella on itiön soluseinä (sisempi itiön kuori), joka ympäröi itiön ydintä (*core*). Itiön ytimessä ovat kaikki normaalit bakteeri-solun soluelimet, mutta siellä ei ole metabolista aktiivisuutta. (Prescott ym., 2002, s.68–71; Salkinoja-Salonen, 2002, s.147–153; Liu ym., 2004.) *Bacillus anthracis* -itiöillä on muutamia ominaispiirteitä, joita ei esiinny muissa itiöissä ja jotka tekevät *B.a.*-itiöistä erittäin tehokkaan taudinaiheuttajan. *B.a.*-itiöt kestävät erikoisen hyvin ympäristössä tapahtuvia muutoksia, aistivat isäntäeliön ja alkavat germinoitua siinä, kestävät hyvin

isäntäeliön immuunipuolustusta sekä ilmentävät jo infektion aikaisessa vaiheessa virulenssia aiheuttavia tekijöitä (Liu ym., 2004).

Kun *B.a.*-itiöt muuttuvat elimistöön päästyään vegetatiivisiksi bakteereiksi ja lisääntyvät, ne myös alkavat tuottaa toksiineja, jotka saavat aikaan bakteerin infektiovaikutuksen (pernaruton). *B.a.*:n infektiovaikutus johtuu kahdesta eri toksiinista, edeematoksiinista sekä letaalitoksiinista, jotka toimivat toisistaan riippumatta (Beall ym., 1961). Lisäksi infektoimiseen osallistuu solun uloin osa, kapseli, joka estää jakautuvien bakteerisolujen fagosytoosia (Makino ym., 1989). Edeematoksiini toimii adenylaattisyklaasina (Leppla, 1982), ja letaalitoksiini aiheuttaa makrofagien hajoamista, minkä seurauksena elimistöön vapautuu tulehdustekijöitä (Hanna ym., 1992; Hanna, 1999).

Letaalitoksiini ja edeematoksiini ovat proteiineja, jotka muodostuvat kahdesta eri eksotoksiinista. Letaalitoksiinin komponentteja ovat suojaava antigeeni sekä letaalitekijä. Edeematoksiini taas koostuu suojaavasta antigeenistä sekä edeematekijästä. Ennen toksiinien muodostumista suojaava antigeeni kiinnittyy infektoitavan solun pinnalla oleviin reseptoreihin. Tämä käynnistää toksiinien muodostumiseen ja viimein myrkytystilaan johtavan reaktioketjun. Suojaava antigeeni on kooltaan 83 kDa, mutta kun se on sitoutunut kohdesoluun, siitä katkeaa proteolyyttisesti 20 kDa:n kokoinen osa, joka yhdistyy 89 kDa:n kokoiseen edeematekijään tai 90 kDa:n kokoiseen letaalitekijään. (Leppla, 2000.)

Varsinainen infektio käynnistyy, kun suojaava antigeeni on kiinnittynyt kohdesolun pintaan. Ensiksi muodostuu edeematoksiini, kun suojaavasta antigeenistä katkennut osa kiinnittyy edeematekijään, ja se tunkeutuu kohdesolun sisään. Edeematoksiinin adenylaattisyklaasiominaisuus aktivoituu solun sisällä, minkä seurauksena solujen sisään kertyy nestettä (Leppla, 1982). Kun suojaava antigeeni kiinnittyy letaalitekijään, muodostuu letaalitoksiini. Letaalitoksiini on sinkkiä sisältävä metalloproteaasi, jonka toiminnan seurauksena makrofagit hajoavat ja siten vapauttavat elimistöön tuumori-nekroositekijä-α:aa, interleukiini-1β:aa sekä muita tulehdusta edistäviä sytokiineja (Hanna, 1992). (Moayeri & Leppla, 2004.) Tulehdusreaktion etenemistä edesauttaa *B.a.*-bakteeria ympäröivä kapselirakenne, joka koostuu poly-D-glutamiinihaposta. Kapselin rakenne estää elimistön puolustusjärjestelmää tuhoamasta bakteereja mahdollistaen näin terveiden solujen infektoitumisen. (Makino ym., 1989.)

Toksiineja ja kapselia koodaavat geenit sijaitsevat kahdessa eri plasmidissa. Kapseli muodostuu kolmen geenin vaikutuksesta. Nämä geenit ovat *capA, capB* ja *capC* (Makino ym., 1989), ja ne sijaitsevat plasmidissa pXO2. Toisessa plasmidissa, pXO1, sijaitsevat toksiineja koodaavat alueet. (Dixon ym., 1999.) Bakteerin pitää sisältää molemmat plasmidit eli kyetä tuottamaan sekä bakteeria suojaava kapseli että myrkytyksen aiheuttavat toksiinit, jotta bakteeri olisi virulentti. Mikäli toinen plasmideista puuttuu, muodostuu heikentynyt bakteerikanta, jota voidaan käyttää muun muassa tutkimustarkoituksiin tai rokotteena. Esimerkiksi heikennetty kanta, josta puuttuu plasmidi pXO2, pystyy tuottamaan toksiinikomponentteja, mutta ei bakteeria suojaavaa kapselia. (Leppla, 2000.)

2.2.1.3. Bacillus anthracis *taisteluaineena*

Bacillus anthracis -bakteerin itiöitä pidetään nykyisin yhtenä todennäköisimmistä biologisista taisteluaineista (Greenfield ym., 2003). Tämä johtuu siitä, että kenen tahansa on teoreettisesti mahdollista hankkia ja kasvattaa maaperässä esiintyviä *B.a.*-itiöitä ja näin aiheuttaa suurta tuhoa (Huovinen, 2003). On arvioitu, että 50 kg *B.a.*-itiöitä levitettynä tasaisesti 500 000 ihmisen asutusalueelle aiheuttaisi ainakin 95 000 kuolemantapausta, sekä lisäksi 125 000 ihmistä sairastuisi. *Bacillus anthracis* -itiöiden vaarallisuutta taisteluaineena lisää se, että niitä voidaan levittää huomaamatta, jolloin havainto taisteluaineen käytöstä saadaan vasta ihmisillä ilmenevien oireiden myötä. (Pile ym., 1998.)

Bacillus anthracis -bakteereita voi helposti kasvattaa tavallisessa mikrobiologisessa laboratoriossa. Myös bakteerien saattaminen itiömuotoon on melko yksinkertaista ja onnistuu normaalilla mikrobiologisen laboratorion välineistöllä. Jotta *B.a.*-itiöitä voitaisiin käyttää taisteluaineena, pitää itiöt kuitenkin saattaa helposti levitettävään muotoon, esimerkiksi aerosoliksi tai pulveriksi. Tehokkain levitystapa olisi aerosoli, mutta aerosolin hiukkaskoon tulisi olla alle 5 µm, jotta hiukkaset olisivat riittävän pieniä mennäkseen keuhkorakkuloihin ja siten aiheuttaisivat sairauden. Itiöt eivät myöskään saisi levityksen yhteydessä tarrautua toisiinsa, jotta pieni hiukkaskoko säilyisi. Nämä seikat tekevät *B.a.*-aerosolin valmistamisesta erityisen haastavaa ja vaikeuttavat agenssin käyttöä taisteluaineena. (Huovinen, 2003; Inglesby ym., 2002.)

Mikäli löytyy riittävästi asiantuntemusta, on kuitenkin mahdollista saattaa *B.a.*-itiöt muotoon, jossa niitä voitaisiin käyttää taisteluaineena. Ei siis ole lainkaan mahdotonta,

että tällaista taisteluainetta käytettäisiin esimerkiksi terrori-iskun yhteydessä. Tästä todisteena on vuoden 2001 tapaus, jossa pernaruttokirjeet aiheuttivat USA:ssa ihon kautta ja hengitysteitse tarttunutta pernaruttoa. *Bacillus anthracis* -itiöitä levitettiin tuolloin kirjeiden avulla hienojakoisena jauheena, joka ilmaan vapauduttuaan käyttäytyy kuten bioaerosoli. Tällöin noin 20 henkilöä sairastui, ja hengitysteitse tartunnan saaneista kaikki, joilla tautia ei diagnosoitu riittävän aikaisessa vaiheessa ja joiden hoitoa ei aloitettu ajoissa (viisi henkilöä), kuolivat saamaansa infektioon (Jernigan ym., 2001). (Inglesby ym., 2002; Matsumoto, 2003.)

2.2.2. Botuliinitoksiini

Botuliinitoksiini on erittäin vaarallinen hermomyrkky, jota tuottaa *Clostridium botulinum* -bakteeri. Botuliinitoksiini on voimakkain luonnossa esiintyvä myrkky, eli se on erittäin tappava jo pieninä annoksina. Jopa 0,05–1,0 µg botuliinitoksiinia on tappava annos ihmiselle. (Gill, 1982; Cherington, 1997.) Altistuminen tappavaa annosta pienemmälle määrälle botuliinitoksiinia aiheuttaa sairaustilan, jota kutsutaan botulismiksi. (Arnon ym., 2001.)

Botuliinitoksiinia tuottavan bakteerin *botulinum*-nimi tulee latinankielisestä sanasta *botulus*, joka tarkoittaa makkaraa. Tämä viittaa bakteerin (ja toksiinin) esiintymiseen pilaantuneessa ruuassa, erityisesti lihavalmisteissa. (Murray ym., 2002, s.347; Bigalke & Shoer, 2000.)

2.2.2.1. Botulismi

Botulismi luokitellaan yleensä ruokamyrkytykseksi, koska tartunta saadaan lähes aina pilaantuneen ruuan välityksellä (esimerkiksi huonosti kuumennetuista itse tehdyistä säilykkeistä). Botulismissa tautia aiheuttavan *Clostridium botulinum* -bakteerin itiöitä kulkeutuu ihmisen elimistöön, missä ne muuttuvat vegetatiivisiksi bakteerisoluiksi ja alkavat jakautua. Vegetatiivisen kasvun aikana bakteerit tuottavat botuliinitoksiinia, joka saa aikaan myrkytyksen. (Prescott ym., 2002, s. 929.)

Botulismia esiintyy ihmisellä kolmea eri muotoa: klassista (elintarvikeperäistä) botulismia, haavabotulismia sekä pikkulasten botulismia. Botulismin myrkytystila aiheutuu siitä, kun botuliinitoksiinia joutuu ihmisen verenkiertoon. Toksiini voi absorboitua elimistöön joko suolen tai keuhkojen pintakudoksen kautta tai ihossa

olevasta haavasta, mutta ehjän ihon läpi toksiini ei imeydy. (Cherington, 1998; Murray ym., 2002, s. 347.)

Elintarvikeperäisen botulismin oireet ilmenevät noin 1–2 päivän kuluttua tartunnan saamisesta. Yleensä botulismiin sairastuneilla ihmisillä ilmenee ensin huonovointisuutta ja huimausta. Tämän jälkeen voidaan havaita muun muassa näköoireita, suun kuivuutta sekä vatsakipua. Mikäli sairautta ei hoideta, lihaksiston toiminta alkaa vähitellen heikentyä, ja lopulta potilas kuolee yleensä hengityksen lamaantumiseen, kun sairaus etenee pitkälle. Kuolleisuus tautiin on noin 10 %. (Cherington, 1998; Murray ym., 2002, s. 348.)

Haavabotulismi muistuttaa kaikin puolin hyvin paljon elintarvikeperäistä botulismia, mutta siinä taudin inkubaatioaika on pidempi, noin neljä vuorokautta. Pikkulasten botulismi sen sijaan poikkeaa hieman muista taudin muodoista. Pikkulasten botulismi puhkeaa, kun *C. botulinum* -bakteerit alkavat lisääntyä lapsen suolistossa. Aikuisilla tämä ei ole mahdollista, koska suolistossa on paljon muita, kilpailevia mikrobeja. Tautia esiintyy lähinnä alle 1-vuotiailla lapsilla, ja sen oireet ovat varsin vaihtelevia ja vaikeasti havaittavia (esimerkiksi heikentynyt itku tai ummetus). Tästä johtuen lasten botulismi jää usein havaitsematta, mutta kuolleisuus tautiin on silti vain 2 %. (Cherington, 1998; Murray ym., 2002, s. 348.)

Botulismi voidaan diagnosoida oireiden perusteella, mutta myös laboratoriotestit ovat mahdollisia. Yleensä diagnoosi varmistetaan tekemällä bakteeriviljelmä potilaan ulosteesta. (Cherington, 1998.) Ehdoton varmuus botulismista saadaan ainoastaan hiiriletaalikokeen avulla. Hiiriletaalikoe on herkkä ja toimiva botuliinitoksiinin osoitusmenetelmä, mutta se on erittäin työläs ja hidas, sillä sen tekemiseen menee neljä vuorokautta. Lisäksi menetelmä vaatii koe-eläinten käyttöä. (Centers for Disease Control and Prevention, 1998.) Uusia menetelmiä botuliinitoksiinin varmaa osoittamista varten pyritään kehittämään koko ajan, jotta hiiriletaalikoe voitaisiin korvata *in vitro* -menetelmillä. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi immunoanalyyttiset menetelmät, kuten immunokromatografiset pikatestit. (Klewitz ym., 2005.)

Botulismia hoidetaan antitoksiinien avulla, ja hoito on yleensä varsin tehokasta, mikäli se pystytään aloittamaan riittävän aikaisessa vaiheessa. Myös rokotetta botulismia vastaan on kehitetty, mutta se on edelleen kehitysvaiheessa. (Eskola ym., 2000.)

2.2.2.2. Botuliinitoksiinin rakenne ja toiminta

Botuliinitoksiinia tuottava bakteeri, *Clostridium botulinum*, on itiöitä muodostava, gram-positiivinen, anaerobinen bakteeri, jota esiintyy normaalisti maaperässä. *C. botulinum* -bakteerit jakautuvat neljään geneettisesti täysin erilaiseen ryhmään, jotka katsotaan yhdeksi lajiksi ainoastaan siksi, että ne kaikki tuottavat samaa toksiinia. *C. botulinum* kuuluu samaan bakteerisukuun kuin jäykkäkouristuksen aiheuttava *C. tetani* -bakteeri, mistä johtuen myös niiden tuottamat toksiinit muistuttavat ulkoisesti toisiaan. Molemmat toksiinit myös vaikuttavat lihaksistoon estämällä hermojen normaalia toimintaa. (Murray ym., 2002, s. 345–347, Bigalke & Rummel, 2005.)

Botuliinitoksiini on 150–165 kDa:n kokoinen proteiini, joka koostuu kahdesta alayksiköstä. Toksiinin toiminnan kannalta tärkein alayksikkö (A-ketju, kevyt ketju), on proteiinin toksinen osa, ja se on kooltaan noin 50 kDa. A-alayksikkö on sinkkiä sisältävä endopeptidaasi, joka estää asetyylikoliinia sisältäviä vesikkeleitä liittymästä motoneuronin solukalvoon. Tämän prosessin seurauksena hermoimpulssi ei etene hermosolusta lihakseen, ja lihaksen toiminta lamautuu (halvaus). A-alayksikköön on liittyneenä toinen alayksikkö, B (raskas ketju, noin 100 kDa). B-alayksikön tehtävänä on ohjata toksiinimolekyyli solukalvon läpi solun sisään, jotta A-alayksikkö voi aloittaa entsymaattisen toimintansa. (Lacy, 1998; Bigalke & Shoer, 2000.)

Botuliinitoksiinia on olemassa seitsemää eri antigeenistä tyyppiä. Nämä seitsemän serotyyppiä on nimetty kirjaimilla A–G. Serotyypit ovat muuten varsin samankaltaisia keskenään, mutta ne erottuvat toisistaan sen mukaan, miten ne reagoivat antitoksiinien kanssa. Jokaisella antitoksiinilla nimittäin voi neutraloida ainoastaan yhtä toksiinin serotyyppiä, esimerkiksi anti-A-antitoksiini neutraloi ainoastaan A-serotyyppiä. (Arnon ym., 2001.) Serotyypeistä ainoastaan A, B, E ja F aiheuttavat ihmiselle botulismia (Murray ym., 2002, s.347; Bigalke & Rummel, 2005).

Botuliinitoksiinia käytetään nykyisin myös lääkeaineena sen tehokkaan hermosto-vaikutuksen vuoksi. Erittäin pieninä annoksina sitä voidaan käyttää esimerkiksi tahdottomien lihasnykäysten tai migreenin hoidossa. (Shantz & Johnson, 1992.)

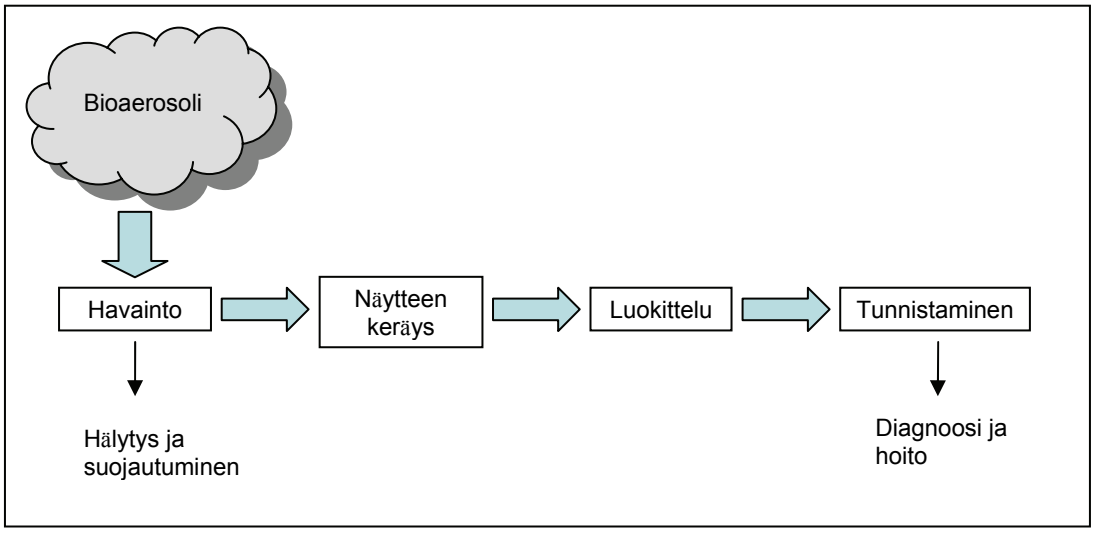
2.2.2.3. Botuliinitoksiinin käyttö taisteluaineena

Botuliinitoksiinin käyttöä taisteluaineen pidetään mahdollisena, koska toksiini on erittäin myrkyllinen ja sillä on mahdollista saada aikaan suurta tuhoa. Botuliinitoksiinia

on myös varsin helppo tuottaa, eikä sen kuljetus vaadi suuria resursseja, koska toksiinia tarvitaan suurenkin ihmisjoukon altistamiseen vain äärimmäisen pieni määrä. Yksi gramma kiteistä botuliinitoksiinia voisi tasaisesti levitettynä ja hengitettynä aiheuttaa kuoleman yli miljoonalle ihmiselle. Botuliinitoksiinin käyttöä taisteluaineena hankaloittaa kuitenkin sen levittämisen vaikeus. (Arnon ym., 2001.) Myös botuliinitoksiinin kohdalla tehokas levitystapa olisi aerosoli, mutta sen tuottamisessa on samoja ongelmia kuin *B.a.*-aerosolin tuotossa (ks. kappale 2.2.1.3.). (Bigalke & Rummel, 2005.)

2.3. Bioaerosolien havaitseminen ja tunnistus

Biologisten taisteluaineiden käytön havaitseminen mahdollisimman aikaisessa vaiheessa on erittäin tärkeää, jotta uhkaan voitaisiin reagoida riittävän nopeasti. Nykymenetelmillä bioaerosoleja ei voida tunnistaa reaaliajassa (kenttäolosuhteissa). Nykyisillä menetelmillä biologisten taisteluaineiden havaitseminen tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensin aerosoli havaitaan muutoksena ilman normaalissa partikkeli-jakaumassa. Mikäli kyseessä on bioaerosoli, kokojakaumassa on poikkeava pitoisuus kokoalueella 1–10 µm. Havainnon jälkeen aerosolista kerätään näyte ja se luokitellaan, eli varmistetaan, onko kyseessä biologinen agenssi. Tunnistuksen kolmannessa vaiheessa määritetään, mitä agenssia näyte sisältää. (Humppi, 2002.) Kaaviokuva bioaerosolien havaitsemisesta on kuvassa 2.1. Uusia, nopeampia ja spesifisempiä tunnistusmenetelmiä kehitetään koko ajan, jotta tunnistus voisi tapahtua ilman useita välivaiheita.



Kuva 2.1. Bioaerosolien havaiseminen ja tunnistus

2.3.1. Aerosolin havaitseminen ja alustava tunnistus

Aerosolilevitys voidaan havaita erilaisten hiukkaslaskureiden ja hiukkaskoko-analysaattoreiden avulla. Nämä laitteet eivät pysty tunnistamaan aerosolia, mutta havaitsevat muutokset ilman normaalissa hiukkasjakaumassa sekä erottavat bioaerosolin muista aerosoleista. (Mitchell, 1995.) Ensimmäisen havainnon perusteella voidaan antaa hälytys mahdollisesta uhasta ja suojautua ennen bioaerosolin tarkempaa tunnistamista.

Hiukkaskokoon perustuvien laitteiden lisäksi on olemassa useita laitteita, jotka on kehitetty erityisesti bioaerosolien havaitsemiseksi. Tällaisia laitteita ovat muun muassa LIDAR-tekniikkaan (*Light Detection and Ranging*) perustuvat laitteet. LIDAR-laitteistot emittoivat lasersäteilyä ja mittaavat ilmassa olevista partikkeleista takaisin heijastuvan säteilyn. Lasersäteiden sironnan perusteella laite määrittää aerosoleille ominaisuuksia, joiden perusteella laitteisto voi erottaa biologisen materiaalin muista ilmassa olevista yhdisteistä. Yhä tarkempi tulos saadaan, kun LIDAR-laitteistoon yhdistetään ultraviolettivalon lähde, jolla viritetään biologisissa yhdisteissä olevat fluoresoivat aineet lähettämään fluoresenssia. Laitteisto mittaa myös fluoresenssin ja havaitsee näin biologisen materiaalin. LIDAR-laitteistot ovat käyttökelpoisia bioaerosolien alustavaan havaitsemiseen, mutta niiden avulla ei voida erottaa patogeenejä harmittomasta biologisesta materiaalista. (Frost & Sullivan, 2003.)

LIDAR-tekniikka on tarkoitettu aerosolien etämääritystä varten, mutta tämän lisäksi on olemassa myös usein käytettyjä laitteita, joilla määritys tapahtuu lyhyemmän välimatkan päästä. Tällaisia ovat esimerkiksi FLAPS-laitteistot (*Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer*). FLAPS-tekniikka on virtaussytometrian (ks. kappale 2.4.) kaltainen menetelmä, jossa ilmavirrassa oleviin yksittäisiin partikkeleihin kohdistetaan lasersäde. Lasersäde aktivoi elävässä biologisessa materiaalissa olevan autofluoresenssin, jonka perusteella elävä tai elinkykyinen materiaali voidaan erottaa elottomasta materiaalista. Lasersäteen avulla laite määrittää myös ilmavirrassa olevan partikkelin koon sekä partikkeleiden määrän. (Ho, 1996; Ho, 2002.)

Perinteisesti näytteen alustava tunnistaminen on tehty mikroskopoinnin avulla. Mikroskopoimalla voidaan erottaa eri bakteerityypit toisistaan sekä virukset bakteereista. Tämä on mahdollista muun muassa erilaisten bakteerien värjäysmenetelmien avulla. Mikroskooppianalyysin perusteella voidaan päättää, mitä jatkotutkimuksia näytteelle tehdään (esimerkiksi millä kasvatusalustalla näyte kannattaa

viljellä, ks. kappale 2.3.3). Mikroskopointi on kuitenkin varsin aikaa vievää ja vaatii melko kalliin välineistön, mikäli näyte halutaan analysoida tarkasti, sillä virukset on mahdollista havaita ainoastaan elektronimikroskoopilla. (Morse, 2000.)

2.3.2. Näytteenotto

Bioaerosolinäytteitä kerätään erilaisten aerosolinkeräinten avulla. Aerosolinkeräimiä on olemassa useita erilaisia, ja niiden toiminta perustuu eri tekniikoihin. Bioaerosolien keräämiseen käytettyjä aerosolinkeräimiä ovat esimerkiksi syklonikeräimet, impinger-keräimet ja impaktorit (Crook, 1995a) sekä suodatinkeräimet (Crook, 1995b).

Useat aerosolinkeräimet keräävät ilmassa olevat partikkelit kiinteälle alustalle, kuten petrimaljalle tai ohuelle levylle. Tällaisia keräimiä ovat esimerkiksi impaktorikeräimet. Niiden toiminta perustuu fysikaaliseen ilmiöön, jota kutsutaan partikkelien impaktioksi. Tällä ilmiöllä tarkoitetaan partikkelien taipumusta poiketa ilmavirrasta ja kiinnittyä kiinteälle pinnalle inertian vaikutuksesta. (Crook, 1995a; Li & Lin, 1999.)

Näiden lisäksi on olemassa aerosolinkeräimiä, jotka keräävät ilmassa olevat partikkelit nesteeseen. Esimerkkejä näistä keräimistä ovat impinger- ja syklonikeräimet. Syklonikeräimissä ilma imetään laitteeseen, jossa pyörii spiraalimainen nestepatsas. Tällöin ilmassa olevat partikkelit sekoittuvat nesteeseen. (Crook, 1995a.) Syklonikeräimiä on tällä hetkellä kaupallisesti saatavilla useilta eri valmistajilta. Esimerkki kaupallisesta tuotteesta on SASS 2000 -märkäsyklonikeräin (Research International Inc., Washington, USA), joka kerää ilmaa 265 litraa minuutissa (SASS 2000, Instruction Manual).

Bioaerosolien keräämisessä on varmistettava, että näyte ei vaurioidu keräyksen aikana. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kun näytettä jatkokäsitellään esimerkiksi mikrobiologisesti viljelemällä. Märkäsyklonikeräin soveltuu tältä kannalta erittäin hyvin bioaerosolien keräämiseen, sillä näyte kerätään suoraan nesteeseen, jolloin mikrobit säilyvät elinkykyisinä. Näyte ei keräyksen aikana myöskään joudu suuren rasituksen kohteeksi, eivätkä siinä olevat partikkelit tuhoudu. Lisäksi näytteen loppukäsittely helpottuu, kun näyte on valmiiksi nestemäisessä muodossa eikä vaadi erityistä liuottamista. (Crook, 1995a.)

2.3.3. Bioaerosolien tunnistaminen

Bioaerosolit tunnistetaan kerätyistä näytteistä erilaisilla biologisilla menetelmillä. Näillä menetelmillä bioaerosolin koostumuksesta saadaan varma tieto, jotta altistuneiden henkilöiden diagnoosi voidaan varmistaa ja heille voidaan järjestää asianmukainen hoito. Yleensä bioaerosolien tunnistamiseen käytetään menetelmiä, jotka perustuvat immunokemiaan tai molekyylibiologiaan. Myös perinteiset mikrobiologiset menetelmät sekä mikroskopia ovat edelleen yleisesti käytössä. Muut käytössä olevat tunnistus-menetelmät perustuvat fysikaalisiin tai kemiallisiin ilmiöihin, ja määrittämisen apuna käytetään esimerkiksi kromatografiaa tai spektrometriaa. (Morse, 2000; Humppi, 2002.)

2.3.3.1. Mikrobiologiset menetelmät

Perinteinen mikrobiologinen bakteeriviljely on herkin tapa tunnistaa eläviä bakteereita. Kasvatusmaljalle voi muodostua tunnistuksen mahdollistava bakteeripopulaatio jopa yhdestä ainoasta bakteerista, kun taas muita menetelmiä käytettäessä alkuperäisessä näytteessä pitää olla lukuisia bakteereita, jotta tunnistus onnistuisi. (Henchal ym., 2001.)

Bioaerosolien tunnistamiseen käytettävät mikrobiologiset menetelmät vaihtelevat sen mukaan, onko näytteenä bakteereja vai viruksia (alustava tunnistus tehty esimerkiksi mikroskopoimalla, ks. 2.3.1). Bakteereja kasvatetaan alustalla, joka sisältää erilaisia bakteerien kasvuun vaikuttavia aineita (esimerkiksi ravintoaineita). Varsinainen tunnistus tehdään sen perusteella, miten bakteeri käyttää alustassa olevia ravintoaineita. Viruksia taas kasvatetaan erilaisilla soluviljelmillä, koska ne pystyvät lisääntymään ainoastaan elävässä solussa. Virukset tunnistetaan niiden soluja tuhoavien vaikutusten perusteella. (Hensel & Pertzoldt, 1995; Prescott ym., 2002, s. 104–106 ja 364–365; Morse, 2000.)

Nykyään viljelymenetelmät ovat kuitenkin käytännössä jääneet taka-alalle bioaerosolien tunnistusmenetelmänä, koska ne ovat liian hitaita sekä vaikeita toteuttaa. Käytännössä siis tunnistus tapahtuu joko immunologisen, molekyylibiologisen tai kemiallisen analyysin perusteella. (Humppi, 2002.)

2.3.3.2. Molekyylibiologiset menetelmät

Varmin tunnistustulos biologisista näytteistä saadaan molekyylibiologisilla menetelmillä, mikäli tunnistettava agenssi sisältää DNA:ta tai RNA:ta. Molekyylibiologiset tunnistusmenetelmät eivät siis sovellu toksiinien tunnistamiseen,

koska toksiinit koostuvat proteiinista, mutta muiden biologisten taisteluaineiden tunnistaminen on mahdollista näillä menetelmillä. Toksiinienkin tunnistaminen onnistuu kuitenkin toksiinin tuottajaeliön geeneistä, joista voi olla jäämiä taisteluaineena käytettävässä toksiinivalmisteessa. Molekyylibiologiset menetelmät perustuvat yleensä PCR:n avulla tapahtuvaan geenien monistukseen sekä erilaisiin geneettisen materiaalin analysointimenetelmiin. Tällöin tunnistus onnistuu pienistäkin näytemääristä sekä näytteistä, jotka sisältävät kuolleita mikrobeja tai ainoastaan mikrobien osia. Lisäksi geenimonistuksen avulla on mahdollista tunnistaa myös geneettisesti muokattuja agensseja, mikä ei muilla menetelmillä ole mahdollista. Geenien monistukseen perustuvia tunnistusmenetelmiä onkin olemassa useille eri taisteluaineagensseille, ja nämä menetelmät ovat yleensä erittäin herkkiä ja spesifisiä. (Hensel & Pertzoldt, 1995; Henchal ym., 2001.)

Molekyylibiologinen tunnistusmenetelmä voidaan teoriassa kehittää mitä tahansa elävää alkuperää olevaa agenssia varten. Tunnistusmenetelmän kehittäminen vaatii ainoastaan sen, että ensin on selvitetty organismin perimästä sille ominaiset yksilölliset geeni-sekvenssit, joihin tunnistus voi perustua. Nukleiinihappotunnistukseen perustuvat menetelmät voidaan jakaa kahteen ryhmään menetelmän toimintaperiaatteen mukaan: menetelmiin, joissa koetin hybridisoituu suoraan kohdesekvenssin kanssa ja tunnistus-signaalia vahvistetaan sekä menetelmiin, joissa tunnistuksen kohdesekvenssiä monistetaan. (Iqbal ym., 2000.)

Tunnistussignaalin vahvistamiseen perustuvissa menetelmissä tunnistus ei onnistu aivan pienestä määrästä tunnistettavaa materiaalia. Kohdesekvenssiä ei kuitenkaan täydy monistaa kuten PCR:ään perustuvissa menetelmissä, sillä riittävän voimakas signaali saadaan aikaan kontrolloimalla signaalin muodostumista. Koska tunnistettavan materiaalin määrä ei muutu tunnistuksen yhteydessä, tällaisilla menetelmillä voidaan tehdä myös kvantitatiivisia määrityksiä. Yleensä tunnistuksen yhteydessä joko koetin tai kohde kiinnitetään, jolloin ylimääräiset koettimet voidaan poistaa hybridisaation jälkeen, jotta ne eivät häiritse signaalin muodostumista. Yleinen tunnistusmetodi on niin sanottu *sandwich*-hybridisaatio, jossa käytetään kahta eri koetinta. Toinen koetin on kiinnitetty kiinteään alustaan ja toinen koetin on leimattu molekyylillä, joka saa aikaan tunnistussignaalin (signaalikoetin). (Polsky-Cynkin, 1985.) Signaalin muodostukseen voidaan käyttää esimerkiksi radioisotooppeja, fluoroforeja, entsyymejä tai hapteeneja.

Tunnistussignaali muodostuu ja sitä vahvistetaan signaalimolekyylistä riippuen erilaisilla tekniikoilla. Tästä johtuen myös signaalin havaitsemiseen on olemassa useita erilaisia laitteita ja tekniikoita. (Iqbal ym., 2000.)

Yleisesti käytetty tekniikka tunnistussignaalin aikaansaamiseksi on entsymaattinen värireaktio. Tässä entsyymi, joka katalysoi jotakin väriä muodostavaa reaktiota, on liitetty signaalikoettimeen. Tällöin tunnistus voidaan havaita värin muodostuksesta. Havaitseminen tapahtuu yleensä spektrofotometrilla, jolla voidaan myös mitata värin voimakkuus. (Iqbal ym., 2000.) Käyttökelpoisia molekyylejä signaalin muodostuksessa ovat myös hapteenit. Hapteenit ovat pienikokoisia molekyylejä, jotka voidaan liittää suuriin proteiineihin immuunireaktion aikaansaamiseksi. Tämän immunisointikeinon avulla muodostuvat hapteenivasta-aineet tunnistavat hapteenin myös sen ollessa vapaana, mikä mahdollistaa hapteeni-vasta-ainekompleksin käytön tunnistussignaalin muodostuksessa, kun hapteenimolekyyli liitetään signaalikoettimeen. (Nelson & Cox, 2000.) Hapteenit eivät pienen kokonsa ansiosta häiritse tunnistusreaktiota, ja ne ovat myös varsin helppokäyttöisiä. Lisäksi vasta-aineiden käyttäminen lisää mahdollisuuksia vahvistaa signaalia. (Iqbal ym., 2000.) Paljon käytetty menetelmä signaalin muodostuksessa on myös avidiini-biotiini-teknologia. Siinä signaalikoetin on leimattu biotiinilla, johon kiinnittyy avidiini- tai streptavidiinimolekyyli. Avidiiniin taas on liitetty esimerkiksi entsyymi, joka saa aikaan tunnistussignaalin havaitsemisessa tarvittavan värireaktion. Biotiinin ja streptavidiinin välinen sidos on erittäin voimakas, voimakkain luonnossa esiintyvä proteiinin ja ligandin välinen sidos. Voimakas sitoutuminen vähentää virhemahdollisuuksia tunnistussignaalin muodostumisessa, mikä lisää tunnistusmenetelmän luotettavuutta. Lisäksi tunnistussignaali vahvistuu käytettäessä tätä menetelmää, koska avidiinimolekyylissä on neljä kiinnittymiskohtaa biotiinille. (Wilchek & Bayer, 1990 ja 1999)

Menetelmät, joissa kohdesekvenssiä monistetaan ennen varsinaista tunnistusta, ovat herkempiä kuin hybridisaatioon ja signaalin vahvistamiseen perustuvat menetelmät. Herkkyydestä johtuen nämä menetelmät ovat kuitenkin myös erittäin alttiita virheille, ja vääriä tuloksia tulee helposti, mikäli tutkittava näyte sisältää epäpuhtauksia. Tunnistus onnistuu kohdesekvenssiä monistamalla jo erittäin pienistä määristä tutkittavaa näytettä, mutta toisin kuin hybridisaatiomenetelmissä, kvantitatiivinen määritys ei ole mahdollista. Kohdesekvenssin monistamiseen perustuvissa menetelmissä tunnistuksen

havaitseminen perustuu samoihin tekniikoihin kuin signaalin vahvistamisessa. Näissä menetelmissä kohdesekvenssin tunnistava koetin voidaan kuitenkin leimata suoraan, esimerkiksi fluoresoivalla molekyylillä, koska signaalin vahvistaminen ei ole tarpeen. Perinteisin kohdesekvenssin monistusmenetelmä on PCR. PCR:ssä kohdesekvenssiä monistetaan tehokkaasti lämpötilan vaihteluiden ja entsymaattisten reaktioiden avulla. Useat käytössä olevat molekyylibiologiset tunnistusmenetelmät pohjautuvat PCR:ään. Mikäli muiden nukleiinihappotunnistukseen perustuvien tunnistusmenetelmien herkkyyttä halutaan lisätä, niihin voidaan yhdistää PCR-reaktio. (Iqbal ym., 2000; Lim ym., 2005.)

PCR-reaktion lisäksi on olemassa myös muita menetelmiä, joissa kohdesekvenssiä monistetaan. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi LCR (*Ligase chain reaction*) sekä NASBA (*Nucleic acid sequence based amplification*). LCR on toimintaperiaatteeltaan hyvin samanlainen kuin PCR, mutta sillä saatava tulos on tarkempi kuin PCR:llä. LCR:ssä käytetään kahta aluketta, jotta pystytään erottamaan myös ne sekvenssit, jotka eroavat toisistaan vain yhden emäsparin osalta. Tämä ei ole mahdollista perinteisellä PCR:lla. Myös NASBA on kehitetympi versio PCR:sta. Siinä reaktiot tapahtuvat tasaisessa lämpötilassa, jolloin ei tarvita lämpösyklilaitteita kuten PCR:ssä ja LCR:ssä. Tämä helpottaa menetelmän soveltamista esimerkiksi kenttäkäyttöön. (Iqbal ym., 2000.)

Molekyylibiologisten tunnistusmenetelmien pohjalta on kehitetty useita erilaisia automatisoituja tutkimuslaitteita. (Ivnitski ym., 2003.) Erityisesti kvantitatiiviseen PCR:ään perustuvat biologisten taisteluaineiden tunnistusmenetelmät ja -laitteet ovat osoittautuneet erittäin herkiksi ja tehokkaiksi. Tällaisia menetelmiä on kehitetty lukuisille mahdollisille taisteluaineagensseille, ja näillä menetelmillä tunnistustulos saadaan alle tunnissa, kun vanhemmilla PCR-menetelmillä aikaa menisi noin kuusi tuntia. Kvantitatiiviseen PCR:ään perustuvia tutkimuslaitteita biologisten agenssien tunnistukseen onkin saatavilla jo useilta eri valmistajilta. (Henchal ym., 2001; Jones ym., 2005; Lim ym., 2005.)

Tehokkuudestaan huolimatta, molekyylibiologisten tunnistusmenetelmien soveltamista käytäntöön haittaa se, että ne ovat yhä varsin kalliita, vaativat korkeasti koulutettua henkilökuntaa sekä ovat työläitä ja hankalia toteuttaa kenttäolosuhteissa. Lisäksi nykyisin käytetyt molekyylibiologiset menetelmät ovat taisteluaineiden tunnistamiseksi liian aikaa vieviä, koska tuloksen saamiseen menee yleensä tunteja. Aikaa kuluu siihen,

että näytteet täytyy yleensä puhdistaa ennen analysointia. Tästä johtuen nämä menetelmät eivät tällaisena sovellu kenttäkäyttöön, mutta koska niiden varmuus ja tarkkuus on erinomainen muihin menetelmiin verrattuna, niitä kannattaa kehittää. Automatisoiduilla tutkimuslaitteilla on onnistuttu parantamaan menetelmien ominaisuuksia ja tekemään niistä nopeampia ja helppokäyttöisempiä. (Henchal ym., 2001; Peruski & Peruski, 2003b, Jones ym., 2005.)

2.3.3.3. Immunologiset menetelmät

Immunologiset eli vasta-ainetunnistukseen perustuvat tunnistusmenetelmät ovat molekyylibiologisten menetelmien ohella käytetyimpiä menetelmiä biologisten taisteluaineiden tunnistuksessa. Immunologisia tunnistusmenetelmiä on kehitetty lähes kaikille biologiseksi taisteluaineeksi soveltuville agensseille. Immunologisilla menetelmillä tunnistus on varsin tehokasta sekä spesifistä, mutta ongelmana on se, että osa menetelmistä on varsin työläitä, ja niiden toteutus vaatii laboratorio-olosuhteet. Lisäksi vasta-aineiden tuottamisen hitaus ja kalleus vaikeuttaa menetelmien käyttöä. (Morse, 2000; Peruski & Peruski, 2003a.)

Immunologisten tunnistusmenetelmien perustana on vasta-aineen ja antigeenin välinen tunnistusreaktio. Vasta-aineet kiinnittyvät spesifisesti ja tiukasti antigeeniin, jota vastaan ne on tuotettu. Antigeeninä voi olla mikä tahansa patogeeni tai molekyyli (esimerkiksi proteiini, bakteerin soluseinä tai virus), joka aiheuttaa immuunivasteen eliössä. Vasta-aineita tuotetaan immunisoimalla jokin eliö (koe-eläin) halutulla antigeenillä, jolloin eläimen elimistö alkaa tuottaa tarvittavaa vasta-ainetta. Vasta-aine voidaan eristää tutkimuskäyttöä varten immunisoidun eläimen veren seerumista. Näin tuotetut vasta-aineet ovat polyklonaalisia, eli tunnistavat antigeenistä useita eri epitooppeja. Vasta-aineita, jotka tunnistavat ainoastaan yhden tietyn epitoopin (monoklonaaliset vasta-aineet), voidaan tuottaa eristämällä lymfosyyttejä immunisoidusta eläimestä ja jatkamalla vasta-aineen tuotantoa soluviljelymenetelmillä. (Nelson & Cox, 2000; Boenisch, 2001.)

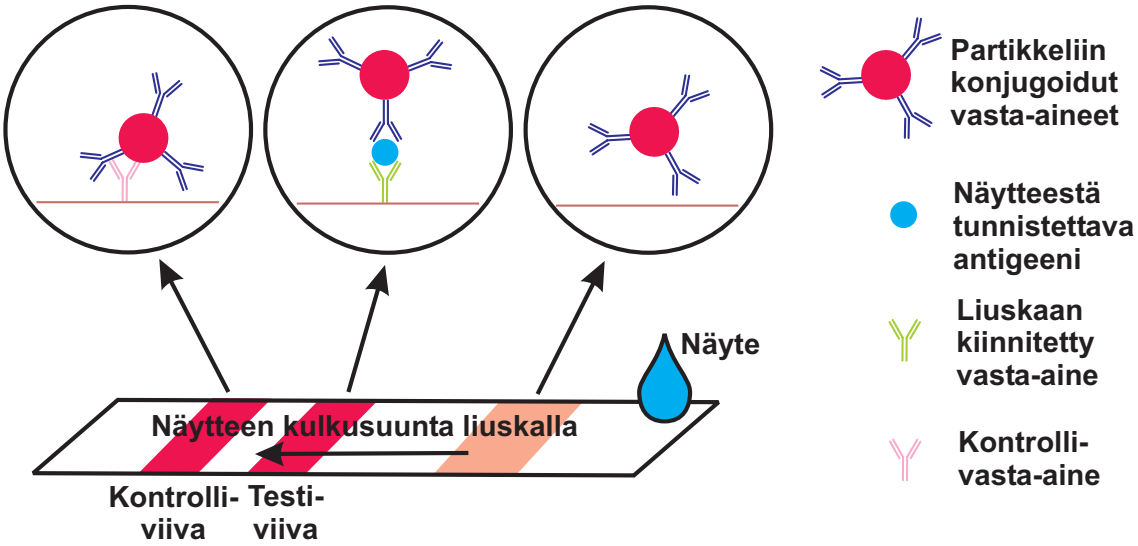
Tärkein komponentti immunologisessa tunnistusmenetelmässä on luonnollisesti siinä käytettävä vasta-aine. Perinteisesti käytetyimpiä ovat olleet polyklonaaliset vasta-aineet, koska niitä on ollut helpommin saatavilla, mutta tekniikan kehittyessä monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö on lisääntynyt merkittävästi. Lisäksi molekyylibiologisten menetelmien avulla on viime aikoina kehitetty uusia rekombinanttivasta-aineita, joiden

odotetaan korvaavan ainakin osittain perinteisiä vasta-aineita. Rekombinanttivasta-aineiden etuna on, että niiden tuottamiseen ei tarvita koe-eläimiä toisin kuin perinteisten vasta-aineiden tuottamiseen. Lisäksi rekombinanttivasta-aineiden avulla voidaan mahdollisesti parantaa merkittävästi immunologisten tunnistusmenetelmien herkkyyttä ja spesifisyyttä (Emanuel ym., 2000; Peruski & Peruski, 2003a.)

Erilaisia immunologisia tunnistusmenetelmiä on olemassa lukuisia, ja erilaisiin tekniikoihin perustuvia menetelmiä kehitetään koko ajan lisää. Tällä hetkellä käytetyimpiä immunologisia menetelmiä biologisten taisteluaineiden tunnistuksessa ovat immunokromatografiset pikatestit, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), TRF (*time-resolved fluorescence assay*) sekä IMS-ECL (*immunomagnetic separation-electrochemiluminescence assay*). (Peruski & Peruski, 2003a.)

ELISA on yksi esimerkki yleisesti käytetystä immunologisesta tunnistusmenetelmästä. Siinä tunnistettavan näytteen proteiinit kiinnitetään kiinteälle pinnalle (esimerkiksi mikrotiitterilevylle), josta haluttu agenssi tunnistetaan vasta-aineiden avulla. Vasta-ainetunnistus tapahtuu yleensä kahdella eri vasta-aineella, joista ensimmäinen, primäärinen vasta-aine, tunnistaa agenssin ja toinen, sekundäärinen vasta-aine, kiinnittyy edelliseen vasta-aineeseen. Sekundääriseen vasta-aineeseen on liitetty entsyymi, joka saa aikaan värireaktion. Tunnistus havaitaan tämän värireaktion avulla. Muodostuneen värin voimakkuus mitataan, yleensä spektrofotometrin avulla. (Nelson & Cox, 2000.)

Myös immunokromatografisia pikatestejä käytetään paljon, koska ne ovat erittäin helppokäyttöisiä ja nopeita. Immunokromatografiset pikatestit ovat kertakäyttöisiä, kädessä pidettäviä testiliuskoja, joiden avulla voidaan tunnistaa jokin yksittäinen agenssi. Pikatesteissä vasta-aineet on liitetty ohuelle liuskalle, ja tunnistus havaitaan liuskalle muodostuvan värireaktion avulla. Immunokromatografisen pikatestin toimintaperiaate voi vaihdella, mutta yksi yleisimmistä testityypeistä on niin sanottu *sandwich*-malli (kuva 2.2).



Kuva 2.2. Immunokromatografinen pikatestiliuska

Kuvan 2.2 kaltaisella immunokromatografisella pikatestiliuskalla on kaksi eri vasta-ainetta, jotka molemmat tunnistavat halutun antigeenin. Toinen vasta-aineista on konjugoitu erilliseen partikkeliin (esimerkiksi kulta- tai lateksipartikkeliin) ja toinen on kiinnitetty liuskaan. Lisäksi liuskaan on kiinnitetty kontrollivasta-aine, joka tunnistaa partikkeliin konjugoidun vasta-aineen. Partikkeliin konjugoitu vasta-aine sijaitsee liuskan alkupäässä, kohdassa, johon liuoksessa oleva näyte pipetoidaan. Liuskalla olevat partikkelit kulkeutuvat näytteen mukana kapillaarisesti liuskaa pitkin. Toinen vasta-aine on kiinnitetty liuskan toiseen päähän. Tällöin siihen liuskan kohtaan, johon toiset vasta-aineet ovat kiinnittyneinä, muodostuu *sandwich*-komplekseja konjugaattipartikkelista, kahdesta vasta-aineesta sekä tunnistettavasta antigeenistä. Tällöin liuskalla näkyy kompleksien kerääntymisen vuoksi värireaktio, josta tunnistus voidaan havaita. Myös kontrollivasta-aineiden kohdassa näkyy samanlainen värireaktio, kun osa konjugaattipartikkeleista kiinnittyy niihin. Kontrolliviivan avulla varmistetaan liuskan toimivuus, eli havaitaan, että partikkelit ovat kulkeutuneet näytteen mukana. (Paek, 2000; Peruski & Peruski, 2003a.)

Immunokromatografiset pikatestiliuskat ovat erittäin helppokäyttöisiä, ja lisäksi niillä saadaan tulos selville nopeasti toisin kuin monilla muilla tunnistusmenetelmillä. Pikatestiliuskat eivät kuitenkaan ole aivan yhtä herkkiä ja spesifisiä kuin muut menetelmät. Pikatestien käyttämistä biologisten taisteluaineiden tunnistamisessa hankaloittaa myös se, että jokaiselle mahdolliselle taisteluaineagenssille pitää olla oma testi. (Peruski & Peruski, 2003a.) Lisäksi pikatestejä voidaan käyttää vain alustavaan tunnistukseen.

Pikatestejä ei nimittäin ole hyväksytty diagnostiseen käyttöön (taisteluaineiden tunnistuksessa), koska niiden herkkyys ja spesifisyys on hieman liian huono varmaa tunnistamista varten. (Henchal ym., 2001.) Yksi ongelma pikatestiliuskojen käytössä on myös testituloksen luotettavuus, koska se perustuu aistinvaraiseen havaintoon. Tällöin eri henkilöt voivat saada testistä erilaisen tuloksen. Tästä johtuen pikatestien tulkitsemista varten on kehitetty myös erilaisia lukijalaitteita, jotka helpottavat testituloksen analysointia. (Andreotti ym., 2003.)

Perinteisten immunologisten menetelmien käyttöä bioaseagenssien tunnistuksessa on viime aikoina pyritty korvaamaan muilla menetelmillä, johtuen lähinnä olemassa olevien menetelmien hitaudesta. Vanhoihin laboratoriomenetelmiin pohjautuen on esimerkiksi kehitetty useita erilaisia laitteita, joissa immunologinen tunnistus on automatisoitu. Tämä helpottaa ja nopeuttaa analyysin tekemistä. (Lim ym., 2005.)

Immunologisissa tunnistusmenetelmissä voidaan käyttää myös muita koettimia, jotka kiinnittyvät vasta-aineiden tavoin spesifisesti tunnistettavaan agenssiin. Tällaiset vasta-ainetta jäljittelevät molekyylit, kuten peptidiligandit (esim. Williams ym., 2003) sekä aptameerit (ks.2.4.2.1.; Jayasena, 1999), ovat yhä suuremman mielenkiinnon kohteena kehitettäessä uusia tunnistusmenetelmiä. (Andreotti ym., 2003.)

2.3.3.4. Muut menetelmät

Biologisten taisteluaineiden tunnistamisessa käytetään myös useita fysikaalisia ja kemiallisia tutkimusmenetelmiä. Luonnossa oleva muu biologinen materiaali (esimerkiksi siitepöly) kuitenkin häiritsee monia kemiallisia ja fysikaalisia analyysejä, mistä johtuen varma tunnistustulos on näillä menetelmillä vaikeampi saavuttaa kuin muilla menetelmillä. Bioaerosolien tunnistamiseen käytettyjä kemiallisia menetelmiä ovat esimerkiksi kemotaksonominen määritys, rasvahappokoostumuksen määritys sekä näytteen pyrolysointi ja pyrolyysituotteiden analysointi. Fysikaalisista menetelmistä käytetään muun muassa neste- ja kaasukromatografiaa sekä massaspektrometriaa. (Spurny, 1995; Humppi, 2002; Lim ym., 2005.)

Tunnistamisen helpottamiseksi on kehitetty myös useita erilaisia integroituja järjestelmiä. Esimerkki menetelmästä, jossa on yhdistetty useita tekniikoita, on FLISA. FLISA on ELISA:n kaltainen immunologinen tunnistusmenetelmä, mutta sen avulla tunnistetaan proteiinien sijasta PCR-tuotteita. Menetelmä on varsin tehokas, ja sillä

voidaan tunnistaa useita eri PCR-tuotteita samanaikaisesti. FLISA on kaupallinen tuote, ja sitä valmistaa Applied Biosystems (Foster City, USA). (Ivnitski ym., 2003.)

Yksi tutkituimmista aiheista bioaerosolien tunnistuksessa on nykyisin molekyylibiologisten tunnistusmenetelmien saattaminen mikroskooppiseen kokoon. Tämä niin sanottu geenisiruteknologia mahdollistaisi patogeenien nopean ja tarkan tunnistamisen tuntemattomasta näytteestä, usean eri agenssin samanaikaisen tunnistamisen sekä menetelmän automatisoinnin. Useita geenisirutekniikkaan perustuvia biologisten agenssien tunnistamiseen soveltuvia laitteita on jo markkinoilla, esimerkiksi Caliper Technologiesin *Lab-Chip*-teknologia (Chow, 2002). Geenisiruteknologinen kehitystyö on kuitenkin vasta alussa, ja nykyisissä laitteissa on puutteita, mistä johtuen niitä ei vielä voida soveltaa kenttäkäyttöön. Alan kehitys vaikuttaa kuitenkin lupaavalta. (Ivnitski ym., 2003; Lim ym., 2005.)

Tulevaisuudessa pyritään kehittämään yhä parempia ja tehokkaampia menetelmiä ja laitteita biologisten taisteluaineiden havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi. Käyttötarkoitukseen parhaiten soveltuvan laitteen pitäisi olla nopea, tarkka ja luotettava, ja lisäksi sen pitäisi olla kenttäkäyttöön sopiva. Mikään nykyisin markkinoilla oleva laite ei täytä täydellisesti kaikkia näitä kriteerejä. Tämän lisäksi laitteiden kehitystyössä on useita muita haasteita, jotka ovat vielä ratkaisematta, kuten näytteiden vaihtelevat koostumukset sekä useiden agenssien yhtäaikainen tunnistus. (Lim ym., 2005.)

2.4. Virtaussytometria

Sytometria-sanalla tarkoitetaan solujen mittausta. Sytometri on solujen analysointiin tarkoitettu laite, jolla voidaan mitata joko solun fysikaalisia tai biokemiallisia ominaisuuksia. Sytometrilla mitattavia fysikaalisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi solun koko ja tilavuus, ja biokemiallisia taas esimerkiksi solun proteiini- tai DNA-pitoisuus. Virtaussytometriassa mittaukset tehdään yksittäisille soluille niiden kulkiessa nestevirrassa. Virtaussytometrian avulla saadaan yksityiskohtaista tietoa jokaisesta solusta erikseen eikä ainoastaan solupopulaatiosta, kuten monilla perinteisemmillä mikrobiologian ja biokemian tekniikoilla. (Carter & Meyer, 1990.)

2.4.1. Toimintaperiaate

Virtaussytometrin toiminta perustuu virtaavaan nesteeseen, jonka mukana tutkittavan näytteen solut (sekä muut partikkelit) kulkevat tasaisena juovana. Nesteen virtaus-

nopeus on suurempi kuin näytteen, mistä johtuen solut asettuvat tasaisesti nestevirran keskelle (hydrodynaaminen fokusointi). Tällöin solut kulkeutuvat nestevirrassa yksi kerrallaan pisteeseen, jossa mittaukset tehdään. Virtaussytometrin avulla voidaan tutkia mitä tahansa soluja (joko fiksoituna tai elävänä) tai muita partikkeleita, jotka ovat kooltaan 0,2–150 μm. (BD Biosciences, 2000.)

Solujen mittaukset tehdään virtaussytometrissa valonsäteen (yleensä laser) avulla. Solu-virta kulkee lasersäteen ohi, jolloin säteen osuessa soluun osa valosta siroaa. Sironnut valo ohjataan erilaisten optisten suodattimien ja linssien avulla laitteessa oleville detektoreille, jotka keräävät valon ja muuttavat sen sähköimpulsseiksi. Näin kerätty tieto voidaan tallettaa ja tarvittaessa siirtää tietokoneelle analysointia varten. Virtaus-sytometrin detektorit keräävät myös soluista emittoituvan fluoresenssin, joka on saatu aikaan esimerkiksi fluoresoivilla leima-aineilla ja aktivoitu lasersäteen avulla. (Carter & Meyer, 1990.)

Virtaussytometrin avulla voidaan määrittää useita solujen ominaisuuksia. Sironneen valon määrän perusteella voidaan päätellä muun muassa solun koko, muoto tai sen pinnan ominaisuuksia. Erilaisia leimoja taas voidaan käyttää esimerkiksi määritettäessä DNA:n tai jonkin tietyn proteiinin pitoisuutta soluissa tai eroteltaessa näytteen soluja toisistaan. Leima-aineita käyttämällä voidaan määrittää useita solun ominaisuuksia yhtäaikaisesti, sillä virtaussytometrin eri detektorit voivat mitata eri aallonpituutta olevia fluoresenssisignaaleja yhtä aikaa. (Carter & Meyer, 1990; BD Biosciences, 2000.)

Virtaussytometrilla kerätty tieto esitetään kuvaajana (yleensä histogrammi tai piste-parvikuvio) joko laitteen omalla näytöllä tai laitteeseen kytketyllä tietokoneella. Histogrammikuviossa y-akselin arvot ovat solujen lukumääriä. Solujen määrä esitetään kuvaajassa x-akselilla olevan parametrin (esimerkiksi fluoresenssin määrä tai partik-kelin koko) funktiona. Pisteparvikuvaajassa tarkasteltavia parametreja on kaksi, ja ne on esitetty x- ja y-akselilla. Nämä kaksi parametria voivat olla esimerkiksi solujen koko sekä fluoresenssin määrä tai kahden eri fluoresenssisignaalin voimakkuus. (Carter & Meyer, 1990; BD Biosciences, 2000.)

2.4.1.1. MICROCYTE® field -virtaussytometri

Microcyte-virtaussytometri (BioDetect AS, Oslo, Norja) on kenttäolosuhteisiin soveltuva kannettava virtaussytometri, joka on suunniteltu erityisesti mikrobiologisia mittauksia varten. Pienen koon ja keveyden ansiosta laitetta on helppo kuljettaa paikasta toiseen, ja sisään asennetun virtalähteen avulla sitä voidaan myös käyttää missä tahansa ilman verkkovirtaa. Microcyteä voidaan käyttää joko siihen kytketyn tietokoneen avulla tai laitteen etupaneelissa olevasta ohjaustaulusta, ja myös tulokset näkyvät sekä tietokoneelta että laitteen omalta näyttöruudulta. Microcyte soveltuu siis käyttöominaisuuksiensa takia hyvin kenttäkäyttöön. (Microcyte, User manual, 2003.)

Microcytellä voidaan analysoida näytteitä, joiden pitoisuus on 10^3–10^7 partikkelia/ml. Microcyten mittalaitteistoon kuuluu lasersäde, jonka valon aallonpituus on 635 nm sekä detektoreita, jotka vastaanottavat valoa aallonpituuksilla 650–800 nm. Microcytessä on ainoastaan yksi fluoresenssidetektori, mistä johtuen sillä voidaan havaita ainoastaan yksi fluoresenssisignaali kerrallaan. (Gjelsnes & Tangen, 1994.)

Microcyte on merkittävästi herkempi kuin perinteiset virtaussytometrit. Se tunnistaa ja laskee erityisen hyvin pieniä (0,4–15µm) partikkeleita, jolloin esimerkiksi bakteerit ovat hyvin tunnistettavissa näytteestä. Koska Microcyten optinen laitteisto on rakennettu kiinteän alumiinikuoren sisään, missä se on koko ajan tasaisissa olosuhteissa, sen optiikkaa ei tarvitse kalibroida päivittäin. Tämä helpottaa laitteen käyttöä ja tekee myös tuloksista tasaisempia ja vertailukelpoisempia. (Gjelsnes & Tangen, 1994.)

2.4.2. Virtaussytometrian käyttö

Virtaussytometriaa käytetään useissa biotieteissä, kuten immunologiassa, lääketieteessä ja patologiassa. Viime aikoina virtaussytometriasta on tullut yhä käytetympi menetelmä myös mikrobiologisissa tutkimuksissa. (Álvarez-Barrientos ym., 2000.)

Yksi tärkeimmistä virtaussytometrian sovelluskohteista on solujen erottelu. Virtaussytometrian avulla solut voidaan erottaa toisistaan sekä morfologian että toiminnallisten ominaisuuksien perusteella. Yksi merkittävä menetelmä tällä alueella on esimerkiksi fluoresenssiin perustuva solujen erottelu (FACS), jota käytetään yleisesti solubiologisissa tutkimuksissa. (BD Biosciences, 2000.)

Virtaussytometriaa käytetään usein myös geneettisissä tutkimuksissa, esimerkiksi kromosomien analysointiin ja erotteluun. Lisäksi virtaussytometriaa sovelletaan solu-

biologiassa esimerkiksi solun RNA:n tai DNA:n ominaisuuksien tutkimiseen erilaisten spesifisten nukleiinihappokoettimien avulla. (Ormerod, 1990.)

Nykyisin virtaussytometriaa käytetään varsin paljon myös mikrobiologisissa tutkimuksissa. Virtaussytometrian avulla monet mikrobiologiset tutkimukset voidaan tehdä nopeammin kuin perinteisillä mikrobiologisilla menetelmillä. Virtaussytometrilla voidaan esimerkiksi erottaa eri bakteerilajit toisistaan sekä muista näytteessä olevista partikkeleista, selvittää bakteerien elinkyky varsin nopeasti sekä tutkia bakteerin metaboliaa. Mikrobiologisilla viljelymenetelmillä (ja muilla perinteisillä menetelmillä) näiden määritysten tekemiseen menisi jopa useita päiviä. (Álvarez-Barrientos ym., 2000.)

Virtaussytometriaa sovelletaankin yhä enemmän mikrobiologisiin tutkimuksiin, ja erityisesti sitä käytetään mikrobien havaitsemiseen ja tunnistamiseen sekä kliinisessä mikrobiologiassa että muilla mikrobiologian osa-alueilla. Kliinisessä mikrobiologiassa virtaussytometriaa käytetään muun muassa diagnosointiin, bakteerien ja virusten tunnistamiseen, vasta-aineiden havaitsemiseen sekä mikrobien antibioottiresistenssin selvittämiseen. (Álvarez-Barrientos ym., 2000.) Tämän lisäksi virtaussytometrin avulla tehtävää mikrobien tunnistamista on käytetty esimerkiksi bioaerosolien analysoinnissa (Sincock ym., 1999; Day ym., 2002) sekä elintarvikehygieniaan liittyvissä tutkimuksissa (Miyamoto ym., 2003).

2.4.2.1. Leimaustekniikat

Ennen kuin solunäytteet analysoidaan virtaussytometrilla, ne yleensä leimataan jollakin merkkiaineella, joka mahdollistaa näytteiden tarkan analysoinnin. Leimausmenetelmiä on useita, ja sopivin menetelmä valitaan käyttötarkoituksen mukaan. Leimat voivat olla suoraan johonkin solun osaan kiinnittyviä värimolekyylejä tai ulkopuolisia koettimia (esimerkiksi vasta-aineita), joihin on liitetty fluoresoiva molekyyli. (Ormerod, 1990.)

Solunäytteiden leimaamisessa käytetään usein apuna koettimia, esimerkiksi vasta-aineita, jotka kiinnittyvät spesifisesti antigeeniinsä. Yleisesti käytössä ovat myös nukleiinihappokoettimet (DNA- ja RNA-koettimet), jotka kiinnittyvät solussa vastin-sekvenssiinsä. Koettimien avulla näytteitä voidaan tutkia yksityiskohtaisemmin kuin muuten. Tällöin voidaan esimerkiksi tunnistaa ja erottaa näytteestä jotkin tietyntyyppiset solut tai tutkia soluissa olevia yksityiskohtia. Käytetyimpiä

tunnistuskoettimia tällä hetkellä ovat todennäköisesti vasta-aineet, sillä niiden avulla tunnistaminen on helppoa ja spesifistä. Vasta-aineet ovat kuitenkin varsin vaikeita ja kalliita tuottaa, sillä niiden tuottamiseen tarvitaan koe-eläimiä. Vasta-aineet ovat myös melko alttiita ympäristöolosuhteiden vaikutukselle ja menettävät helposti toimintatehokkuutensa, mikä vaikeuttaa niiden käyttöä. (Ormerod, 1990; Jayasena, 1999.)

Käytössä olevien koettimien lisäksi kehitetään koko ajan uusia molekyylejä, joita voitaisiin käyttää spesifisinä tunnistuskoettimina. Tällaisista koettimia ovat esimerkiksi aptameerit. Aptameerit ovat oligonukleotidikoettimia, jotka voivat kiinnittyä useisiin erilaisiin kohdemolekyyleihin korkealla affiniteetilla ja erittäin spesifisesti. Aptameerit ovat koettimina varsin monipuolisia, sillä ne soveltuvat sekä diagnostiikkaan että terapeuttisiin sovelluksiin. Diagnostiikassa aptameereja käytetään tunnistusmolekyyleinä sekä *in vivo*- että *in vitro* -tutkimuksissa. Aptameerit ovat erittäin käyttökelpoisia, sillä ne ovat halpoja tuottaa eikä niiden tuottaminen vaadi koe-eläinten käyttöä toisin kuin esimerkiksi vasta-aineiden tuottaminen. Lisäksi aptameerit ovat varsin edullisia, hyvin säilyviä sekä helppoja muokata. (Jayasena, 1999.)

Spesifisiin tunnistuskoettimiin liitetään fluoresoiva molekyyli, jotta koettimien toiminta voidaan havaita virtaussytometrilla. Fluoresoivia väriaineita on olemassa lukuisia. Sopiva väriaine valitaan sen mukaan, minkälaista koetinta käytetään, millä aallonpituudella molekyyli viritetään ja millä detektorilla värireaktio on tarkoitus havaita.(Ormerod, 1990.)

Fluoresoiva väriaine voidaan liittää myös suoraan johonkin solun osaan, mikäli koettimen avulla tapahtuvaa spesifistä tunnistusta ei tarvita. Tällöin voidaan havaita jokin solun perusominaisuus. Myös soluun kiinnittyviä väriaineita on olemassa lukuisia. Värimolekyyli voi kiinnittyä esimerkiksi nukleiinihappomolekyyleihin, lipideihin tai solun kalvorakenteisiin. (Ormerod, 1990.) Fluoresoivat väriaineet voidaan jakaa toimintaperiaatteidensa mukaan kolmeen ryhmään: väriaineisiin, joiden fluoresenssi voimistuu niiden kiinnittyessä johonkin solun osaan (kuten proteiiniin tai nukleiinihappoon), väriaineisiin, joiden fluoresenssi on riippuvainen solun fysiologisista olosuhteista sekä väriaineisiin, jotka fluoresoivat entsymaattisen toiminnan seurauksena. (Álvarez-Barrientos ym., 2000.)

2.4.3. Virtaussytometria bioaerosolien tutkimisessa

Ensimmäinen virtaussytometrin edeltäjä kehitettiin 1940-luvulla juuri aerosolien tutkimista varten. Laitteen avulla laskettiin aerosolien partikkelimääriä kivipölystä. Laite soveltui kuitenkin myös biologisten näytteiden analysointiin, mitä tutkittiinkin toisen maailmansodan aikana, kun USA kehitti menetelmää bakteerien ja itiöiden havaitsemista varten. Vaikka tutkimustyötä tehtiin jo varhain, laite, jota voidaan kutsua nykyaikaisen virtaussytometrin edeltäjäksi, kehitettiin vasta 1960-luvulla. (Álvarez-Barrientos ym., 2000.) Nykyaikaisen virtaussytometrin myötä virtaussytometrian käyttö on yleistynyt monenlaisissa tutkimuksissa, mutta aerosolien analysoinnissa sitä on aikaisesta kehitystyöstä huolimatta käytetty varsin vähän.

Bioaerosolien tutkimisessa on tärkeää, että tutkimuksen voi tehdä helposti ja nopeasti sekä mieluiten kenttäolosuhteissa ilman koulutettua henkilökuntaa. Virtaussytometri-laitteistot ovat usein varsin kookkaita, mistä johtuen virtaussytometria ei ole soveltunut kenttäoloissa tapahtuvaan tutkimukseen. Nykyisin on kuitenkin saatavilla pöytämallisia virtaussytometreja, jotka soveltuvat myös kenttäkäyttöön. Tämän seurauksena virtaussytometrisovellukset erilaisissa mikrobiologisissa tutkimuksissa, kuten bioaerosolien tutkimisessa, ovat yhä suuremman mielenkiinnon kohteena. (Sincock ym., 1999.)

Virtaussytometriaa on jo pitkään käytetty laboratorio-oloissa bioaerosolien tutkimiseen. Virtaussytometrin avulla aerosolinäytteet voidaan analysoida nopeasti ja niistä voidaan mitata useita eri parametreja. Virtaussytometrilla voidaan selvittää näytteen partikkeli-määrä, partikkelien kokojakauma sekä fluoresenssiväriaineiden avulla monia solujen ominaisuuksia. Jotta aerosolien tutkiminen virtaussytometrilla onnistuisi, näyte pitää kuitenkin aina kerätä veteen esimerkiksi märkäsyklonikeräimellä. (Spurny, 1995.)

Kenttäkäyttöön soveltuvia virtaussytometriaan perustuvia bioaerosolien analysointi- ja tunnistusmenetelmiä on tutkittu jonkin verran (esimerkiksi Day ym., 2002). Menetelmät perustuvat yleensä joko nukleiinihappokoettimien tai vasta-aineiden avulla tapahtuvaan tunnistukseen ja havainnointiin. Menetelmien kehitystyö on kuitenkin vielä kesken, joten yleisessä käytössä tällaisia tekniikoita ei toistaiseksi ole. Kehitystyötä ja tutkimusta kuitenkin jatketaan koko ajan, ja kehitysnäkymät ovat lupaavia. (Sincokc ym., 1999.)

Tulevaisuudessa virtaussytometrian ennustetaan tulevan yhä tärkeämmäksi osaksi bioaerosolien tutkimista. Laitteisto kehittyy, ja uusia fluoresenssileimoja kehitetään koko ajan. Nämä parannukset lisäävät virtaussytometrian mahdollisuuksia ja tekevät siitä varteenotettavan vaihtoehdon kehitettäessä nopeaa ja tehokasta analysointi-, havaitsemis- ja tunnistusmenetelmää eri mikro-organismeille. (Spurny, 1995.) Virtaussytometriaa on jo nyt sovellettu useisiin eri tarkoituksiin bioaerosolitutkimuksessa. Virtaussytometrian avulla on muun muassa määritetty ilmankeräinten keräystehokkuutta sekä kerättyjen mikrobien elinkykyä (Chen & Li, 2005). Yhtenä tärkeimmistä, ellei jopa tärkeimpänä, virtaussytometrin sovellusalueista bioaerosolien tutkimisessa pidetään haitallisten mikrobien ja niiden osien nopeaa tunnistamista. Tämän alueen kehittämiseksi tehdään koko ajan tutkimustyötä sekä bioaerosolien yhteydessä että muilla tieteenaloilla, kuten lääketieteellisessä tutkimuksessa (Lange ym., 1997; Song ym., 2000; Day ym., 2002; Miyamoto ym., 2003). On mahdollista, että virtaussytometriaa hyödynnetään tulevaisuudessa automaattisten bioaerosolien analysointilaitteiden kehityksessä (Day ym., 2002).

2.5. Tutkimuksessa käytettävien tunnistusmenetelmien teoreettinen tausta

2.5.1. *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistaminen

Tässä tutkimuksessa testataan *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistamista kahdella eri menetelmällä. Toinen menetelmistä pohjautuu immunologiseen tunnistukseen, ja toisessa tunnistus tapahtuu itiöön kiinnittyvällä peptidiligandilla. Molemmissa menetelmissä tulos analysoidaan virtaussytometrian avulla.

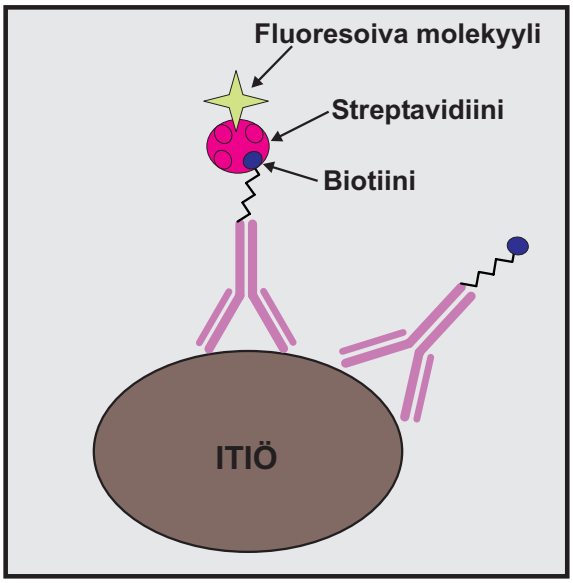
2.5.1.1. Vasta-ainetunnistus

Bacillus anthracis -itiöitä on aikaisemminkin tunnistettu virtaussytometrin avulla. Ensimmäiset tällaiset tutkimukset tehtiin jo 1980-luvulla. (Phillips & Martin, 1983 ja 1985.) Myös vasta-ainetunnistus on yhdistetty virtaussytometriaan *B.a.*-itiöiden tunnistuksessa (Phillips & Martin, 1983; Stopa, 2000). Tässä tutkielmassa käytettävä *B.a.*-itiöiden tunnistusmenetelmä on perusteiltaan varsin samanlainen kuin edellä mainituissa tutkimuksissa käytetyt vasta-ainetunnistukseen perustuvat menetelmät.

Tunnistusmenetelmässä *B.a.*-itiön tunnistava vasta-aine leimataan fluoresoivalla väriaineella. Väriaineen avulla itiöt, joihin vasta-aine on kiinnittynyt, voidaan havaita

virtaussytometrilla. Tässä tutkimuksessa fluoresoiva molekyyli liitetään vasta-aineeseen biotiinin ja streptavidiinin välityksellä. Biotiini liitetään vasta-aineeseen, ja streptavidiini on konjugoituna fluoresoivaan *DyLight*-väriaineeseen. Biotiinin liittäminen vasta-aineeseen tapahtuu reaktiossa, jossa biotiini kiinnittyy amidisidoksella vasta-aineessa olevien lysiini-aminohappojen primäärisiin aminoryhmiin (EZ-Link® NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit, käyttöohje). Biotiini ja streptavidiini kiinnittyvät toisiinsa erittäin voimakkaalla sidoksella (Wilchek & Bayer, 1999), joten niiden avulla fluoresoiva väriaine saadaan liitettyä vasta-aineeseen pitävästi. Fluoresoiva väriaine alkaa emittoida fluoresenssia, kun se viritetään virtaussytometrin lasersäteen avulla. Emittoituvan fluoresenssin aallonpituus on 645 nm, ja se on tutkimuksessa käytettävän virtaussytometrin mittausalueella.

Kun vasta-aine tunnistaa itiön, muodostuu tunnistuskompleksi, jossa ovat yhteen liittyneenä itiö, vasta-aine sekä fluoresoiva väriaine. Tämä kompleksi voidaan havaita virtaussytometrilla. Kuva reaktiossa muodostuvasta tunnistuskompleksista on kuvassa 2.3.



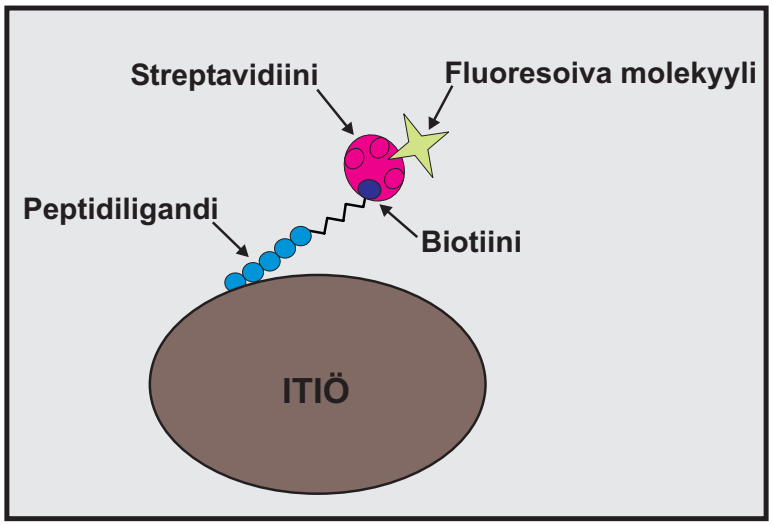
Kuva 2.3. Vasta-ainetunnistuksessa muodostuva kompleksi, joka voidaan havaita virtaussytometrilla

B.a.-itiöiden vasta-ainetunnistuksessa käytettävät vasta-aineet ovat kaupallisesti saatavilla olevia *B.a.*-itiövasta-aineita. Tutkimuksessa testattavista vasta-aineista osa on polyklonaalisia ja osa monoklonaalisia.

2.5.1.2. Tunnistus peptidiligandilla

Toinen tutkimuksessa testattava *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistusmenetelmä perustuu spesifiseen peptidiligandiin. Aiemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että peptidiligandi kiinnittyy spesifisesti *B.a.*-itiöiden pintaan (Williams ym., 2003). Tässä tutkimuksessa käytettävä tunnistusmenetelmä perustuu aiemmin julkaistuihin tutkimuksiin, joita sovelletaan tässä niin, että havaitseminen tapahtuu virtaussytometrilla (Williams ym., 2003; Brigati ym., 2004).

Tunnistusmenetelmässä peptidiligandiin liitetään fluoresoiva molekyyli, jotta peptidin tunnistamat itiöt ovat havaittavissa virtaussytometrilla. Peptidien värjääminen tapahtuu samoin kuin edellä vasta-aineiden liittäminen fluoresoivaan molekyyliin (ks. kappale 2.5.1.1.). Peptidiin liitetään biotiini, johon liittyy streptavidiiniin konjugoitu fluoresoiva väriainemolekyyli. Tällä kertaa biotiini kiinnittyy maleimidisidoksella peptidin karboksyylipäässä olevaan kysteiinihäntään, eikä amidisidoksella, kuten vasta-ainetunnistuksessa. Kun peptidi tunnistaa itiön, muodostuu tunnistuskompleksi itiöstä, peptidistä sekä väriaineesta (kuva 2.4.). Tunnistuskompleksi havaitaan virtaussytometrin avulla.



Kuva 2.4. Peptidiligandimenetelmässä muodostuva tunnistuskompleksi

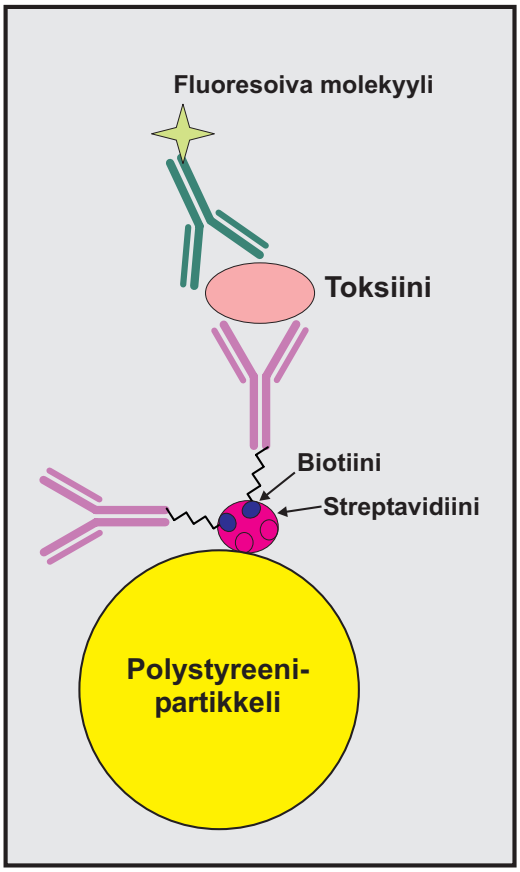
2.5.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen

Tutkimuksessa käytettävä botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmä perustuu immunologiseen tunnistukseen, ja tunnistustulos havaitaan virtaussytometrin avulla. Tunnistuksen havaitseminen tehdään mahdolliseksi käyttämällä apuna polystyreenipartikkelia, johon toksiini liittyy tunnistuksen yhteydessä. Polystyreenipartikkeli on riittävän suuri, jotta se voidaan nähdä virtaussytometrilla. Pelkkä toksiinimolekyyli ei näy virtaussytometrilla pienen kokonsa vuoksi.

On olemassa jonkin verran tutkimustuloksia siitä, miten erilaisia partikkeleita hyödynnetään proteiinien (toksiinien) tunnistamisessa. Esimerkiksi polystyreenipartikkeleita, magneettisia partikkeleita sekä lasipartikkeleita on käytetty toksiinitunnistuksen apuna (Renner, 1994; Song ym., 2000; Miyamoto ym., 2003; Joubert ym., 2005). Tässä tutkimuksessa käytettävä botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmä on muunnelma aiemmassa tutkimuksessa käytetystä menetelmästä, jossa tunnistus tapahtui magneettisen partikkelin avulla (Miyamoto ym., 2003). Magneettisen partikkelin sijaan havaitsemisen mahdollistavana partikkelina on tässä streptavidiinilla päällystetty polystyreeni-

partikkeli. Partikkeliin liitetään biotiinin avulla botuliinitoksiinivasta-aine, joka tunnistaa tutkittavassa näytteessä olevan botuliinitoksiinin. Vasta-aineeseen kiinnittyvä toksiinimolekyyli tehdään fluoresoivaksi toisen vasta-aineen avulla, johon on liitetty fluoresoiva molekyyli. Toksiini muodostaa vasta-aineiden sekä polystyreenipartikkelin kanssa tunnistuskompleksin, joka voidaan havaita virtaussytometrilla. Kaaviokuva muodostuvasta tunnistuskompleksista on kuvassa 2.5.

Tutkimuksessa käytettävistä vasta-aineista osa on polyklonaalisia ja osa monoklonaalisia. Monoklonaaliset vasta-aineet leimataan fluoresoivalla väriaineella ja polyklonaaliset biotinyloidaan, jotta ne voidaan liittää polystyreenipartikkeliin. Fluoresoivana molekyylinä tutkimuksessa käytetään Cy-5-väriainetta, joka liittyy vasta-aineen primäärisiin amiineihin kovalenttisella amidisidoksella. Tämä väriaine emittoi fluoresenssia, jonka aallonpituus on 680 nm. Tutkimuksessa käytettävän virtaussytometrin detektorit havaitsevat tämän aallonpituuden. Vasta-aineiden biotinylointi tapahtuu kuten edellä (ks. kappale 2.5.1.1.).



Kuva 2.5. Botuliinitoksiinin tunnistuskompleksi

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tämän *pro gradu* -tutkielman tavoitteena on kehittää virtaussytometriaan perustuva menetelmä, jonka avulla voidaan havaita tai tunnistaa biologisia taisteluaineagensseja ilmanäytteistä (bioaerosoli). Työssä arvioidaan ja vertaillaan erilaisia bioagenssien tunnistusmenetelmiä, joissa käytetään fluoresoivia merkkiaineita ja virtaussytometriaa. Merkkiaineina tutkittavissa menetelmissä on fluoresoivalla väriaineella leimattuja vasta-aineita tai agenssispesifinen peptidikoetin.

Tutkimuksesta saatavia tuloksia voidaan tulevaisuudessa hyödyntää kehitettäessä ilmaisinta, joka havaitsee ja tunnistaa ilmassa olevan haitallisen biologisen materiaalin. Menetelmien testaamisen lisäksi tutkimuksesta saadaan tietoa yksittäisten bioase-agensseja tunnistavien vasta-aineiden tehokkuudesta. Tätä tietoa voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi kehitettäessä muita immunologisia menetelmiä biologisten taisteluaineiden tunnistamista varten.

4. Menetelmät

4.1. Testiagenssit

4.1.1. Itiöt

Tutkimuksessa käytettiin itiösimulantteina kolmen eri bakteerin itiöitä: *Bacillus anthracis* -itiöitä (rokotekanta 7702 'Sterne'), Turex-50-torjunta-ainetta (*Bacillus thuringiensis* kurstaki-aizaway, kanta GC-91, Certis, USA) sekä *Bacillus subtilis* 'globigii' -itiövalmistetta (valmisteen toimitti Torbjörn Tjärnhage, FOI, Ruotsi).

Bacillus anthracis -itiöt kasvatettiin pakastettuna säilytetystä varastoviljelmästä. Ensin varastomaljalta siirrostettiin silmukalla itiöitä TSA-maljalle (tryptoni 15 g/l, soijapeptoni 3 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l), ja niitä kasvatettiin yön yli (18–20 h) +37 ^{o}C:n lämpötilassa. Yksi pesäke siirrettiin 10 ml:aan *Tryptone Soya Broth* -kasvatuslientä (TSB; tryptoni 17 g/l, soijapeptoni 3 g/l, NaCl 5 g/l, K_2HPO_4 2,5 g/l, pH 7,3). Bakteereita kasvatettiin kasvatusliemessä, ravistelussa, seitsemän tuntia. Kasvusto jaettiin itiöintimaljoille, joissa oli 12 ml mangaanisulfaattiagaria (MSA-maljat; tryptoni 15 g/l, hiivauute 3 g/l, NaCl 6 g/l, glukoosi 1 g/l, mangaanisulfaatti 0,1 g/l, agar 12 g/l). Itiöintimaljoille laitettiin bakteerikasvustoa 100 µl/malja, ja bakteereja kasvatettiin +37 ^{o}C:n lämpötilassa seitsemän vuorokautta. (European Committee for Standardization, 2001.)

Itiöt kerättiin kolmelta maljalta pesemällä maljojen pintaa steriilillä käänteisosmoosivedellä. Kerätyt itiöt suspensoitiin 40 ml:aan vettä ja pestiin kolme kertaa. Itiösuspension pesemisessä suspensiota sentrifugoitiin ensin 20 minuuttia 4 ^{o}C:ssa nopeudella 3 000 x g (Biofuge stratos -sentrifugi, Heraeus Instruments, Hanau, Saksa), minkä jälkeen supernatantti poistettiin ja pelletti suspensoitiin uudelleen steriiliin veteen.

Bacillus thuringiensis- ja *Bacillus subtilis* -itiösuspensiot valmistettiin pesemällä 200 mg Turex-50-torjunta-ainetta ja *B.s.*-itiövalmistetta kolme kertaa 10 ml:lla steriiliä, suodatettua vettä. Itiöt pestiin sentrifugoimalla suspensiota 20 minuuttia 4 ^{o}C:ssa nopeudella 3 000 x g (Biofuge stratos), poistamalla tämän jälkeen supernatantti ja suspensoimalla pelletti uudelleen 10 ml:aan steriiliä vettä.

Suspensioiden itiömäärä mitattiin laimennetusta itiösuspensiosta virtaussytometrin avulla. Lisäksi osasta suspensioita määritettiin elinkykyisten itiöiden määrä viljelemällä suspensioista tehtyjä laimennoksia NA-maljoilla (Nutrient agar; 20 g/l Nutrient broth [Biokar Diagnostics, Beauvais, Ranska], 15 g/l agar) +37°C:ssa yön yli, minkä jälkeen maljoille muodostuneet pesäkkeet laskettiin. Viljelymäärityksen avulla selvitettiin, että virtaussytometrilla määritetty itiömäärä vastasi suspensiossa olevien elinkykyisten itiöiden määrää. Mahdollisten vegetatiivisten solujen läsnäoloa itiösuspensioissa ei mitattu. Suspensioille virtaussytometrilla määritetyt itiömäärät on esitetty taulukossa 4.1.

Taulukko 4.1. Tutkimuksessa käytetyt itiösuspensiot

Itiösuspensio	*Itiöiden määrä (PMY/ml)*
B. anthracis	$1{,}9 \times 10^8$
B. thuringiensis	$1{,}1 \times 10^8$
B. subtilis	$1{,}3 \times 10^8$

Osa itiösuspensioista inaktivoitiin autoklavoimalla niitä 20 minuuttia (121°C, 1 bar). Inaktivoinnin onnistuminen varmistettiin viljelemällä autoklavoitua suspensiota NA-maljalla kolme vuorokautta.

Itiösuspensiot laimennettiin käyttösuspensioiksi steriiliin veteen tai veteen kerättyyn ilmanäytteeseen. Käyttösuspensioiden itiöpitoisuus oli noin 2×10^6 PMY/ml, jolloin itiöitä tuli reaktioseoksiin noin 1×10^6 PMY/ml. Käyttösuspensiosta tehtiin myös lisälaimennoksia tutkimuksen eri vaiheissa, jotta voitiin selvittää reaktiossa olevien itiöiden määrän vaikutus reaktion toimivuuteen. Näiden laimennosten itiöpitoisuudet olivat 2×10^5–4×10^7 PMY/ml. Käyttösuspensiot laimenivat reaktioseoksissa (ks. luvut 4.3.2 ja 4.4.2) suhteessa 1:2, eli itiöiden määrä reaktioseoksissa oli $1 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ PMY/ml.

4.1.2. Botuliinitoksiini

Botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmän testaamisessa käytettiin testiagenssina kaupallisesti saatavaa botuliinitoksiinivalmistetta. Valmiste sisälsi puhdistettua serotyypin A botuliinitoksiinia (*Clostridium botulinum* Type A neurotoxin, BoNT A, Metabiologics Inc., Madison, USA), ja sen toksiinipitoisuus oli 1 mg/ml (PBS:ssa).

Botuliinitoksiinista valmistettiin käyttöliuokset laimentamalla alkuperäistä liuosta 1 x PBS:een tai veteen kerättyyn ilmanäytteeseen, joka oli puskuroitu lisäämällä siihen 10 x PBS:ta suhteessa 1:10. Käyttöliuosten toksiinipitoisuudet on esitetty taulukossa 4.2.

Taulukko 4.2. Tutkimuksessa käytetyt botuliinitoksiiniliuokset

Liuoksen nro	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
Toksiinipitoisuus (ng/ml)	10000	1000	100	10	1	0,1	0

4.2. Ilmanäytteet

Tutkittavien näytteiden taustaksi kerättiin ulkoilmanäytteitä. Ilmanäytteet kerättiin SASS 2000 -märkäsyklonikeräimellä (Research International Inc., Washington, USA) steriiliin, suodatettuun (0,22 µm) veteen. Jokaiseen ilmanäytteeseen kerättiin 7950 l ilmaa (265 l/min, 30 min). (SASS 2000, Instruction Manual.)

Ilmanäytteissä mahdollisesti olevien bakteerien määrä määritettiin viljelemällä näytteitä NA-maljoilla 37^{o}C:ssa yön yli, minkä jälkeen mahdolliset pesäkkeet laskettiin. Maljoille ei muodostunut pesäkkeitä, joten ilmanäytteet sisälsivät kasvuun lähteviä bakteereita alle 10 PMY/ml.

Tutkimuksessa käytetyt näytteet valmistettiin sekoittamalla ilmanäytteeseen tutkittavaa agenssia (itiösuspensiota tai botuliinitoksiinia) halutussa pitoisuudessa.

4.3. Bacillus anthracis *-itiöiden vasta-ainetunnistus*

Bacillus anthracis -itiöiden tunnistuksessa testattiin kahta eri menetelmää. Ensimmäinen menetelmä perustuu vasta-ainetunnistukseen. (ks. kappale 2.5.1.)

Menetelmän toimivuutta testattiin eri vasta-ainemäärillä sekä eri itiömäärillä. Tunnistuksen spesifisyyttä testattiin käyttämällä testinäytteinä veteen kerättyjä ilmanäytteitä sekä valmistamalla näytteitä *B. anthracis* -itiöiden lisäksi myös *B. thuringiensis*- ja *B. subtilis* -itiöistä. Lisäksi tutkimuksessa testattiin itiönäytteen inaktivoinnin vaikutusta tunnistustulokseen tekemällä sama reaktio sekä elinkykyisillä että inaktivoiduilla itiöillä.

4.3.1. Vasta-aineet

Tutkimuksessa käytettiin kahta vasta-ainetta: monoklonaalista sekä polyklonaalista *B.a.*-itiövasta-ainetta. Vasta-aineiden tiedot on esitetty taulukossa 4.3. Vasta-aineille oli

annettu numerot 3 ja 4 toisen tutkimuksen yhteydessä, ja tässä tutkimuksessa käytettiin sekaannusten välttämiseksi samaa numerointia.

Taulukko 4.3. Tutkimuksessa käytetyt *B.a.*-vasta-aineet

Vasta-aineen nro	*Vasta-aine*	*Spesifisyys*
3	Monoclonal mouse anti - *Bacillus anthracis* Spore Antigen	*Bacillus anthracis* – itiöantigeeni
4	IgG fraction of rabbit serum to spore antigen of *Bacillus Anthracis*	*Bacillus anthracis* – itiöantigeeni

Vasta-aineet biotinyloitiin ennen tunnistusreaktiota, jotta niihin voitiin liittää fluoresoiva molekyyli. Biotinylointi tehtiin kaupallisella biotinylointikitillä (EZ-Link® NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) pakkauksessa olleen ohjeen mukaisesti (EZ-Link® NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit, Instructions, Pierce).

Biotinyloitujen vasta-aineiden konsentraatiot määritettiin Bradford-menetelmällä. Reagenssina proteiinipitoisuuden määrityksessä oli kaupallinen *Bradford reagent* (Sigma, Saint Louis, USA), ja tulokset mitattiin Multiskan MS 342 -spektrofotometrilla (Labsystems Oy, Helsinki, Suomi). Proteiinipitoisuuden määritys tehtiin Bradford-reagenssin mukana tulleen ohjeen mukaisesti (Bradford reagent, Technical Bulletin, Sigma).

Vasta-aineista käytettiin neljää eri näytepitoisuutta: 1 µl, 3 µl, 5 µl sekä 10 µl reaktioseosta kohti. Eri vasta-aineiden määrät reaktioseoksissa on esitetty taulukossa 4.4.

Taulukko 4.4. Vasta-aineiden määrät reaktioseoksissa

Määrä µl/reaktioseos	*Määrä µg/reaktioseos Vasta-aine 3*	*Pitoisuus µg/ml Vasta-aine 3*	*Määrä µg/reaktioseos Vasta-aine 4*	*Pitoisuus µg/ml Vasta-aine 4*
1	0,186	1,86	0,107	1,07
3	0,558	5,58	0,321	3,21
5	0,93	9,3	0,535	5,53
10	-	-	1,07	10,7

4.3.2. Tunnistusreaktio

Jotta vasta-ainetunnistus voitiin havaita virtaussytometrilla, tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet leimattiin fluoresoivalla väriaineella. Fluoresoiva molekyyli liitettiin vasta-

aineisiin tunnistusreaktion yhteydessä biotiinin ja streptavidiinin välityksellä. Fluoresoivana molekyylinä käytettiin streptavidiinikonjugoitua *DyLight*-väriainetta (Streptavidin, DyLight™647 Conjugated; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA), joka kiinnittyy vasta-aineessa olevaan biotiiniin.

Vasta-ainereaktiota varten valmistettiin kaikista itiönäytteistä reaktioseos. Reaktioseoksen koostumus määritettiin kokeilemalla, ja se on esitetty taulukossa 4.5.

Taulukko 4.5. Reaktioseos *B.a.*-itiöiden vasta-ainetunnistuksessa

Reagenssi	*Määrä (µl)*
Itiösuspensio (2×10^6 itiötä/ml)	50
10 x PBS	10
Vasta-aine	1 / 3 / 5 / 10
DyLight	2
H_2O	→ 100

Tuloksen kontrolloimiseksi valmistettiin kaksi nollanäytettä, joista toisessa ei ollut itiöitä (itiösuspension tilalla pelkkä ilmanäyte) ja toisessa ei ollut vasta-ainetta.

Tutkimuksessa käytettiin neljää eri vasta-ainepitoisuutta, joiden avulla selvitettiin reaktion toimimisen kannalta optimaalisin vasta-aineen määrä. Kun testattiin muiden tekijöiden kuin vasta-ainepitoisuuden vaikutusta tunnistustulokseen, vasta-aineen määrä oli vakio 10 µl.

Reaktioseosta inkuboitiin huoneenlämmössä valolta suojattuna 30–90 minuuttia, minkä jälkeen näytteet analysoitiin virtaussytometrilla (ks. kappale 4.6). Virtaussytometrilla saaduista tuloksista nähtiin, kuinka suuri osa näytteen itiöistä oli värjäytynyt, eli kuinka suureen osaan oli kiinnittynyt vasta-ainetta.

4.4. Bacillus anthracis *-itiöiden tunnistus peptidiligandilla*

Toinen tutkimuksessa käytetty *B.a.*-itiöiden tunnistusmenetelmä perustuu itiön pinnalle spesifisesti kiinnittyvään peptidiligandiin (ks. kappale 2.5.1.). Tunnistustulos havaitaan fluoresoivan väriaineen ja virtaussytometrin avulla. Näin voidaan tarkastella värjäytyneiden itiöiden osuutta kaikista näytteen itiöistä sekä arvioida tunnistusmenetelmän tehokkuutta.

Menetelmän toimivuutta testattiin eri peptidimäärillä sekä eri itiömäärillä. Menetelmän spesifisyyttä ja ristireagointia testattiin käyttämällä testinäytteinä veteen kerättyjä ilmanäytteitä sekä valmistamalla näytteitä *B. anthracis* -itiöiden lisäksi myös muista *Bacillus*-suvun itiöistä. Lisäksi tutkimuksessa testattiin, onko itiönäytteen inaktivoinnilla vaikutusta tunnistustulokseen.

4.4.1. Peptidiligandi

Tutkimuksessa käytettiin synteettisesti valmistettua peptidiä, jonka aminohappo-sekvenssi on ATYPLPIR (Eurogentec, Seraing, Belgia). Peptidin karboksyylipäähän oli glysiinien välityksellä liitetty ylimääräinen kysteiini (GGGC), jotta peptidi voitiin biotinyloida. Biotiini kiinnittyy maleimidisidoksella kysteiinitähteessä olevaan vapaaseen sulfhydryyliryhmään. Peptidi biotinyloitiin käyttäen kaupallista biotinylointi-reagenssia (No-Weigh Maleimide-PEO_2-Biotin, Pierce) pakkauksen ohjeiden mukaisesti (No-Weigh Maleimide-PEO_2-Biotin, Instructions, Pierce).

4.4.2. Tunnistusreaktio

Peptidit tehtiin fluoresoiviksi tunnistusreaktion yhteydessä, jotta tulosta voitiin tarkastella virtaussytometrilla. Fluoresoivana molekyylinä reaktiossa käytettiin streptavidiiniin liitettyä DyLight-väriainetta (Streptavidin, DyLight ™ 647 Conjugated, Pierce), joka kiinnittyy peptidissä olevaan biotiiniin.

Tunnistusreaktiota varten näytteistä valmistettiin reaktioseos, jonka koostumus määritettiin kokeilemalla. Tutkimuksessa käytetyn reaktioseoksen koostumus on esitetty taulukossa 4.6.

Taulukko 4.6. Peptidiligandi-tunnistuksessa käytetty reaktioseos

Reagenssi	*Määrä (µl)*
Itiösuspensio	50
Väriliuos (*DyLight*)	2
Peptidiliuos (1mg/ml)	0,5 – 2,5 (4 – 20 µM)
1 x PBS	→ 100

Peptidin määrää reaktioseoksessa vaihtelemalla selvitettiin tunnistuksen onnistumisen kannalta optimaalisin peptidipitoisuus. Kun testattiin itiömäärän vaikutusta tunnistukseen, peptidin määrä oli vakio 1 µl.

Reaktion annettiin tapahtua 30 minuuttia, minkä jälkeen näytteet analysoitiin virtaussytometrilla (ks. kappale 4.6). Virtaussytometrin mittaamasta tuloksesta nähtiin, kuinka suuri osa näytteessä olevista partikkeleista (itiöistä) oli värjäytynyt, eli kuinka hyvin peptiditunnistus oli onnistunut.

4.5. Botuliinitoksiinin vasta-ainetunnistus

Botuliinitoksiinin tunnistamisessa käytettiin vasta-ainetunnistukseen perustuvaa menetelmää. Tutkitussa menetelmässä pienikokoinen toksiinimolekyyli liitetään suurempaan polystyreenipartikkeliin, jotta tunnistuksen onnistumista voidaan tarkastella virtaussytometrilla. (ks. kappale 2.5.2.)

Tutkimuksessa testattiin tunnistusmenetelmän toimivuutta neljällä eri vasta-aineparilla sekä eri määrillä toksiinia. Menetelmän spesifisyyttä testattiin käyttämällä testinäytteenä veteen kerättyä ilmanäytettä.

4.5.1. Vasta-aineet

Tutkimuksessa käytettiin neljää eri vasta-ainetta botuliinitoksiinin A-serotyypille. Vasta-aineista kaksi oli polyklonaalisia ja kaksi monoklonaalisia. Kaksi vasta-ainetta (polyklonaaliset) biotinyloitiin, jotta ne saatiin liitettyä streptavidiinilla päällystettyihin polystyreenipartikkeleihin (ProActive® Streptavidin Coated Microspheres, Bangs Laboratories, Inc., Fishers, USA). Vasta-aineet biotinyloitiin kaupallisella biotinylointikitillä (EZ-Link® NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit, Pierce) pakkauksessa olleen ohjeen mukaisesti (EZ-Link® NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit, Instructions, Pierce).

Kaksi muuta vasta-ainetta (monoklonaaliset) värjättiin *DyLight*-väriaineella käyttäen kaupallista värjäyskittiä (DyLight™ 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit, Pierce). Värjääminen tehtiin värjäyskitin ohjeen mukaisesti (DyLight™ 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit, Instructions, Pierce). Väriaineen avulla vasta-ainetunnistuksen onnistumista voitiin tarkastella virtaussytometrilla.

Värjättyjen ja biotinyloitujen vasta-aineiden konsentraatiot määritettiin Bradford-menetelmällä. Reagenssina proteiinipitoisuuden määrityksessä oli kaupallinen *Bradford reagent* (Sigma), ja tulokset mitattiin Multiskan MS 342 -spektrofotometrilla. Proteiinipitoisuuden määritys tehtiin reagenssin ohjeen mukaisesti (Bradford ragent, Technical

Bulletin, Sigma). Tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet ja niille määritetyt pitoisuudet on esitetty taulukossa 4.7.

Taulukko 4.7. Tutkimuksessa käytetyt botuliinitoksiinivasta-aineet

Vasta-aineen nro	*Vasta-aine*	*Spesifisyys*	*Biotiini/ DyLight*	*Konsentraatio mg/ml*
1	Rabbit anti *C. botulinum* type A	*Clostridium botulinum* -bakteerin neurotoksiini A	Biotiini	0,175
2	Rabbit anti *C. botulinum* neurotoxin type A	*Clostridium botulinum* -bakteerin neurotoksiini A -kompleksi	Biotiini	0,115
3	Monoclonal mouse anti-*Clostridium botulinum* A toxoid	*Clostridium botulinum* -bakteerin A-toksoidi	DyLight	n. 0,2
4	Monoclonal mouse anti-*Clostridium botulinum* A toxoid	*Clostridium botulinum* -bakteerin A-toksoidi	DyLight	n. 0,2

Vasta-aineista voitiin muodostaa neljä erilaista kahden vasta-aineen yhdistelmää: 1+3, 1+4, 2+3 sekä 2+4. Kaikkien yhdistelmien toimivuus testattiin tutkimuksessa.

4.5.2. Tunnistusreaktio

Vasta-aineet liitettiin polystyreenipartikkeleihin ja toksiiniin kahdessa vaiheessa. Ensin biotinyloitu vasta-aine liitettiin streptavidiinilla päällystettyihin polystyreeni-partikkeleihin ja värjätty vasta-aine näytteessä mahdollisesti olevaan toksiiniin. Reaktioiden annettiin tapahtua 30 minuuttia.

Toisessa vaiheessa reaktioseokset yhdistettiin ja inkubointia jatkettiin 30–60 minuuttia. Tällöin reaktioseoksen polystyreenipartikkelit ja toksiinimolekyylit muodostivat vasta-aineiden välityksellä tunnistuskomplekseja, ja tunnistuksen onnistumista voitiin tarkastella virtaussytometrilla.

Reaktioseoksen koostumus määritettiin kokeilemalla useita eri reagenssipitoisuuksia. Optimaalisin koostumus reaktioseokselle on esitetty taulukossa 4.8. Tätä reaktioseosta käytettiin kaikissa seuraavissa mittauksissa.

Taulukko 4.8. Botuliinitoksiinin tunnistusreaktion reaktioseos

Reagenssi	*Määrä (µl)*
Polystyreenisuspensio	5
Biotinyloitu vasta-aine 1	3
Biotinyloitu vasta-aine 2	4
Värjätty vasta-aine 3 tai 4	1
Toksiini	1–10 (useita laimennoksia)
(Ilmanäyte)	(40–49)
1 x PBS	→100

Ennen reaktioseoksen valmistusta polystyreenipartikkelit pestiin kerran 1 x PBS:lla lisäämällä 5 µl polystyreenisuspensiota 50 µl:aan PBS:ta ja sentrifugoimalla seosta (MiniSpin-sentrifugi, Eppendorf AG, Hampuri, Saksa) 15 minuuttia (1 200 x g). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja polystyreenipelletti suspensoitiin uudelleen reaktioseoksessa tarvittavaan tilavuuteen PBS:sta.

Osa reaktioseoksessa olevasta PBS:ta korvattiin ilmanäytteellä tutkittaessa tunnistus-menetelmän spesifisyyttä.

4.6. Virtaussytometria

Tutkimuksessa käytettiin kenttäolosuhteisiin soveltuvaa kannettavaa virtaussytometria (Mircrocyte, BioDetect AS, Oslo, Norja). Tutkimusta varten virtaussytometri kalibroitiin laitteen ohjeiden mukaisesti, ja virtausnopeudeksi säädettiin 0,5 µl näytettä sekunnissa. Jokaista näytettä mitattiin noin 40 sekuntia, ja mittausten välillä laitteisto huuhdeltiin. Virtaussytometrin ajopuskurina käytettiin 0,07 % etikkahappoa, johon oli lisätty leväntorjunta-ainetta (Algizin A, Waterlife Research Ind. Ltd., Longford, UK). Virtaussytometrin puskuriliuos vaihdettiin viikon välein ja laitteessa oleva suodatin kerran kuukaudessa. Kaikkien mittausten aikana laitteen asetukset olivat seuraavat: Display: Fluorescence, Treshold: off.

Itiönäytteiden värjäytymistulokset luettiin virtaussytometrin mittausalueen kanavien 60–120 kohdalta, joka vastaa noin kokoaluetta 0,5–1 µm. Tämä alue valittiin, koska *B.a.*-itiöt sijaitsevat tällä kokoalueella. Lisäksi tällä alueella on havaittavissa värjäytymispiikki näytteissä, joissa *B.a.*-itiöitä on tunnistettu vasta-aineiden avulla. Alue valittiin samaksi kaikissa mittauksissa, jotta kahdesta erillisestä tutkimuksesta saatavat tulokset olisivat vertailukelpoisia. Toksiininäytteiden värjäytymistulokset luettiin virtaussytometrista kanavien 175–205 kohdalta (kokoalue noin 4,5–7,5 µm),

koska toksiinien tunnistuksessa käytetyt polystyreenipartikkelit sijaitsevat tällä kokoalueella.

4.7. Immunokromatografiset pikatestit

Tutkimuksessa testattujen virtaussytometriamenetelmien soveltuvuutta käytäntöön arvioitiin vertaamalla menetelmien tunnistustehokkuutta ja käytettävyyttä nykyisin käytössä olevaan bioagenssien tunnistusmenetelmään. Vertailumenetelmänä käytettiin kaupallisia immunokromatografisia pikatestiliuskoja (BioThreat Alert™ Test Strip, Tetracore Inc., Gaithersburg, USA). Vertailtavana oli sekä botuliinitoksiinin että *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistamiseen tarkoitettuja pikatestiliuskoja.

Pikatestiliuskojen testauksessa käytettiin samoja testiagensseja ja näytepitoisuuksia kuin virtaussytometriamenetelmissä, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Pikatestiliuskoista testattiin ainoastaan detektiorajat tunnistettavalle agenssille. Ristireagointia ei testattu.

4.7.1. Testinäytteet

Pikatestiliuskojen testauksessa käytettiin testinäytteinä elinkykyisiä ja inaktivoituja *B. anthracis* -itiöitä sekä botuliinitoksiinia. Kaikista testiagensseista käytettiin samoja valmisteita kuin virtaussytometrimittauksissa.

Botuliinitoksiinista valmistettiin testausta varten laimennossarja (taulukko 4.2). Laimennokset tehtiin testiliuskapakkaukseen kuuluvaan näytepuskuriin (PBS, jossa 0,1 % Triton-x sekä 0,1 % NaN_3). Eri toksiinipitoisuuksisten näytteiden lisäksi testisarjaan kuului nollanäyte, joka sisälsi vain laimennoksiin käytettyä näytepuskuria.

Elinkykyisiä *B.a.*-itiöitä sisältävästä suspensiosta tehtiin kaksi laimennosta, joissa oli (virtaussytometrilla määritettynä) noin 1 x 10^5 PMY/ml sekä noin 2 x 10^7 PMY/ml. Inaktivoituja itiöitä sisältävästä suspensiosta tehtiin ainoastaan yksi laimennos (noin 2 x 10^7 PMY/ml). Laimennokset tehtiin pikatestiliuskojen mukana toimitettuun näytepuskuriin.

4.7.2. Pikatestit

Näytteet analysoitiin pikatestiliuskojen mukana olleen ohjeen mukaisesti (Anthrax BioThreat Alert Test Strip Specification Sheet, Bot Tox BioThreat Alert Test Strip Specification Sheet, Tetracore Inc.), eli näytettä pipetoitiin testiliuskalle 150 µl (5–6 tippaa pakkauksessa olevalla kertakäyttöpipetillä), ja reaktion annettiin tapahtua 15 minuutin ajan. Tämän jälkeen tulokset luettiin ja liuskat valokuvattiin.

5. Tulokset

5.1. Bacillus anthracis *-itiöiden tunnistaminen*

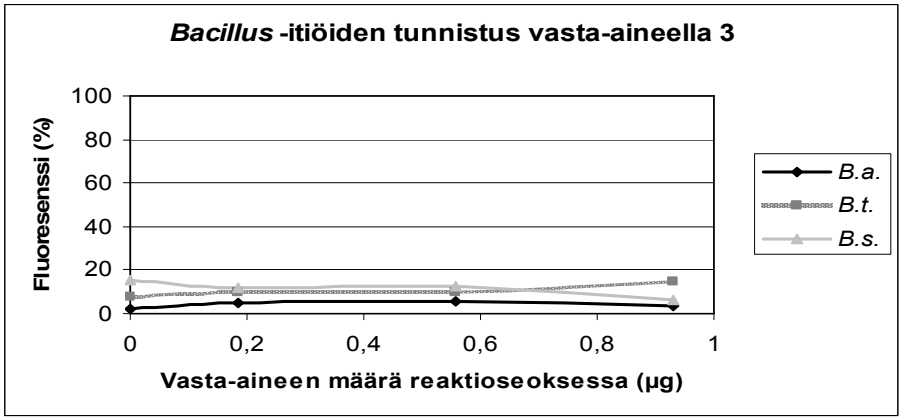
5.1.1. Vasta-ainetunnistus

5.1.1.1. Vasta-aineiden testaus

Aluksi tutkimuksessa testattiin tutkittavien vasta-aineiden sitoutumistehokkuutta *B.a.*-itiöihin sekä ristireagointia muiden *Bacillus*-itiöiden kanssa. Samalla selvitettiin optimaalisia reaktio-olosuhteita tunnistusreaktiota varten.

Virtaussytometrilla saaduista tuloksista nähdään, että vasta-aine 3 ei kiinnity kovin tehokkaasti tutkittuihin itiöihin. Itiönäytteiden väliset erot vasta-aineen sitoutumistehokkuudessa (fluoresenssin määrässä) näkyvät kuvan 5.1 kuvaajasta. Kuvaajassa on esitetty fluoresoivien itiöiden osuus näytteen koko itiömäärästä suhteessa reaktioseoksen vasta-ainemäärään. Kuvaajassa olevat fluoresenssiprosentit on otettu siltä virtaussytometrin mittausalueelta, jolla *B. anthracis* -itiönäytteissä on eniten partikkeleita ja virtaussytometrin histogrammikuvaajaan muodostuu piikki (mittauskanavat 60–120).

Kuvan 5.1 kuvaajasta nähdään, että kaikkien tutkittujen näytteiden värjäytymisprosentit ovat varsin alhaisia (alle 20 %). Eri itiönäytteet myös värjäytyvät lähes yhtä paljon ja vaihtelua on varsin vähän. Voidaan siis olettaa, että mikäli reaktiossa tapahtuu *B.a.*-itiöiden vasta-ainetunnistusta, ristireagointi muiden *Bacillus*-itiöiden kanssa on voimakasta. Värjäytymisprosenteissa ei kuitenkaan ole havaittavissa muutosta vasta-aineen määrän muuttuessa, joten vasta-aineen määrä ei näytä vaikuttavan mahdolliseen sitoutumiseen. Tämä viittaa siihen, että vasta-ainetunnistusta tapahtuu erittäin vähän tai ei lainkaan.

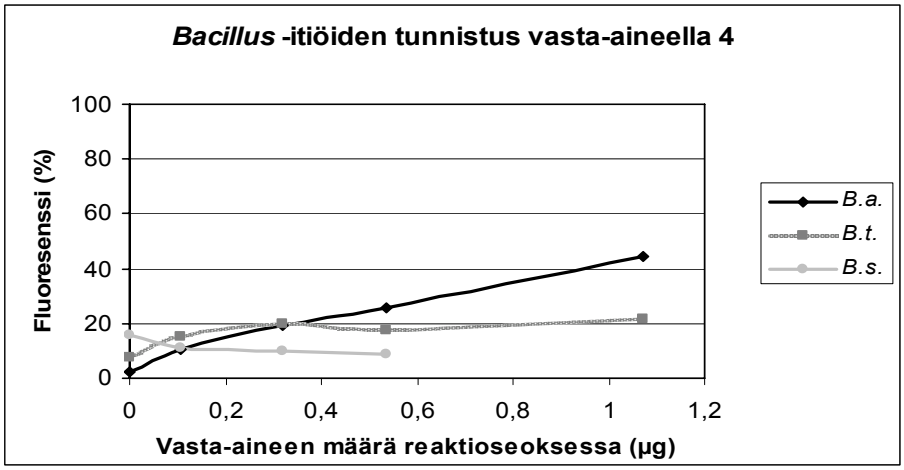


Kuva 5.1. Itiöiden värjäytyminen vasta-aineella 3

Vasta-aineen 4 sitoutuminen itiöihin on tehokkaampaa kuin vasta-aineen 3. Tunnistuksen tehokkuutta havainnollistaa kuvassa 5.2 oleva kuvaaja. Tässä on esitetty eri itiönäytteiden värjäytymisprosentit eri vasta-ainemäärillä. Fluoresenssiprosentit on myös tässä otettu virtaussytometrin histogrammikuvaajan kohdasta, jossa *B.a.*-itiönäytteessä on havaittavissa piikki (kanavat 60–120).

Kuvan 5.2 kuvaajasta nähdään, että värjäytyminen on voimakkainta näytteessä, jossa on *B.a.*-itiöitä. *B.a.*-näytteen värjäytymisprosentti on parhaimmillaan yli 40 %. Myös *B. thuringiensis* -näytteen värjäytyminen on varsin voimakasta, mutta kuitenkin heikompaa kuin *B.a.*-näytteen, erityisesti suurilla vasta-ainepitoisuuksilla (yli 0,5 µg). Sen sijaan *B. subtilis* -näytteen värjäytyminen on erittäin vähäistä.

B.a.-itiöiden värjäytyminen lisääntyy sitä mukaa kuin vasta-aineen määrä reaktioseoksessa lisääntyy. *B.a.*-itiöihin sitoutuneen vasta-aineen määrä on siis selkeästi riippuvainen reaktioseoksessa olevan vasta-aineen määrästä. Muissa näytteissä värjäytyminen säilyy lähes samana riippumatta vasta-aineen pitoisuudesta, eli reaktioseoksessa olevan vasta-aineen määrän ja itiöiden värjäytymisprosentin välillä ei tällöin ole havaittavissa verrannollisuutta.

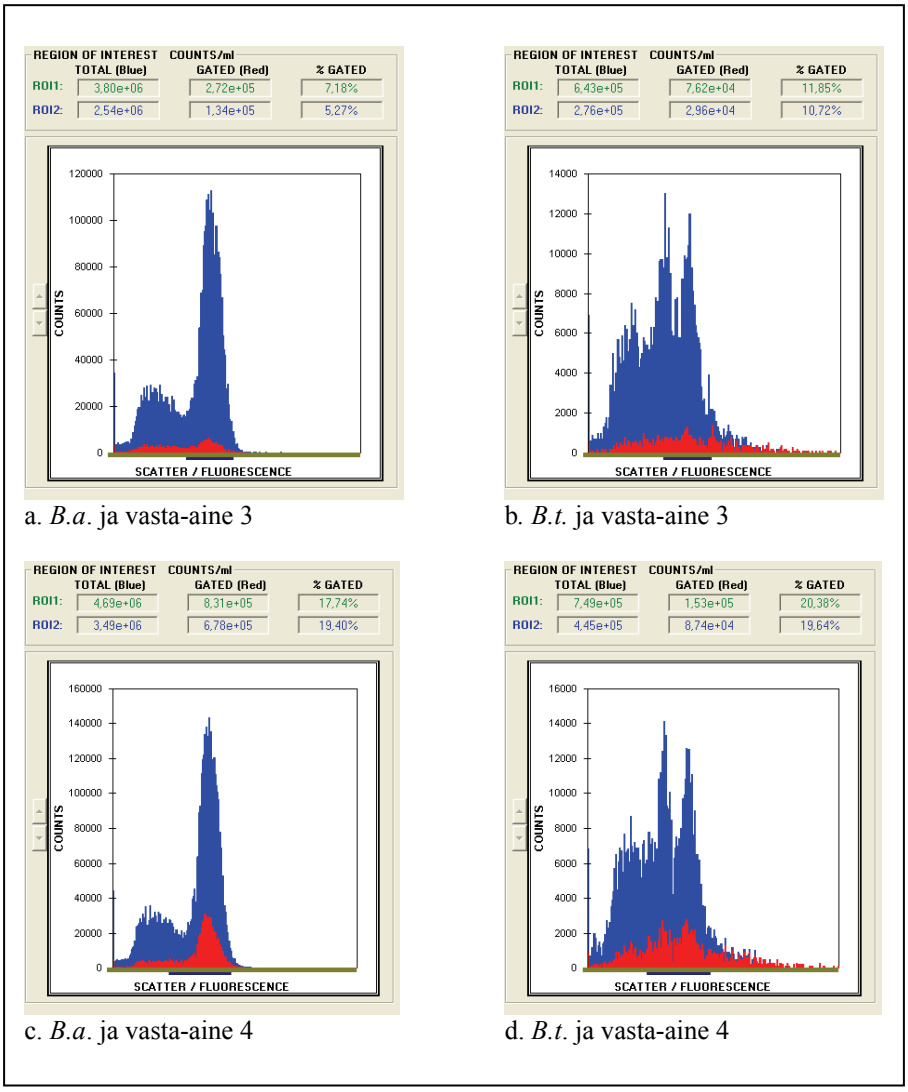


Kuva 5.2. Itiöiden värjäytyminen vasta-aineella 4

Itiönäytteiden värjäytymisosuuksia, eli vasta-aineiden kiinnittymistehokkuutta, voi tarkastella myös vertaamalla eri näytteistä saatuja virtaussytometrin histogrammikuvaajia. Kuvassa 5.3 on histogrammikuvaajat neljästä itiönäytteestä, joista kahdessa (a ja b) käytettiin tunnistukseen vasta-ainetta 3 ja kahdessa (c ja d) vasta-ainetta 4. Kuvaajissa a ja c näytteenä oli *B. anthracis* -itiöitä ja kuvaajissa b ja d *B. thuringiensis* -itiöitä. Vasta-aineen määrä kaikkien näytteiden reaktioseoksissa oli 3 µl. Histogrammikuvaajissa on esitetty näytteessä olevien partikkeleiden määrä suhteessa partikkeleiden kokoon (sininen) sekä fluoresenssin määrään (punainen).

Kuvasta 5.3 nähdään, että vasta-aine 4 tunnisti hyvin *B.a.*-itiöt, ja *B.a.*-näytteen kuvaajassa on selvä värjäytymispiikki itiöpiikin kanssa samassa kohdassa. Vasta-ainetta 3 sisältävän näytteen kuvaajassa ei ole havaittavissa yhtä selkeää värjäytymispiikkiä.

B.t.-itiöiden värjäytymisprosentti oli kummallakin vasta-aineella lähes samalla tasolla kuin *B.a.*-itiöiden värjäytymisprosentti. Myös *B.t.*-itiöt värjäytyivät vasta-aineella 4 hieman tehokkaammin kuin vasta-aineella 3. *B.t.*-itiönäytteen kuvaajassa ei kuitenkaan ole havaittavissa samanlaista värjäytymispiikkiä kuin *B.a.*-kuvaajassa, ja myös kuvaajan ulkomuoto on erilainen.



a. *B.a.* ja vasta-aine 3

b. *B.t.* ja vasta-aine 3

c. *B.a.* ja vasta-aine 4

d. *B.t.* ja vasta-aine 4

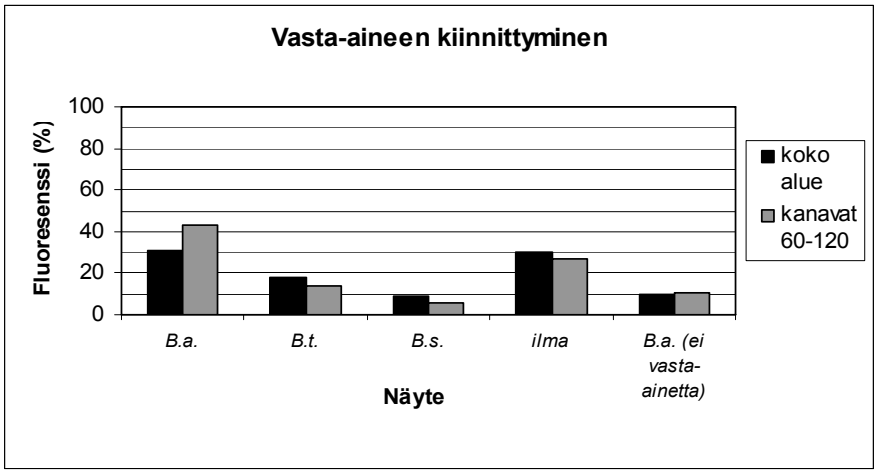
Kuva 5.3. Itiönäytteiden värjäytyminen tutkittujen vasta-aineiden avulla

5.1.1.2. Bacillus anthracis *-itiöiden tunnistaminen ilmanäytteestä*

Tunnistusmenetelmän spesifisyyttä arvioitiin testaamalla, onnistuuko tunnistus luonnollisia näytteitä simuloivista testinäytteistä (ilmanäytteet). Ristireagoinnin selvittämiseksi testinäytteitä valmistettiin *B.a.*-itiöiden lisäksi myös muista *Bacillus*-suvun itiöistä.

Edellisten tulosten perusteella päätettiin käyttää ilmanäytteitä tutkittaessa ainoastaan vasta-ainetta 4, ja vasta-aineen määräksi reaktioseoksessa valittiin 10 µl (1,07 µg).

Kuvasta 5.4 nähdään tulokset kaikista tutkituista näytteistä. Kuvaajasta käy ilmi fluoresoivien partikkeleiden osuus kaikista näytteen partikkeleista. Kuvaajassa on tulos virtaussytometrin koko mittausalueelta sekä alueelta, jossa on otettu huomioon ainoastaan mittauskanavat 60–120 (värjäytymispiikki).

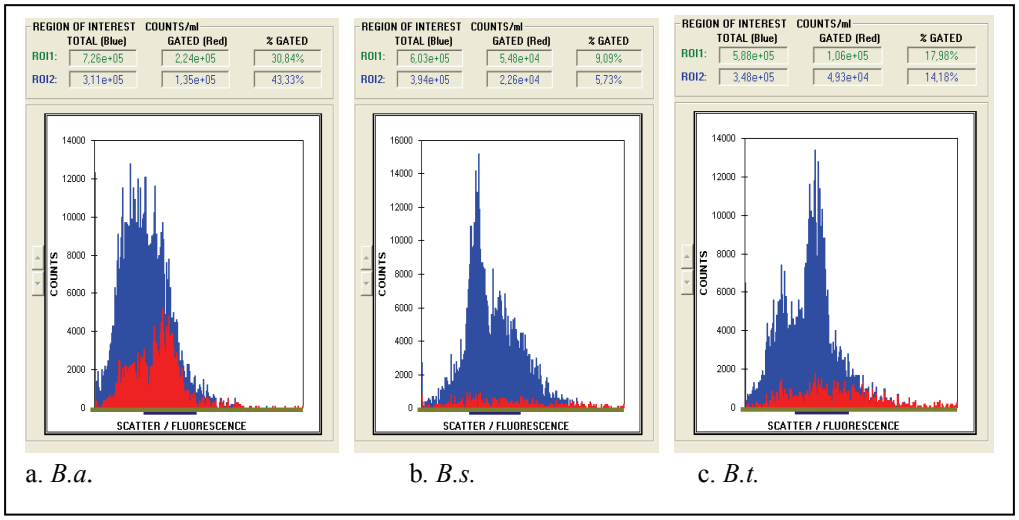


Kuva 5.4. Vasta-aineen kiinnittyminen tutkittuihin näytteisiin

Kuten kuvasta 5.4 nähdään, värjäytyneiden partikkeleiden osuus on huomattavasti suurempi *B.a.*-itiönäytteessä (noin 40 %) kuin muissa itiönäytteissä (< 20 %). Sen sijaan pelkässä ilmanäytteessä värjäytyneiden partikkeleiden osuus on varsin suuri (noin 30 %), mikä johtuu mahdollisesti siitä, että näytteen kokonaispartikkelimäärä on melko pieni, jolloin fluoresoiva tausta tulee selvemmin esiin.

B.a.-itiönäyte on kuitenkin hyvin erotettavissa myös ilmanäytteestä, sillä se on tutkituista näytteistä ainoa, jossa värjäytyminen kanavien 60–120 alueella on selvästi kokonaisvärjäytymistä runsaampaa. *B.a.*-näytteessä siis on havaittavissa värjäytymis-keskittymä yhdellä alueella, kun taas muissa näytteissä värjäytyminen jakautuu tasaisesti koko alueelle.

Värjäytymispiikki kanavien 60–120 kohdalla näkyy hyvin myös näytteiden histogrammikuvaajista. Kuvassa 5.5 on histogrammikuvaajat näytteistä, jotka sisältävät inaktivoituja *B.a.*-itiöitä, *B.s.*-itiöitä tai *B.t.*-itiöitä ilmanäytteessä.

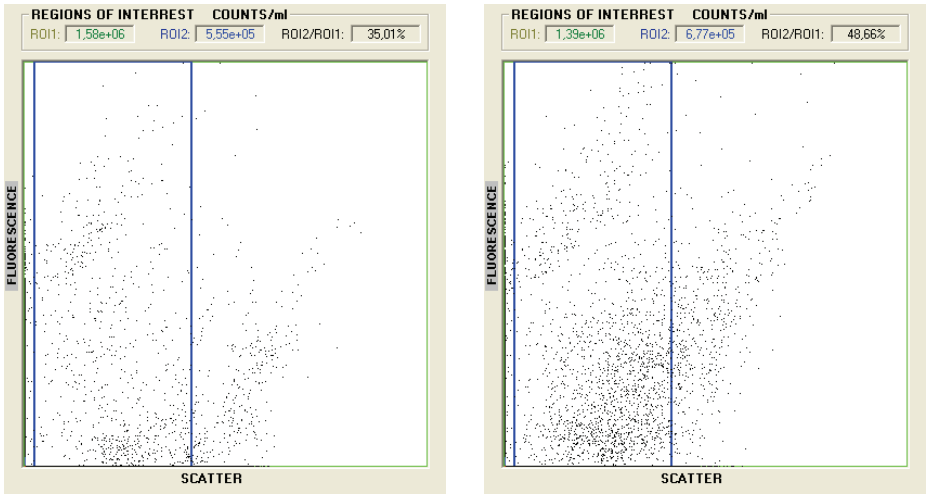


a. *B.a.* b. *B.s.* c. *B.t.*

Kuva 5.5. *Bacillus*-itiöiden tunnistus ilmanäytteistä

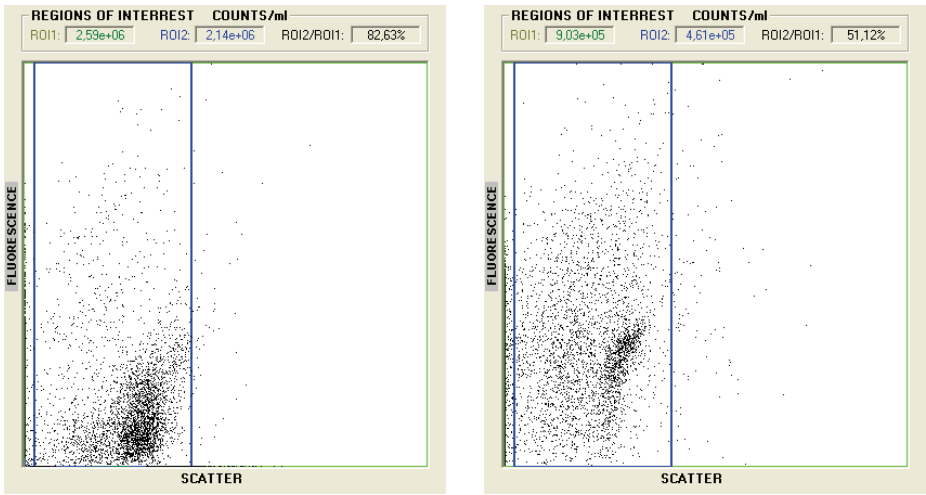
Virtaussytometrin pisteparvikuvioiden (partikkelin fluoresenssin intensiteetti vs. partikkelin koko) avulla selvitettiin, ovatko näytteet erotettavissa toisistaan kuvaajan ulkomuodon perusteella. Lisäksi tarkasteltiin näytteen itiömäärän vaikutusta kuvaajan muotoon.

Tutkittaessa virtaussytometristä saatuja pisteparvikuvaajia havaittiin, että *B.a.*-näytteiden kuvaajissa pisteet keskittyivät samalle alueelle, kun taas muiden itiönäytteiden kuvaajissa pisteet olivat jakautuneet koko mittausalueelle. *B.a.*-näytteiden kuvaajien muoto ja sijoittuminen mittausalueelle näyttävät kuitenkin olevan riippuvaisia näytteessä olevien itiöiden määrästä. *B.a.*-itiönäytteiden ja muiden itiönäytteiden välisiä eroja pisteparvikuvaajissa voidaan tarkastella kuvasta 5.6. Kuvassa on esitetty virtaussytometrin pisteparvikuvaajat neljästä eri näytteestä. Näistä kuvaajista nähdään, että *B.a.*-näytteissä on selvä värjäytymiskeskittymä. Keskittymän sijainti y-akselilla kuitenkin muuttuu itiömäärän muuttuessa. Näytteessä, jossa on paljon itiöitä, pistekeskittymä sijaitsee lähellä nollaa, kun taas vähän itiöitä sisältävän näytteen pistekeskittymä on hieman ylempänä. Fluoresenssin intensiteetti siis näyttää vaihtelevan sen mukaan, kuinka paljon näytteessä on itiöitä. Keskittymä myös on selkeämmin havaittavissa näytteessä, jossa itiöitä on enemmän.



a. *B.s.*

b. *B.t.*

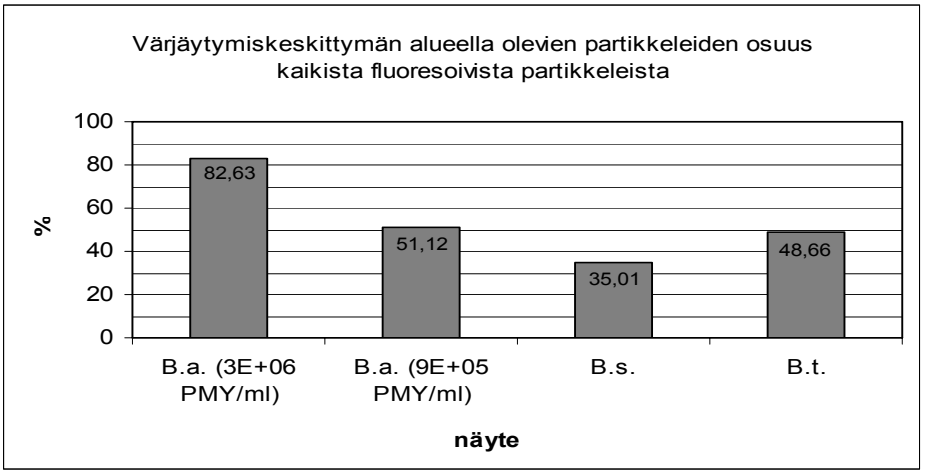


c. *B.a.* 3 x 10^6 PMY/ml

d. *B.a.* 9 x 10^5 PMY/ml

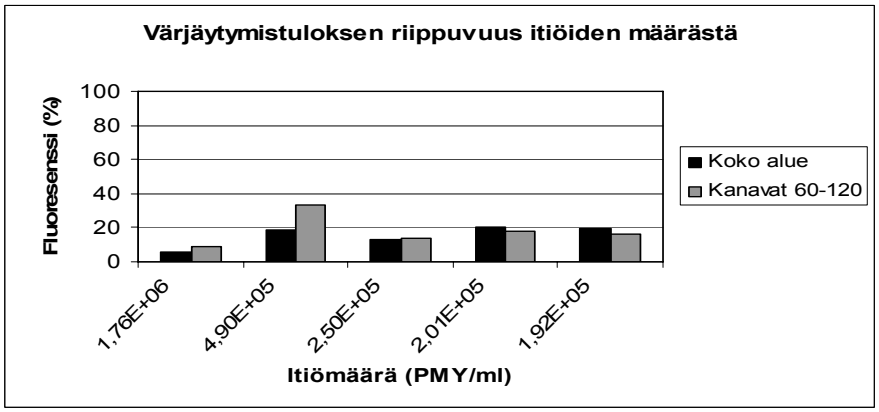
Kuva 5.6. Eri itiönäytteiden pisteparvikuvaajat

Pisteparvikuvaajien pisteiden sijoittumista mittausalueelle havainnollistaa kuvassa 5.7 oleva pylväskuvaaja, joka on laadittu pisteparvikuvaajista saatujen arvojen perusteella. Kuvaajasta nähdään, että näytteessä, jossa on tilavuuteen nähden runsaasti itiöitä (*B.a.* 3 x 10^6 PMY/ml), suurin osa (yli 80 %) virtaussytometrin havaitsemista partikkeleista sijaitsee pisteparvikuvaajassa samalla alueella. Sen sijaan näytteessä, jossa itiöitä on vähemmän, ainoastaan hieman yli puolet partikkeleista sijaitsee tällä samalla alueella. Kuitenkin muiden itiönäytteiden kohdalla osuus on vielä pienempi.



Kuva 5.7. Värjäytyneiden partikkeleiden sijainti pisteparvikuvaajassa

Lopuksi testattiin näytteen itiömäärän vaikutusta tunnistustulokseen. Tällöin havaittiin, että testatulla vasta-ainemäärällä värjäystulos on paras, eli näytteen värjäytymisprosentti on suurin, kun itiömäärä reaktioseoksessa on noin 500 000 PMY/ml. Mikäli itiömäärä on tätä suuruusluokkaa, *B.a.*-itiöitä sisältävä näyte on erotettavissa muista näytteistä. Jos itiömäärä on tätä pienempi tai suurempi, värjäytyneet itiöt sekoittuvat muuhun näytteeseen, eikä värjäytymispiikkiä voida erottaa. Kuvaaja värjäytymisprosenteista eri itiömäärillä on kuvassa 5.8.



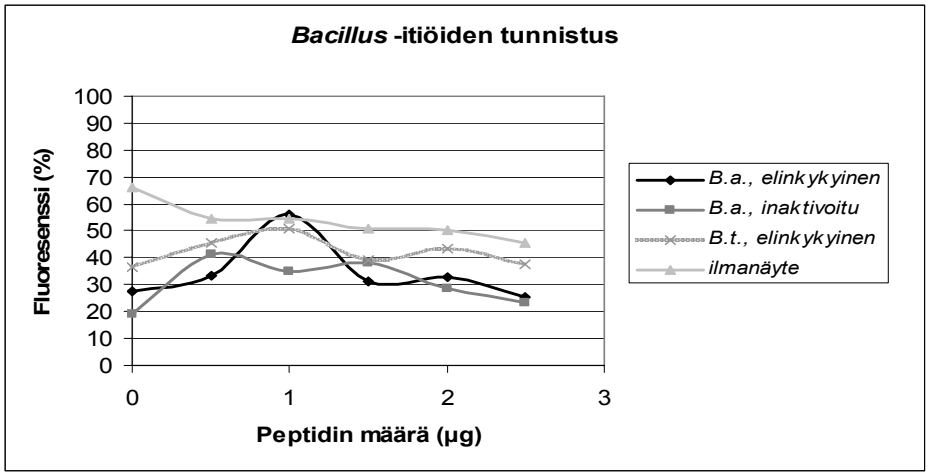
Kuva 5.8. Itiömäärän vaikutus vasta-ainereaktioon

5.1.2. Tunnistus peptidiligandilla

Tutkimuksen toisessa osuudessa testattiin mahdollisuutta tunnistaa *B.a.*-itiöitä spesifisen peptidiligandin avulla. Ensiksi testattiin menetelmän spesifisyyttä sekä itiöiden inaktivoinnin vaikutusta tunnistustulokseen.

Kuvassa 5.9 olevassa kuvaajassa tarkastellaan peptidimäärän vaikutusta ilmanäytteessä olevien *Bacillus*-itiöiden värjäytymiseen. Kuvaajassa on esitetty värjäytyneiden partikkeleiden osuus kaikista näytteen partikkeleista suhteutettuna reaktioseoksen peptidi-

määrään. Näytteet sisälsivät inaktivoituja tai elinkykyisiä *B. anthracis* -itiöitä, elinkykyisiä *B. thuringiensis* -itiöitä tai pelkkää ilmanäytettä. Kuvaajassa olevat arvot on otettu virtaussytometrin mittauskanavien 60–120 kohdalta kuten edellä, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia vasta-ainetunnistuksesta saatujen tulosten kanssa. Kuvaajan arvot ovat keskiarvoja kolmesta rinnakkaisesta mittaussarjasta.



Kuva 5.9. *Bacillus*-itiöiden värjäytyminen eri peptidimäärillä

Kuvasta 5.9 nähdään, että peptidi tunnistaa elinkykyisiä *B.a.*-itiöitä hieman paremmin kuin inaktivoituja. Molemmissa tapauksissa paras tunnistustulos saatiin, kun reaktioseoksessa oli peptidiä 0,5–1,5 µg. Paras värjäytymisprosentti oli elinkykyisiä itiöitä sisältävässä näytteessä huomattavasti korkeampi kuin inaktivoiduilla itiöillä, mutta muilla peptidipitoisuuksilla inaktivoidut itiöt värjäytyivät enemmän kuin elinkykyiset. Tulokset siis ovat varsin vaihtelevia. Tämä johtuu siitä, että värjäytyneiden itiöiden osuus vaihteli suuresti rinnakkaisten mittausten välillä, ja siksi kuvaajassa olevat keskiarvot eivät ole täysin luotettavia. Tästä johtuen tulosten perusteella ei voida sanoa varmasti, kummalla näytteellä tunnistustulos on parempi.

Korkein värjäytymisprosentti on näytteellä, jossa on pelkkää ilmanäytettä. Värjäytymisprosentti ei kuitenkaan muutu peptidimäärän muuttuessa vaan säilyy koko ajan samalla tasolla (noin 50 %). Ilmanäytteen värjäytymisessä ei tapahdu muutosta edes silloin, kun näytteessä ei ole lainkaan peptidiä, mikä viittaa siihen, että tutkimuksessa käytetty väriaine kiinnittyy epäspesifisesti ilmanäytteen partikkeleihin.

Selkein peptidimäärästä riippuva vaihtelu värjäytymisprosentissa on kuvan 5.9 perusteella näytteessä, jossa on elinkykyisiä *B.a.*-itiöitä. Itiöiden värjäytyminen lisääntyy jonkin verran peptidipitoisuuden lisääntyessä, mutta laskee jälleen, kun

peptidipitoisuus kasvaa vielä suuremmaksi. Samanlainen vaihtelu näkyy myös näytteessä, jossa on inaktivoituja *B.a.*-itiöitä, mutta muutos ei ole yhtä selkeä.

Peptidin määrä vaikuttaa kuitenkin värjäytymiseen varsin vähän sekä elinkykyisillä että inaktivoiduilla itiöillä. Elinkykyisillä itiöillä muutos on selkeämpi, mutta alue, jolla värjäytyminen on tehokkainta, on melko pieni (noin 0,8–1,2 µg peptidiä). Tällä alueella peptidiä sisältävä näyte on kuitenkin selvästi erotettavissa nollanäytteestä, jossa ei ole peptidiä lainkaan. Inaktivoiduilla itiöillä tehokkaimman värjäytymisen alue on laajempi (noin 0,4–1,6 µg peptidiä), mutta värjäytymisprosentit ovat alhaisempia kuin elinkykyisillä itiöillä ja vaihtelua on enemmän. Tällöin itiönäytettä on vaikeampi erottaa nollanäytteestä.

Tunnistusmenetelmän spesifisyyttä testattiin näytteillä, joissa oli *B. anthracis* -itiöiden sijaan *B. thuringiensis* -itiöitä. Kuvassa 5.9 on esitetty tulokset myös tästä mittaussarjasta. Kuvasta nähdään, että peptidi ei tunnista *B.a.*-itiöitä täysin spesifisesti, vaan kiinnittyy lähes yhtä hyvin myös *B.t.*-itiöihin.

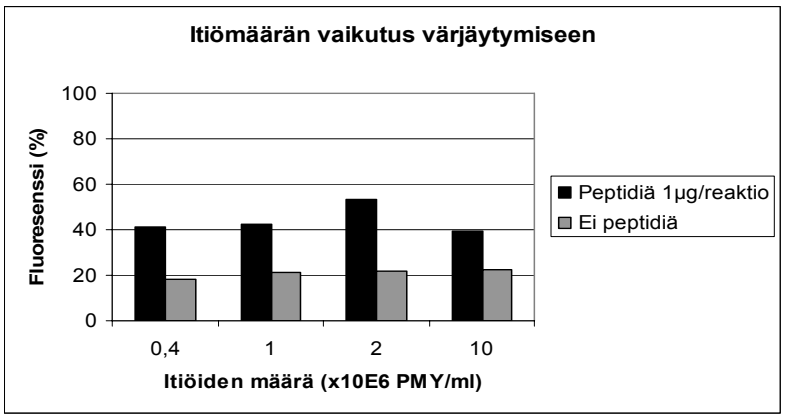
B.t.-näytteissä ei värjäytyneiden osuudessa kuitenkaan ole yhtä suurta peptidimäärän muutoksesta johtuvaa vaihtelua kuin *B.a.*-näytteissä. Lisäksi nollanäytteen värjäytymisprosentti on *B.t.*-näytteessä suurempi. *B.t.*-itiöihin siis todennäköisesti kiinnittyy enemmän streptavidiinikonjugoitua väriainetta epäspesifisesti kuin *B.a.*-itiöihin.

Myös näytteessä olevien itiöiden määrän havaittiin vaikuttavan tunnistustulokseen. Kuvassa 5.10 olevassa kuvaajassa on esitetty värjäytyneiden itiöiden osuus eri itiöpitoisuuksilla, kun reaktioseoksessa on 1 µg peptidiä. Kuvaajan arvot on saatu mittauksista, joissa on käytetty inaktivoituja *B.a.*-itiönäytteitä. Kuvaajan lukuarvot ovat keskiarvoja kolmesta erillisestä mittaussarjasta.

Kuvaajasta 5.10 nähdään, että paras tunnistustulos saatiin, kun itiöiden määrä ilmanäytteessä oli noin 2 x 10^6 PMY/ml. Tätä suuremmilla ja pienemmillä itiömäärillä värjäytyminen oli heikompaa.

Samalla testattiin myös pelkän streptavidiinikonjugoidun väriaineen epäspesifistä kiinnittymistä itiöihin ja sitä, onko itiömäärällä vaikutusta tämän fluoresoivan taustan muodostumiseen. Kuvassa 5.10 esitettyjen tulosten perusteella itiömäärällä ei ole vaikutusta fluoresoivan taustan tasoon, vaan väriainetta kiinnittyi itiöihin kaikissa

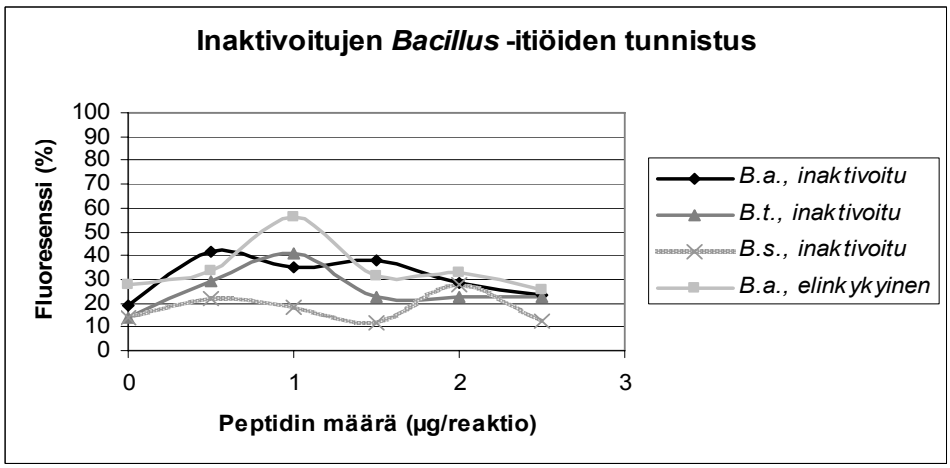
näytteissä samassa suhteessa. Väriaineen epäspesifisen kiinnittymisen ei myöskään havaittu vaikuttavan tunnistustulokseen, sillä värjäytymistaso oli kaikissa näytteissä huomattavasti alhaisempi, mikäli näytteeseen ei ollut lisätty peptidiä.



Kuva 5.10. Itiömäärän vaikutus värjäytymiseen

Lisäksi tutkimuksessa testattiin, onko ristireagointi muiden *Bacillus*-itiöiden kanssa yhtä voimakasta sekä inaktivoiduilla että elinkykyisillä itiöillä. Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri inaktivoitua *Bacillus*-itiötä sekä vertailun vuoksi myös elinkykyisiä *B. anthracis* -itiöitä. Testauksen tulokset on esitetty kuvassa 5.11.

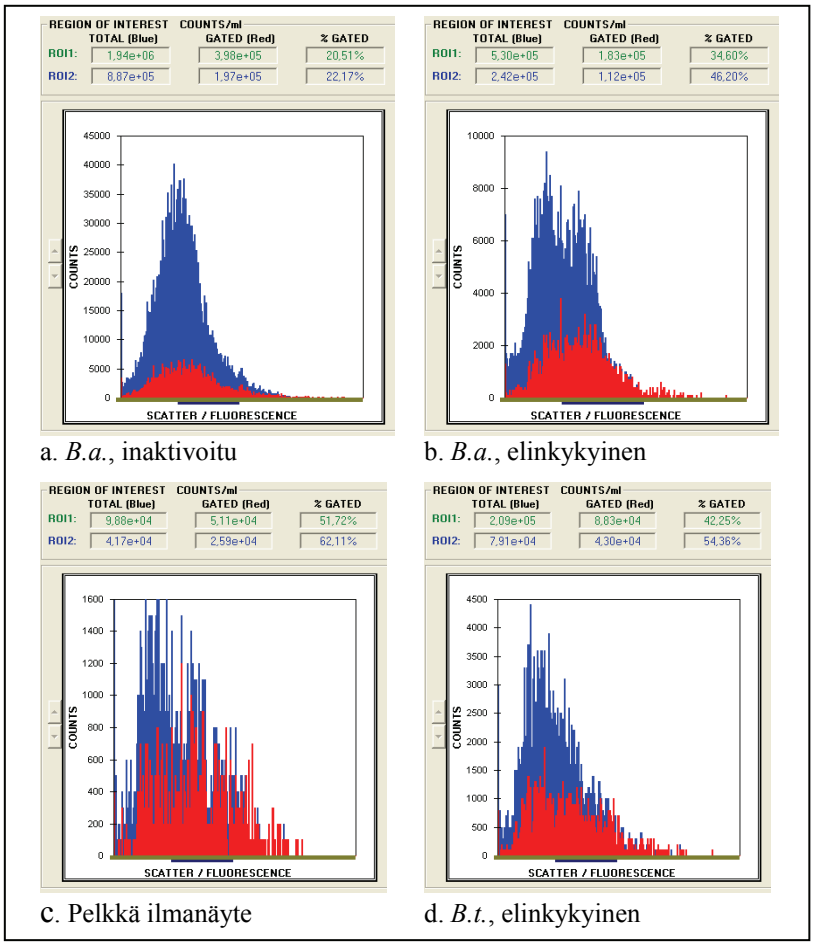
Peptidi kiinnittyi tässäkin tapauksessa epäspesifisesti *B. thuringiensis* -itiöihin, joilla tunnistustulos oli lähes yhtä hyvä kuin *B.a.*-itiöillä. Sen sijaan *B. subtilis* -itiöihin epäspesifistä kiinnittymistä ei tapahtunut.



Kuva 5.11. Inaktivoitujen itiöiden tunnistus

Tunnistuksen onnistumista voidaan arvioida myös vertailemalla eri näytteille virtaussytometrista saatuja histogrammikuvaajia. Kuvassa 5.12 on neljän eri näytteen histogrammit mittauksesta, jossa reaktioseoksessa oli 1 µg peptidiä.

Histogrammikuvaajista nähdään, että pelkkä ilmanäyte värjäytyy erittäin voimakkaasti, mikä aiheuttaa kaikkiin näytteisiin fluoresoivan taustan. Ilmanäyte on kuitenkin erotettavissa itiöitä sisältävästä näytteestä muotonsa perusteella, sillä itiönäytteissä on selvä värjäytymiskeskittymä tietyllä kokoalueella, kun taas ilmanäyte on hajautunut suuremmalle alueelle. Näytteiden erottelu kuvaajan ulkomuodon perusteella on kuitenkin mahdollista vain silloin, kun itiöiden osuus kaikista näytteen partikkeleista on suuri. Mikäli itiöitä on vain vähän, ne sekoittuvat ilmanäytteen aiheuttamaan taustaan, eikä kuvaajan ulkomuodossa ole muutosta.



a. *B.a.*, inaktivoitu

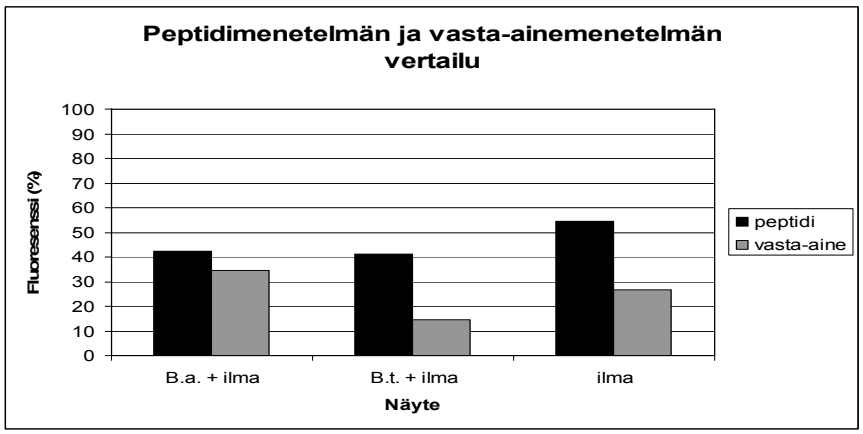
b. *B.a.*, elinkykyinen

c. Pelkkä ilmanäyte

d. *B.t.*, elinkykyinen

Kuva 5.12. Eri näytteiden värjäytyminen, 1µg peptidiä

Tutkimuksen perusteella peptidimenetelmä on ominaisuuksiltaan heikompi kuin vasta-ainemenetelmä. Kuvassa 6.1 on verrattu näytteiden värjäytymisprosentteja näillä kahdella menetelmällä. Kuvasta nähdään, että peptidimenetelmällä värjäytymisprosentit ovat korkeampia kuin vasta-ainemenetelmällä, mutta ero *B.a.*-näytteen ja toisen itiönäytteen tai *B.a.*-näytteen ja ilmanäytteen värjäytymisprosenteissa on varsin pieni. Vasta-ainemenetelmällä *B.a.*-näyte erottuu selkeämmin muista näytteistä.



Kuva 5.13. Peptidi- ja vasta-ainemenetelmien vertailu

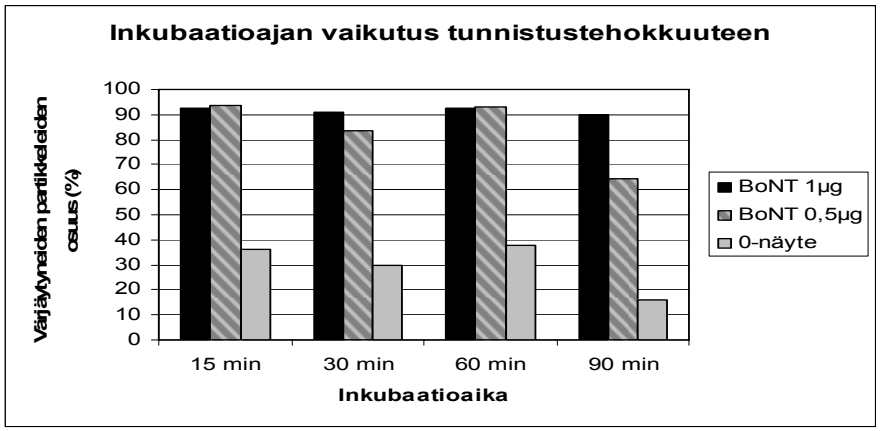
5.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen

5.2.1. Tunnistusmenetelmän testaus

Ensiksi tutkimuksessa testattiin alustavasti kunkin vasta-aineparin kykyä tunnistaa toksiinia puhtaasta näytteestä (näytteisiin ei ollut lisätty ilmanäytettä). Näissä mittauksissa reaktioseoksen koostumusta ei ollut vielä optimoitu, joten vasta-aineiden tunnistustehokkuus ei ollut paras mahdollinen. Alustavien mittausten tulokset kuitenkin osoittivat, että tunnistusta tapahtui jonkin verran ainakin vasta-aineparilla 1+4 (tuloksia ei ole esitetty). Tästä johtuen kyseistä vasta-aineparia päätettiin käyttää reaktio-olosuhteiden optimoinnissa.

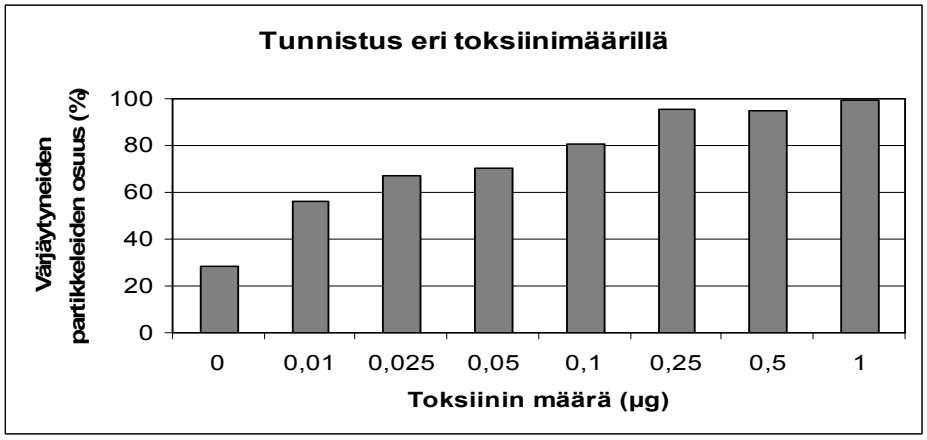
Kokeilemalla selvitettiin reaktioseoksen ihanteellista koostumusta. Paras tunnistustulos saatiin käyttämällä kappaleessa 4.5.2 esitettyä reaktioseosta. Mittauksissa, joissa testattiin botuliinitoksiinin tunnistusta ilmanäytteistä, käytettiin tätä reaktioseosta.

Seuraavaksi tarkasteltiin reaktion inkubaatioajan vaikutusta tunnistustulokseen. Mittaustulokset vaihtelivat varsin paljon inkubaatioajasta riippumatta, joten optimaa-lisinta inkubaatioaikaa ei voitu tarkasti määrittää. Paras mittaustulos saatiin kuitenkin yleensä 30–60 minuutin inkuboinnin jälkeen, ja loput mittauksista päätettiin tehdä 30 minuutin inkubaatiolla, jotta mittaustuloksia voitiin vertailla keskenään. Inkubaatioajan vaikutus tunnistussignaaliin on esitetty kuvan 5.14 pylväskuvaajassa. Kuvaajassa on esitetty fluoresoivien partikkeleiden osuus kaikista näytteen partikkeleista kolmessa eri näytteessä neljän inkubointiajan jälkeen.



Kuva 5.14. Inkubaatioajan vaikutus mittaustulokseen.

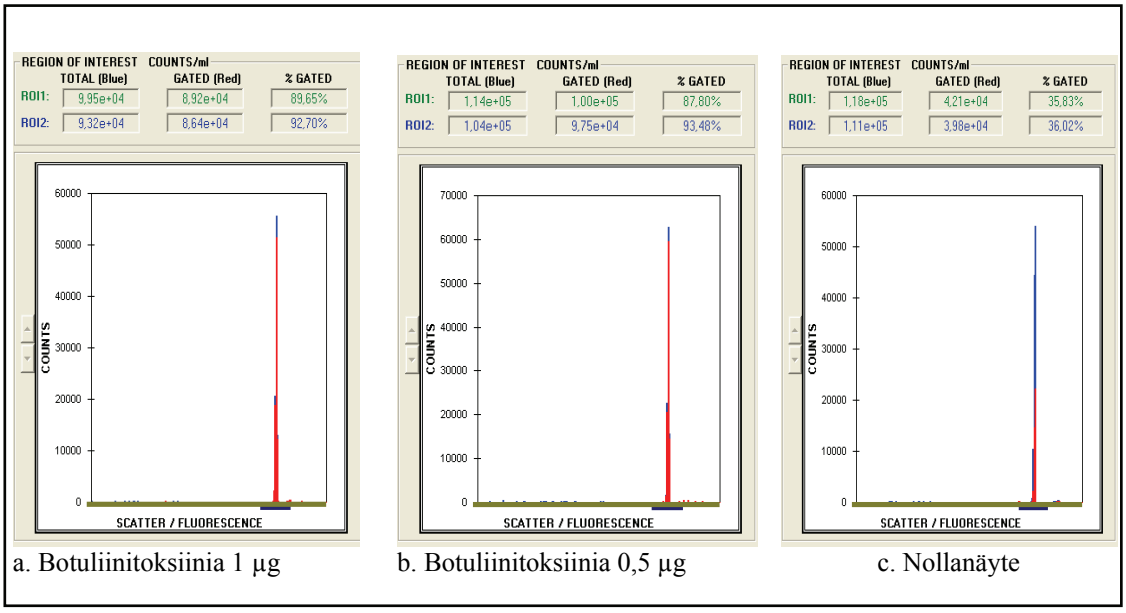
Lisäksi testattiin botuliinitoksiinin määrän vaikutusta tunnistussignaaliin. Myös tässä mittaussarjassa käytettiin valittua reaktioseoksen koostumusta sekä vasta-aineparia 1+4. 100 µl:aan reaktioseosta lisättiin 0–1 µg toksiinia, ja vasta-ainepitoisuudet pysyivät vakioina. Kuvaaja testin tuloksista on kuvassa 5.15. Kuvaajan arvot ovat fluoresoivien partikkeleiden osuuksia kaikista näytteen partikkeleista eri toksiinipitoisuuksilla. Arvot on otettu siltä virtaussytometrin histogrammikuvaajan alueelta, jolle polystyreenipartikkelit sijoittuvat (kanavat 175–205).



Kuva 5.15. Näytteen toksiinipitoisuuden vaikutus tunnistustulokseen

Kuvan 5.15 kuvaaja osoittaa, että värjäytyneiden partikkeleiden osuus kaikista partikkeleista kasvaa siirryttäessä suurempiin toksiinimääriin. Suurimmalla toksiinimäärällä lähes 100 % partikkeleista on värjäytynyt, kun taas pienimmällä toksiinimäärällä värjäytyneitä on vain hieman alle 60 %. Kuitenkin myös pienimmällä toksiinimäärällä saatu tulos on selvästi erotettavissa näytteestä, jossa ei ole lainkaan toksiinia (nollanäyte). Värjäytyneiden partikkeleiden osuus on kuitenkin varsin suuri myös nollanäytteessä (noin 30 %), mikä viittaa siihen, että vasta-aineet kiinnittyvät epäspesifisesti polystyreenipartikkelin pintaan.

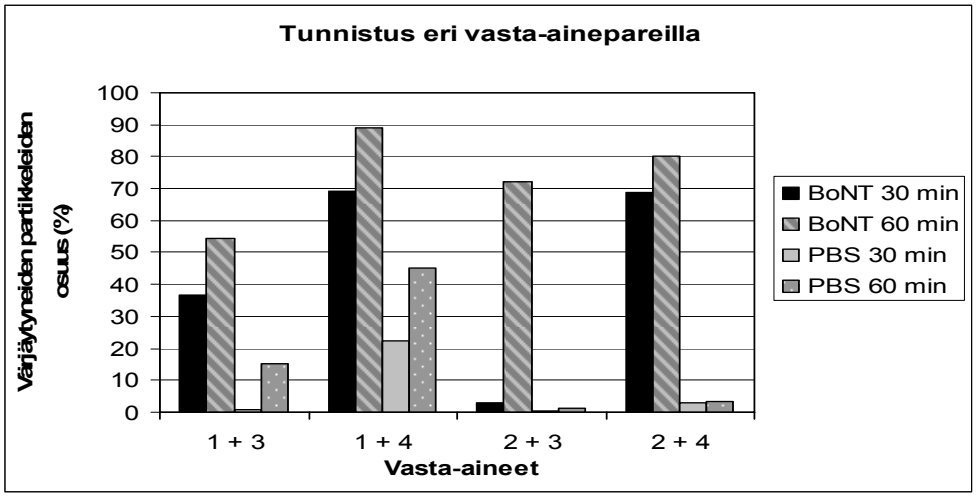
Toksiinia sisältävät näytteet erottuvat nollanäytteestä myös virtaussytometrin histogrammikuvaajan perusteella. Histogrammikuvaajassa fluoresoivat partikkelit näkyvät punaisella ja näytteen muut partikkelit sinisellä. Kuvassa 5.16 on kolme histogrammikuvaajaa: nollanäyte sekä kaksi toksiininäytettä. Kuvasta nähdään, että toksiinia sisältävien näytteiden histogrammit ovat väriltään lähes kokonaan punaisia, koska yli 90 % näytteessä olevista partikkeleista on fluoresoivia, mutta nollanäytteen kuvaajassa on paljon sinisiä alueita, koska vain pieni osa näytteen partikkeleista fluoresoi.



a. Botuliinitoksiinia 1 µg b. Botuliinitoksiinia 0,5 µg c. Nollanäyte

Kuva 5.16. Histogrammikuvaajat kolmesta tutkitusta näytteestä

Lopuksi testattiin kaikkien neljän vasta-aineparin tunnistustehokkuus optimoiduissa reaktio-olosuhteissa. Pylväskuvaaja testatuista vasta-ainepareista on kuvassa 5.17.



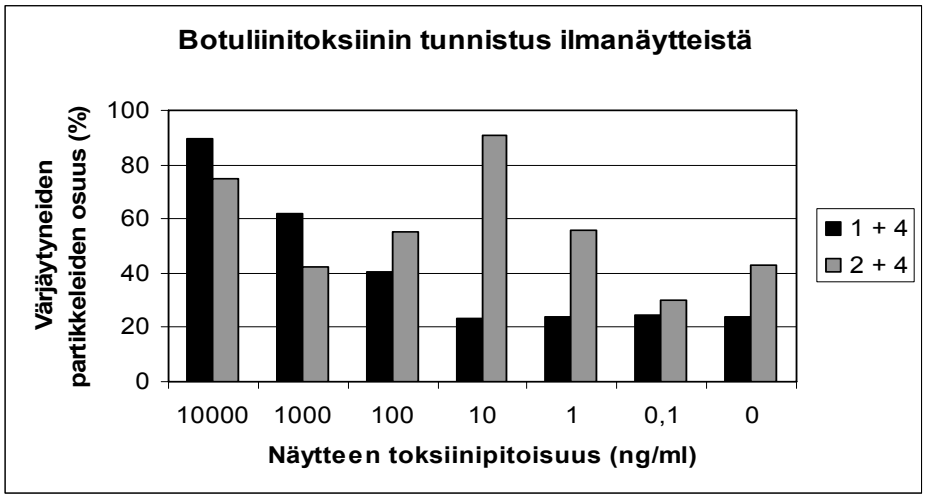
Kuva 5.17. Vasta-aineparien tunnistustehokkuus (0,5 µg botuliinitoksiinia)

Kuvasta nähdään, että tunnistus onnistuu kaikilla testatuilla vasta-ainepareilla. Korkein värjäytymisprosentti saadaan vasta-aineparilla 1+4, mutta näillä vasta-aineilla myös nollanäytteen epäspesifinen värjäytyminen on suurinta. Kuvaajan perusteella voidaan päätellä, että vasta-ainepari 2+4 olisi käyttökelpoisin, sillä siinä toksiininäytteiden värjäytyminen on varsin tehokasta ja nollanäytteen värjäytyminen vähäistä. Tällä vasta-aineparilla signaali kuitenkin vaihteli suuresti mittauksen eri vaiheissa ja rinnakkaisten mittausten välillä, joten tulos ei ole täysin luotettava ja vertailukelpoinen.

5.2.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen ilmanäytteestä

Tunnistusmenetelmän toimivuutta testattiin myös luonnollista näytettä simuloivilla testinäytteillä. Näytteissä botuliinitoksiini oli laimennettu veteen kerättyyn ilmanäytteeseen. Testinäytteiden toksiinipitoisuus oli 0–10 µg/ml. Jokaisesta näytteestä otettiin 50 µl tunnistusreaktioon, eli toksiinin määrä reaktiossa oli 0–0,5 µg. Toksiinin tunnistusta ilmanäytteistä testattiin kahdella eri vasta-aineparilla, pareilla 1+4 sekä 2+4.

Mittaustulokset on esitetty kuvassa 5.18. Kuvaajassa olevat arvot ovat fluoresoivien polystyreenipartikkeleiden osuuksia kaikista näytteen partikkeleista, ja ne on saatu virtaussytometrin histogrammikuvaajista partikkelipiikin kohdalta (kanavat 175–205). Kuvaajan arvot ovat keskiarvoja kahdesta rinnakkaisesta mittaussarjasta.



Kuva 5.18. Kahden vasta-aineparin tunnistustehokkuus

Kuvan 5.18 kuvaajan perusteella vasta-ainepari 1+4 toimii varsin tasaisesti, eli värjäytyneiden partikkeleiden osuus vähenee lineaarisesti toksiinipitoisuuden pienentyessä. Näiden tulosten avulla voidaan myös määrittää detektioraja botuliinitoksiinin

tunnistukselle ilmanäytteestä vasta-aineparilla 1+4. Detektioraja on saatujen tulosten perusteella noin 100 ng/ml (0,1 µg/ml).

Sen sijaan vasta-aineparin 2+4 tunnistussignaali vaihtelee suuresti tutkituilla toksiini- ja vasta-ainepitoisuuksilla. Vaihtelu johtuu mahdollisesti siitä, että reaktio-olosuhteet oli optimoitu vasta-aineparille 1+4 ja vasta-ainepari 2+4 vaatisi hieman erilaiset olosuhteet. Mittaustulosten vaihtelevuuden vuoksi ei vasta-aineparille 2+4 voida määrittää detektio-rajaa saatujen tulosten perusteella.

5.3. Immunokromatografiset pikatestit.

Sekä *B. anthracis* -itiöiden että botuliinitoksiinin tunnistuksessa testattiin myös immunokromatografisia pikatestiliuskoja. Tutkimuksessa käytetyt testit olivat kaupallisesti saatavilla olevia pikatestejä (Tetracore Inc.).

B.a.-itiöiden tunnistamiseen tarkoitettuja pikatestiliuskoja testattiin sekä elinkykyisillä että inaktivoiduilla *B. a.*-itiöillä. Botuliinitoksiinin tunnistamiseen tarkoitettuja pika-testiliuskoja testattiin samalla botuliinitoksiinivalmisteella, jota käytettiin virtaus-sytometriamenetelmän testauksessa. Myös näytteiden toksiinipitoisuudet olivat samoja.

B.a.-itiöitä tunnistavalla testillä saatiin heikko positiivinen tulos, kun näytteessä oli suuri pitoisuus elinkykyisiä itiöitä. Muilla testeillä tulos oli jokaisella testikerralla negatiivinen. Botuliinitoksiinilla positiivinen tulos saatiin suurimmalla toksiinipitoisuudella (10 µg/ml). Muilla pitoisuuksilla tulos oli negatiivinen. Tulos ei vastannut testien valmistajan ilmoittamaa detektiorajaa 10 ng/ml. Tulokset pikatestiliuskojen testauksesta ovat taulukoissa 5.1 ja 5.2.

Taulukko 5.1. Tulos *B. anthracis* -pikatestiliuskojen testauksesta

Näyte	*1 x 10^5 PMY/ml*	*2 x 10^7 PMY/ml*	*Inaktivoidut itiöt*
Testin tulos	-	(+)-	-

Taulukko 5.2. Tulos pikatestiliuskojen testauksesta

Näytteen toksiini-pitoisuus	*10 µg/ml*	*1 µg/ml*	*100 ng/ml*	*10 ng/ml*	*1 ng/ml*	*Nolla-näyte*
Testin Tulos	+	-	-	-	-	-

6. Pohdinta

6.1. Bacillus anthracis *-itiöiden tunnistaminen*

6.1.1. Vasta-ainetunnistus

Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan todeta, että vasta-aineen 4 avulla on mahdollista tunnistaa *Bacillus anthracis* -bakteerin itiöt tuntemattomasta ilmanäytteestä. Vasta-aine 3 sen sijaan ei näytä soveltuvan *B.a.*-itiöiden tunnistamiseen tutkimuksessa käytetyllä menetelmällä.

Vasta-aineella 3 ei voida erottaa *B.a.*-itiönäytteitä muista näytteistä, sillä värjäytymisprosentit jäävät alhaisiksi. Myöskään virtaussytometrin histogrammikuvaajissa ei ole havaittavissa samanlaista värjäytymispiikkiä kuin vasta-aineella 4, eikä värjäytymisen määrä vaihtele vasta-aineen määrän muuttuessa. Tutkimustuloksista päätellen vasta-aine 3 ei siis tunnista *B.a.*-itiöitä lainkaan, tai tunnistus on niin vähäistä, että sitä ei tällä menetelmällä voi havaita. Tunnistustulosta voisi mahdollisesti parantaa testaamalla useampia vasta-ainemääriä tai muuttamalla reaktio-olosuhteita muuten, esimerkiksi kokeilemalla eri puskuriliuoksia. Tutkimuksessa saatu tunnistustulos on kuitenkin niin heikko, että sitä ei välttämättä saataisi parannettua riittävästi, jotta menetelmää voitaisiin käyttää käytännön sovelluksissa. Näin ollen vasta-aineen 3 jatkokehitys ei todennäköisesti olisi kannattavaa.

Vasta-aine 4 sen sijaan erottaa *B.a.*-itiöt selkeästi muista tutkituista *Bacillus*-itiöistä. Tunnistus on myös helposti havaittavissa, sillä *B.a.*-itiönäytteiden värjäytymisprosentit vasta-aineella 4 ovat parhaimmillaan lähes kaksinkertaisia nollanäytteisiin sekä vasta-aineella 3 saatuihin tuloksiin nähden. *B.a.*-itiöiden tunnistuksen vasta-aineella 4 voi havaita tarkastelemalla ja vertaamalla itiöiden värjäytymisprosentteja koko mittausalueella sekä histogrammikuvaajissa olevan *B.a.*-värjäytymispiikin kohdalla (mittauskanavat 60–120). Mikäli värjäytyneiden itiöiden osuus on erityisen suuri piikin alueella, voidaan näytteessä olettaa olevan *B.a.*-itiöitä.

Värjäytymisprosentteja tarkastelemalla ei kuitenkaan voida täysin varmasti tunnistaa *B.a.*-itiöitä tuntemattomasta näytteestä, sillä näytteen itiöpitoisuus vaikuttaa voimakkaasti tulokseen. Tunnistus on hankalaa erityisesti pienillä itiöpitoisuuksilla, koska silloin näytteen fluoresoiva tausta häiritsee tunnistusta. Värjäytymisprosentit ovat

nimittäin varsin suuria myös pelkässä ilmanäytteessä, koska vasta-aine ja fluoresoiva väriaine kiinnittyvät epäspesifisesti ilmanäytteen partikkeleihin. Itiöitä sisältävän näytteen erottaminen pelkästä ilmanäytteestä ei ole tällöin mahdollista, sillä niiden värjäytymisprosentit voivat olla samaa suuruusluokkaa. Yleensä *B.a.*-itiönäyte voidaan kuitenkin erottaa ilmanäytteestä, koska siinä värjäytyminen on voimakkaampaa värjäytymispiikin alueella kuin muissa mittausalueen osissa, kun taas ilmanäyte värjäytyy tasaisesti koko mittausalueella.

Vasta-aineen 4 toimivuus on värjäytymisprosentteja helpommin nähtävissä virtaussytometrilla saatujen kuvaajien ulkomuodosta, eli joko histogrammikuvaajan värjäytymispiikistä tai pisteparvikuvaajan pistekeskittymästä. Nämä kuvaajien ominaisuudet tarkoittavat sitä, että tutkitun näytteen partikkeleista tietyn kokoiset ovat värjäytyneet erityisen voimakkaasti. Tällaista värjäytymisen keskittymistä tietylle kokoalueelle ei ole havaittavissa muissa kuin *B.a.*-näytteiden kuvaajissa, vaan nollanäytteissä sekä muita itiöitä sisältävissä näytteissä värjäytyminen jakautuu virtaussytometrin koko mittausalueelle. Lisäksi varsinkin histogrammikuvaajan värjäytymispiikin sijainnista voi päätellä, että voimakkaasti värjäytyneet partikkelit ovat juuri itiöitä, sillä piikki on alueella 0,5–1 µm, mikä vahvistaa tunnistustuloksen luotettavuutta.

Värjäytymispiikin ja pisteparvikuvaajan pistekeskittymän erottuminen virtaussytometrin kuvaajista riippuu kuitenkin varsin paljon näytteessä olevien itiöiden määrästä, aivan kuten edellä mainittu värjäytymisprosenttikin. Mikäli näytteessä on vain vähän itiöitä, niiden fluoresenssisignaali sekoittuu näytteen fluoresoivaan taustaan, eikä näyte näin ollen ole tunnistettavissa. Jos näytteessä taas on erittäin paljon itiöitä, vasta-ainetta on suhteessa vähemmän, ja silloin myös väriainetta tarttuu itiöihin vähemmän ja fluoresenssin intensiteetti jää pienemmäksi. Myöskään tällöin signaali ei ole selvästi havaittavissa.

B.a.-itiöiden tunnistaminen tuntemattomasta näytteestä onnistuu siis varmasti vain, mikäli näytteen itiömäärä on sopivalla alueella. Histogrammikuvaajien perusteella tunnistettaessa paras tulos saadaan, kun itiöitä on noin $5 \times 10^5 – 1 \times 10^6$ PMY/ml, mutta pisteparvikuvaajissa näytteen itiöpitoisuuden pitää olla vielä suurempi (noin $9 \times 10^5 – 4 \times 10^6$ PMY/ml). Itiömäärän tarkat rajat heikentävät tunnistusmenetelmän käytettävyyttä, sillä tuntemattoman näytteen itiömäärää ei voi tietää varmasti. On siis varsin todennä-

köistä, että näytteen itiöpitoisuus ei ole halutulla alueella ja tunnistus ei onnistu. Tunnistuksen onnistumisen kannalta on kuitenkin hyvä, että histogrammi- ja pisteparvikuvaajille optimaalisimmat itiöpitoisuudet eivät ole täysin samat, sillä näin on mahdollista tunnistaa näyte toisesta kuvaajasta, vaikka signaali ei olisi toisessa kuvaajassa havaittavissa.

B.a.-itiöiden tunnistaminen kuvaajan ulkomuodon perusteella on varmempaa kuin värjäytymisprosenttien perusteella tehtävä tunnistus. Tämä johtuu siitä, että värjäytymisprosentit voivat olla samalla tasolla sekä pelkkää ilmaa sisältävässä näytteessä että B.a.-itiönäytteessä, mikäli näytteessä on vain vähän itiöitä. Värjäytymispiikki tai pisteparvikuvaajan pistekeskittymä voivat kuitenkin olla havaittavissa myös tällaisessa tilanteessa.

Mikäli halutaan saada mahdollisimman varma tunnistustulos tuntemattomasta näytteestä, on paras tarkastella sekä itiöiden värjäytymisprosentteja että kuvaajien ulkomuotoa. Näytteessä voidaan olettaa olevan *B.a.*-itiöitä, mikäli histogrammikuvaajassa näkyy värjäytymispiikki kanavien 60–120 alueella tai pisteparvikuvaajassa näkyy selkeä pistekeskittymä. Lisäksi värjäytymisprosentin tulee olla värjäytymispiikin alueella suurempi kuin koko mittausalueella määritetty värjäytymisprosentti. Suuruudeltaan värjäytymisprosentin pitää olla noin 30 % tai enemmän, jotta se olisi suurempi kuin fluoresoivan taustan aiheuttama värjäytymisprosentti pelkässä ilmanäytteessä.

Tutkimuksessa havaittiin, että värjäytymistulos muuttuu vasta-aineen määrän muuttuessa. Paras tunnistustulos saadaan, kun reaktioseoksessa on noin 1 µg vasta-ainetta. Tunnistustulosta voitaisiin saada vielä paremmaksi ja selvemmäksi lisäämällä vasta-aineen määrää edelleen. Tämän testaaminen ei kuitenkaan ollut tässä tutkimuksessa mahdollista, koska käytettävissä olleen vasta-aineen määrä oli rajallinen. Vasta-aineen vähäinen määrä johtui vasta-aineiden biotinylointiin käytetyn biotinylointikitin pienestä saannosta. Tästä johtuen vain pieni osa vasta-aineesta saatiin biotinyloitua tutkimuskäyttöön. Tutkimusta voitaisiin tehostaa etsimällä toinen biotinylointikeino tai kokonaan erilainen tapa saada vasta-aineet fluoresoiviksi. Mahdollisia uusia värjäyskeinoja pitäisi selvittää tutkimalla ja kokeilemalla eri vaihtoehtoja, jotta löytyisi menetelmä, jolla värjäytyminen olisi tehokasta ja epäspesifinen värjäytyminen mahdollisimman vähäistä. Lisäksi menetelmän käytäntöön soveltamisen kannalta olisi

hyvä, että värjäysmenetelmä olisi helppokäyttöinen sekä toteuttamiskelpoinen vaihtelevissa olosuhteissa. Jotta käytännön sovelluksen kehittäminen olisi kannattavaa, värjäysmenetelmän tulisi myös olla edullinen.

Tutkimuksessa saavutettu *B.a.*-itiöiden tunnistustulos oli huomattavasti parempi kuin immunokromatografisilla pikatestiliuskoilla saatu tulos. Pikatestiliuskat eivät tunnistaneen *B.a.*-itiöitä juuri lainkaan. Ainoastaan erittäin suurella itiömäärällä (2×10^7 PMY/ml) saatiin heikko positiivinen tulos, vaikka valmistaja ilmoittaa detektiorajaksi 1×10^5 PMY/ml (Anthrax BioThreat alert Test Strip Specification Sheet, Tetracore Inc., 2002). Virtaussytometriaan perustuvalla menetelmällä tunnistus onnistuu jo näytteestä, jossa on 5×10^5 PMY/ml. Pikatestin huono tunnistusherkkyys saattaa johtua siitä, että tutkimuksessa käytetty itiösuspensio ei reagoi testin vasta-aineiden kanssa. Asiaa voitaisiin tutkia testaamalla sekä pikatestiliuskoja että virtaussytometriamenetelmää erilaisilla *B.a.*-bakteerikannoilla.

Mikäli virtaussytometriaan perustuvaa tunnistusmenetelmää pyritään kehittämään mahdollisimman tehokkaaksi ja käyttökelpoiseksi, tutkimusta pitää jatkaa edelleen. Tällaisenaan vasta-aineen tehokkuus ei todennäköisesti riitä käyttöominaisuuksiltaan kilpailukykyisen käytännön sovelluksen valmistamiseen. Lisämittauksilla olisi mahdollista selvittää, millä vasta-ainepitoisuudella tunnistustulos olisi paras mahdollinen, eli milloin värjäytyneiden itiöiden osuus olisi mahdollisimman suuri. Mikäli tunnistuksen tehokkuutta saataisiin paremmaksi, näytteen itiömäärässä voisi olla enemmän vaihtelua ja tunnistus tuntemattomasta näytteestä olisi mahdollista. Lisäksi on tärkeä selvittää, voisiko vasta-aineiden leimaamiseen käyttää jotain muuta menetelmää tai onko biotinylointia mahdollista tehostaa, jotta tunnistusmenetelmässä kuluisi vähemmän vasta-ainetta. Tällöin menetelmän käyttö ja soveltaminen olisi taloudellisesti kannattavampaa, sillä vasta-aineet ovat varsin kalliita.

Alustavien tutkimusten perusteella vasta-ainetunnistukseen perustuvan menetelmän tutkimusta ja kehittämistä siis kannattaa jatkaa, koska ainakin vasta-aine 4 tunnistaa *B.a.*-itiöitä. On mahdollista, että myös muut vasta-aineet toimivat tässä tunnistusmenetelmässä. Tästä syystä tutkimusta kannattaisi laajentaa kartoittamalla enemmän mahdollisesti käyttökelpoisia vasta-aineita. Vasta-ainevalikoimaa laajentamalla ja menetelmän ominaisuuksia kehittämällä virtaussytometrian avulla tapahtuvasta vasta-ainetunnistuksesta voidaan saada varteenotettava vaihtoehto nykyisin käytössä oleville

B.a.-itiöiden tunnistusmenetelmille. Virtaussytometriamenetelmää voitaisiin tulevaisuudessa kehittää myös yhdistämällä näytteenotto ja analysointi, jolloin tunnistus onnistuisi suoraan ilmasta.

6.1.2. Tunnistus peptidiligandilla

Testattu peptidiligandi ei tutkimuksen perusteella sovellu kovin hyvin *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistamiseen ilmanäytteistä. Peptidiligandi kiinnittyy jonkin verran *B.a.*-itiöihin, mutta sen lisäksi sekä itiöt että ilmanäytteissä olevat muut partikkelit värjäytyvät menetelmässä epäspesifisesti.

Itiönäytteitä ei histogrammikuvaajista saatujen värjäytymisprosenttien perusteella voi erottaa pelkästä ilmanäytteestä, sillä myös ilmanäytteet värjäytyvät erittäin voimakkaasti. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että ilmanäytteen partikkelipitoisuus on paljon pienempi kuin itiönäytteiden, ja siksi fluoresoiva tausta tulee selvemmin esiin.

Fluoresoiva tausta aiheutuu ilmanäytteessä olevien partikkeleiden epäspesifisestä värjäytymisestä. Epäspesifinen värjäytyminen saattaa johtua peptidin epäspesifisyydestä, mutta todennäköisesti suurin syy siihen on tutkimuksessa käytetty streptavidiiniin liitetty väriaine. Streptavidiinin osuus epäspesifisessä värjäytymisessä voidaan nähdä ilmanäytteen värjäytymisestä eri peptidipitoisuuksilla. Ilmanäytteen värjäytymisprosentti ei juuri muutu peptidin määrän muuttuessa ja on jopa hieman korkeampi näytteessä, jossa ei ole peptidiä lainkaan. Tämä viittaa siihen, että peptidillä ei ole vaikutusta värjäytymiseen, vaan signaali aiheutuu lähinnä pelkästä väriaineesta. Voimakas fluoresoiva tausta hankaloittaa menetelmän soveltamista käytäntöön, sillä itiöitä sisältäviä näytteitä ei voida erottaa puhtaasta ilmanäytteestä värjäytymisprosenttien avulla.

Itiönäyte on kuitenkin erotettavissa ilmanäytteestä virtaussytometrin histogrammikuvaajan avulla, sillä kuvaajien ulkomuodot poikkeavat selvästi toisistaan. Ilmanäytteen kuvaajassa ei ole havaittavissa selkeää muotoa eikä värjäytymiskeskittymää yhdellä alueella, toisin kuin itiönäytteissä. Itiönäytteiden värjäytyminen on kuitenkin niin heikkoa, että värjäytymiskeskittymä on varsin vaikeasti havaittavissa. Lisäksi värjäytyminen riippuu melko paljon näytteessä olevien itiöiden määrästä. Näytteessä pitää olla suhteellisen runsaasti itiöitä (noin 2×10^6 PMY/ml), eikä itiömäärässä voi olla kovin paljon vaihtelua, jotta tunnistus onnistuu. Aivan kuten vasta-ainemenetelmässäkin, myös tässä menetelmän soveltamista käytäntöön vaikeuttaa siis näytteen itiömäärän rajallisuus,

koska tuntemattomassa näytteessä mahdollisesti olevien itiöiden määrää ei voida tietää varmasti.

B.a.-itiöiden tunnistusta peptidiligandilla häiritsee epäspesifisen väriaineen kiinnittymisen sekä itiömäärän rajallisuuden lisäksi myös peptidin kiinnittymisessä havaittu epäspesifisyys. Värjäytyminen on nimittäin yhtä voimakasta sekä *B. anthracis*- että *B. thuringiensis* -itiöillä. Tästä johtuen peptidiliganditunnistusta ei ainakaan tällaisena menetelmänä voi käyttää *B.a.*-itiöiden spesifiseen tunnistukseen. Ristireagointia ei kuitenkaan havaittu *B. subtilis* -itiöihin, joten ristireagointia ei tapahdu kaikkiin *Bacillus*-suvun bakteereihin eikä näin ollen todennäköisesti myöskään muihin bakteerityyppeihin. Ristireagoinnin tarkempi selvittäminen vaatisi lisää tutkimusta useammilla eri bakteereilla.

Tutkimuksen perusteella peptidimenetelmä on ominaisuuksiltaan heikompi kuin vasta-ainemenetelmä. Peptidimenetelmällä itiöiden värjäytymisprosentit ovat korkeampia kuin vasta-ainemenetelmällä, mutta *B.a.*-näyte ei erotu muista näytteistä, koska myös *B.t.*-näyte sekä ilmanäyte värjäytyvät erittäin voimakkaasti. Vasta-ainemenetelmällä *B.a.*-näyte erottuu selkeämmin muista näytteistä, vaikka värjäytymisprosentit eivät olekaan kovin korkeita.

Peptidiligandimenetelmä ei siis tällaisena ole helposti sovellettavissa *Bacillus anthracis* -itiöiden tunnistukseen. Vaikka peptidiligandi tunnistaa itiöitä jonkin verran, sen tunnistustehokkuus on kuitenkin niin heikko, ettei se todennäköisesti riitä käytännön sovelluksiin. Lisäksi menetelmän soveltamista käytäntöön haittaa voimakas ristireagointi. Menetelmänä peptidiligandi olisi kuitenkin erittäin käyttökelpoinen itiöiden tunnistukseen virtaussytometrilla. Peptidit ovat edullisia ja helppoja tuottaa sekä käsitellä, joten menetelmä olisi nopeampi ja edullisempi kuin monet nykyisin virtaussytometriassa käytössä olevista leimausmenetelmistä. Nykyiset menetelmät perustuvat usein nukleiinihappokoettimiin tai vasta-aineisiin, jotka molemmat ovat varsin vaikeita ja kalliita tuottaa. Tässä tutkimuksessa käytetty peptidiligandi ei vaikuta kehityskelpoiselta, mutta tutkimusta kannattaisi jatkaa testaamalla muita vastaavia peptidiligandeja.

6.2. Botuliinitoksiinin tunnistaminen

Tutkimuksessa testattu vasta-ainetunnistukseen perustuva menetelmä on erittäin käyttökelpoinen botuliinitoksiinin tunnistamisessa tuntemattomasta ilmanäytteestä. Tutkimus-

tulosten perusteella erityisesti yksi neljästä testatusta vasta-aineparista tunnistaa erittäin hyvin botuliinitoksiinia, ja lisäksi menetelmän spesifisyys ja detektioraja näyttävät olevan yhtä hyviä kuin nykyisin käytössä olevissa menetelmissä.

Kaikki testatut vasta-aineparit tunnistavat botuliinitoksiinia tutkimuksessa käytetyllä virtaussytometriamenetelmällä. Parhaiten tunnistus onnistuu vasta-aineparilla 1+4. Tällä vasta-aineparilla reaktio-olosuhteet saatiin optimoitua siten, että tunnistus onnistui ja epäspesifistä vasta-aineiden sitoutumista polystyreenipartikkeleihin tapahtui varsin vähän. Polystyreenipartikkeleiden värjäytyminen on toksiinia sisältävissä näytteissä erittäin voimakasta, ja lisäksi toksiininäytteiden ja nollanäytteen välillä on huomattava ero värjäytymisen määrässä. Tästä voidaan päätellä, että vasta-aineet tunnistavat näytteessä olevan toksiinin eivätkä juuri kiinnity epäspesifisesti nollanäytteessä oleviin ilmanäytteen partikkeleihin. Polystyreenipartikkeleiden värjäytyminen on erityisen voimakasta suurilla toksiinipitoisuuksilla, jolloin värjäytymisprosentti on parhaimmillaan lähes 100 %. Ero toksiininäytteen ja nollanäytteen välillä voidaan havaita selvästi vielä näytteestä, joka sisältää toksiinia 100 ng/ml. Tällä toksiinipitoisuudella toksiininäytteiden värjäytyminen on kaksinkertaista pelkkään ilmanäytteeseen verrattuna, eli positiivinen tunnistustulos on selkeä.

Menetelmälle määritettiin detektiorajaksi noin 0,1 µg/ml (100 ng/ml) käytettäessä vasta-aineparia 1+4. Raja on todennäköisesti hieman tätä alhaisempi, mutta tarkan rajan selvittämiseksi tutkimusta pitäisi jatkaa ja tehdä tarkempi titraus eri toksiinimäärillä. Tutkimuksessa saavutettu detektioraja on huomattavasti parempi kuin samalla toksiinivalmisteella määritetty detektioraja kaupallisille immunokromatografisille pikatestiliuskoille (Tetracore Inc.). Pikatestiliuskalla positiivinen tunnistustulos saatiin ainoastaan näytteellä, jossa oli 10 µg/ml toksiinia. Pikatestiliuskojen valmistaja kuitenkin ilmoittaa testin detektiorajaksi 10 ng/ml (Bot Tox BioThreat alert Test Strip Specification Sheet, Tetracore Inc., 2002). Syynä pikatestin heikkoon tunnistusherkkyyteen tässä tutkimuksessa voi olla esimerkiksi testiagenssina käytetty puhdistettu toksiini. Paremman tunnistustuloksen voisi saada jollain muulla toksiinivalmisteella. Sen selvittämiseksi pitäisi molempia menetelmiä testata useammilla testiagensseilla.

Tutkitussa botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmässä tapahtuu hieman epäspesifistä polystyreenipartikkeleiden värjäytymistä, sillä värjäytyneiden partikkeleiden osuus on varsin suuri myös ilmanäytteessä (noin 30 %). Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että värjätyt

vasta-aineet kiinnittyvät suoraan polystyreenipartikkelin pintaan. Epäspesifistä kiinnittymistä voidaan mahdollisesti vähentää kehittämällä reaktio-olosuhteita edelleen. Reaktio-olosuhteita voitaisiin optimoida esimerkiksi kokeilemalla erilaisia polystyreenipartikkeleiden blokkauskeinoja, joilla vähennetään epäspesifisiä kiinnittymiskohtia. Toinen mahdollisuus menetelmän spesifisyyden parantamiseksi on lisätä polystyreenipartikkeleiden pesuja reaktion eri vaiheissa. Tällöin epäspesifisesti kiinnittyneet vasta-aineet voisivat irrota partikkelista, koska niiden kiinnittyminen ei ole yhtä voimakasta kuin spesifisesti kiinnittyneiden vasta-aineiden. Reaktion tehokkuutta voitaisiin saada paremmaksi myös erilaisella puskuriliuoksella tai eri vasta-ainepitoisuuksilla.

Myös vasta-ainepari 2+4 vaikutti osassa mittauksista toimivan varsin hyvin, mutta tällä vasta-aineparilla tunnistussignaali vaihteli suuresti tutkituilla toksiini- ja vasta-ainepitoisuuksilla. Värjäytyneiden polystyreenipartikkeleiden määrässä oli merkittävää vaihtelua rinnakkaisten mittausten välillä sekä reaktion eri vaiheissa, eli saadut tulokset eivät olleet täysin vertailukelpoisia. Tämä viittaa siihen, että reaktio-olosuhteet eivät sovi kyseisille vasta-aineille. Reaktio-olosuhteet optimoitiin vasta-aineparille 1+4, ja vasta-ainepari 2+4 vaatisi mahdollisesti hieman erilaiset olosuhteet. Tunnistuksen onnistumista voitaisiin parantaa muuttamalla reaktioseoksen komponenttien konsentraatioita, erityisesti vasta-aineiden konsentraatioita, tai pesemällä polystyreenipartikkeleita runsaammin reaktion eri vaiheissa. Tunnistus vasta-aineparilla 2+4 voisi siis tehostua, mikäli myös sille määritettäisiin tarkemmin oikeat reaktio-olosuhteet.

Tulosten vaihtelevuuden vuoksi vasta-aineparille 2+4 ei voida määrittää detektiorajaa saatujen tulosten perusteella. Vasta-ainepari 2+4 vaikuttaa tutkimustulosten perusteella kuitenkin erittäin käyttökelpoiselta ja jopa paremmalta kuin vasta-ainepari 1+4. Vasta-aineilla 2+4 tapahtuu nimittäin erittäin vähän ilmanäytteen epäspesifistä värjäytymistä, mikä helpottaa tunnistustuloksen havaitsemista erityisesti silloin, kun näytteessä on vain vähän toksiinia. Mikäli reaktio-olosuhteet saataisiin optimoitua vasta-aineparille 2+4 sopiviksi, sen avulla voitaisiin mahdollisesti saada menetelmän tunnistusherkkyys (detektioraja) paremmaksi kuin vasta-aineparilla 1+4.

Virtaussytometrilla saatujen tulosten perusteella testatut vasta-aineparit siis näyttävät toimivan hyvin botuliinitoksiinin tunnistuksessa. Mikäli menetelmää halutaan kehittää edelleen, esimerkiksi mahdollista käytännön sovellusta varten, sen ominaisuuksia pitää testata tarkemmin. Tässä tutkimuksessa testiagenssina käytettiin ainoastaan kaupallista,

puhdistettua botuliinitoksiinia. Botuliinitoksiini esiintyy luonnossa kuitenkin kompleksoituneena muiden proteiinien kanssa (Bigalke & Shoer, 2000). Tästä johtuen on todennäköistä, että mikäli toksiinia käytettäisiin taisteluaineena, kyseessä olisi tämä kompleksinen muoto tai toksinen bakteerikasvusto. Siksi menetelmää pitäisi jatkotutkimuksissa testata sekä kompleksimuotoisella toksiinilla että toksisella bakteerikasvustolla, jotta sen soveltuvuus käytäntöön voitaisiin varmistaa.

Lisäksi reaktio-olosuhteita pitäisi kehittää yhä paremmiksi sekä vasta-aineparille 1+4 että parille 2+4. Molemmat vasta-aineparit vaikuttavat tehokkailta, joten tutkimuksessa olisi syytä testata tarkasti, millaisilla vasta-ainepitoisuuksilla tunnistus on tehokkainta sekä millaisissa reaktio-olosuhteissa tunnistus onnistuu parhaiten. Tunnistuksen onnistumiseen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi polystyreenipartikkeleiden peseminen, puskuriliuokset sekä reaktioaika.

Tunnistusmenetelmään liittyvää tutkimusta kannattaa lisäksi laajentaa botuliinitoksiinin lisäksi myös muihin mahdollisesti biologisina taisteluaineina käytettäviin toksiineihin (esimerkiksi risiinitoksiiniin tai *Staphylococcus aureus* -bakteerin enterotoksiini B:hen). Näin voitaisiin tunnistaa useampia toksiineja samanaikaisesti, ja menetelmällä olisi laajemmat käyttömahdollisuudet. Nykyisin käytössä olevilla menetelmillä (esimerkiksi immunokromatografisilla pikatesteillä) on usein mahdollista tunnistaa ainoastaan yksi agenssi.

Tutkimuksessa kehitetty botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmä näyttää olevan erittäin toimiva ja käyttökelpoinen, ja jatkotutkimuksia sen kehittämiseksi kannattaa tehdä. Tunnistusmenetelmä on varsin helppokäyttöinen ja nopea, ja tulokset ovat nähtävissä selkeästi heti virtaussytometrin kuvaajista. Tulevaisuudessa menetelmä voitaisiin automatisoida kehittämällä virtaussytometrin yhteyteen ohjelmisto, joka analysoi virtaussytometrin keräämän tiedon ja ilmoittaa positiivisesta tunnistustuloksesta. Lisäksi virtaussytometri voitaisiin liittää ilmankeräyslaitteistoon, jolloin tunnistustulos saataisiin suoraan ilmasta. Tällöin virtaussytometriaan perustuvan tunnistusmenetelmän pohjalta voitaisiin rakentaa täysin automatisoitu toksiinien havaitsemis- ja tunnistuslaitteisto.

7. Johtopäätökset

Virtaussytometria on erittäin käytännöllinen menetelmä bioaerosolien tunnistamisessa. Menetelmä on helppokäyttöinen ja nopea, ja lisäksi tulokset ovat helposti nähtävissä. Virtaussytometriaan on mahdollista yhdistää useita erilaisia tunnistuskoettimien avulla tapahtuvia tunnistusmenetelmiä. Tämän tutkimuksen perusteella erityisesti vasta-aineet ovat toimivia tunnistuskoettimia, sillä ne ovat tehokkaita ja spesifisiä, ja tekniikka on helposti yhdistettävissä virtaussytometriaan. Koettimet on helppo värjätä avidiini-biotiini-tekniikan avulla, mutta myös muita värjäystekniikoita kannattaisi tutkia, mikäli menetelmän kehitystyötä jatketaan.

Tämän tutkimuksen yhteydessä testatuista *Bacillus anthracis* -itiöiden vasta-aineista toinen vaikutti toimivalta ja tehokkaalta. Testatun vasta-aineen 4 tunnistustehokkuus oli varsin hyvä, joten sen tutkimista ja kehittämistä kannattaa jatkaa joko tämän tai jonkin muun tunnistusmenetelmän kehitystyön yhteydessä. Sen sijaan vasta-aine 3 ei tunnistanut itiöitä kovin hyvin, joten siihen liittyvien tutkimusten jatkaminen ei välttämättä ole kannattavaa.

Tutkimuksessa testattu peptidiligandi ei osoittautunut käyttökelpoiseksi tunnistus-koettimeksi virtaussytometriaan perustuvassa tunnistusmenetelmässä. Tutkimuksessa käytettyyn peptidiligandiin liittyvää tutkimustyötä ei ole aiheellista jatkaa, mutta menetelmänä peptidiliganditunnistus voi tulevaisuudessa olla varteenotettava vaihtoehto, mikäli löytyy uusia käyttökelpoisia peptidikoettimia.

Polystyreenipartikkeleiden hyödyntäminen toksiinitunnistuksessa on lupaava tekniikka, jota on tutkittu vielä varsin vähän. Tässä tutkimuksessa saadut tulokset viittaavat siihen, että menetelmästä voitaisiin kehittää toimiva sovellus toksiinien tunnistamiseksi. Tutkimuksessa kehitetty botuliinitoksiinin tunnistusmenetelmä osoittautui tehokkaaksi ja spesifiseksi, ja lisäksi se on helppokäyttöinen ja nopea. Alustavien tulosten perusteella ei voida sanoa varmasti, olisiko menetelmä sovellettavissa käytäntöön, mutta lupaavista tuloksista johtuen jatkotutkimuksia kannattaa tehdä.

8. Lähdeluettelo

Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. Clinical Microbiology Reviews 2000;13(2):167–195.

Andreotti PE, Ludwig GV, Peruski AH, Tuite JJ, Morse SS, Peruski LF. Immunoassay of infectious agents. Rapid Detection and Identification of Infectious Disease Agents. BioTechniques 2003;35:850–859.

Anthrax BioThreat alert Test Strip Specification Sheet, Tetracore Inc., Gaithersburg, USA, 2002.

Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. Medical and Public Health Management, JAMA 2001;285(8)1059–1070.

BD Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. BD Biosciences, San Jose, USA, 2000.

Beall FA, Taylor MJ, Thorne CB. Rapid Lethal Effect in Rats of a Third Component Found Upon Fractionating the Toxin of Bacillus Anthracis. Journal of Bacteriology 1962;83:1274–1280.

Bigalke H, Rummel A. Medical aspects of toxin weapons. Toxicology 2005;214:210–220.

Bigalke H, Shoer LF. Clostridial Neurotoxins. Handbook of Experimental Pharmacology: Bacterial Protein Toxins, toim. Antories K, Just I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Saksa, 2000.

Boenisch MS. Handbook of Immunochemical Staining Methods. DAKO Corporation, USA, 2001.

Bot Tox BioThreat alert Test Strip Specification Sheet. Tetracore Inc., Gaithersburg, USA, 2002.

Bradford reagent. Technical Bulletin. Sigma, Saint Louis, USA.

Brigati J, Williams DD, Sorokulova IB, Nanduri V, Chen IH, Turnbough CL, Petrenko V. Diagnostic Probes for *Bacillus anthracis* Spores Selected from a Landscape Phage Library. Clinical Chemistry 2004;50(10):1899–1906.

Carter NP, Meyer EW. Introduction to the principles of flow cytometry. Flow cytometry: a practical approach, toim. Ormerod MG. Oxford University Press, New York, USA, 1990.

Centers for Disease Control and Prevention. Botulism in the United States, 1899–1996. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 1998.

Centers for Disease Control and Prevention. Emergency Preparedness & Response, Bioterrorism Agents/Diseases. http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist.asp, päivitetty 19.11.2004. (30.1.2006)

Chen PS, Li CS. Sampling Performance for Bioaerosols by Flow Cytometry with Fluorochrome. Aerosol Science and Technology 2005;39:231–237.

Chen PS, Li CS. Bioaerosol characterization by flow cytometry with fluorochrome. Journal of Environmental Monitoring 2005;7:950–959.

Cherington M. Clinical spectrum of botulism. Muscle Nerve 1998;21:701–710.

Chow AW. Lab-on-a-Chip: Opportunities for Chemical Engineering. American Institute of Chemical Engineers Journal 2002;48(8):1590–1595.

Cox CS. Physical Aspects of Bioaerosol Particles. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995a.

Cox CS. Stability of Airborne Microbes and Allergens. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995b.

Crook B. Inertial Samplers: Biological Perspectives. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton , USA, 1995a.

Crook B. Non-Inertial Samplers: Biological Perspectives. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995b.

DaSilva EJ. Biological warfare, bioterrorism, biodefence and the biological and toxin weapons convention. Electronic Journal of Biotechnology 1999;2(3):109–139.

Day JP, Kell DB, Griffith GW. Differentiation of *Phytophthora infestans* Sporangia from Other Airborne Biological Particles by Flow Cytometry. Applied and Environmental Microbiology 2002;68(1):37–45.

Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. Medical Progress: Anthrax. The New England Journal of Medicine 1999;341(11):815–826.

DyLight™ 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit. Instructions. Pierce, Rockford, USA.

Eskola J, Kettunen R, Riihimäki V. Biologiset ja kemialliset agenssit ja sabotaasi. Ympäristöterveyden erityistilanteiden opas, toim. Holopainen M. Ympäristöterveyden erityistilanteiden opas, toim. Holopainen M. Sosiaali- ja terveysministeriö, 2000.

Emanuel PA, Dang J, Gebhardt JS, Aldrich J, Garber EAE, Kulaga H, Stopa P, Valdes JJ, Dion-Schultz A. Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection. Biosensors & Bioelectronics 2000;14:751–759.

European Committee for Standardization. European Standard, Chemical disinfectants - Basic Sporicidal Activity - Test Method and Requirments (Phase 1). prEN 14347:2001.

EZ-Link® NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit. Instructions. Pierce, Rockford, USA.

Frost & Sullivan. D262: Security Technologies – Advances in Chemical and Biological Detection Technologies. Technical Insights, Frost & Sullivan, San Antonio, USA, 2003.

Gill M. Bacterial Toxins: a Table of Lethal Amounts. Microbiological Reviews 1982;46(1):86–94.

Gjelsnes O, Tangen R. Liquid flow cytometer. Patentti WO 94/29695. Norja, 1994.

Greenfield RA, Bronze MS. Prevention and treatment of bacterial diseases caused by bacterial bioterrorism threat agents. Drug Discovery Today 2003;8(19):881-888.

Griffith KS, Mead P, Armstrong GL, Painter J, Kelley KA, Hoffmaster AR, Mayo D, Barden D, Ridzon R, Parashar U, Teshale EH, Williams J, Noviello S, Perz JF, Mast EE, Swerdlow DL, Hadler JL. Bioterrorism-related Inhalational Anthrax in an Elderly Woman, Connecticut, 2001. Emerging Infectious Diseases 2003;9(6):681–688.

Guillemin J. Biological Weapons: From the Invention on State-Sponsored Programs to Contemporary Bioterrorism. Columbia Unicersity Press, New York, USA, 2005. pp. 1–19.

Hanna P. Lethal toxin actions and their consequences. Journal of Applied Microbiology 1999;87:285–287.

Hanna PC, Ireland JAW. Understanding Bacillus anthracis pathogenesis. Trends in Microbiology 1999;7(5):180–182.

Hanna PC, Kochi S, Collier RJ. Biochemical and Physiological Changes Induced by Anthrax Lethal Toxin in J774 Macrophage-like Cells. Molecular Biology of the Cell 1992;3:1269–1277.

Haug E, Sand O, Sjaastad ØV. Ihmisen fysiologia. WSOY, Porvoo, Suomi, 1999. pp.347.

Henchal EA, Teska JD, Ludwig GV, Shoemaker DR, Ezzel JW. Current Laboratory Methods for Biological Threat Agent Identification. Clinics in Laboratory Medicine 2001;21(2):661–678.

Hensel A, Petzoldt K. Biological and Biochemical Analysis of Bacteria and Viruses. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995.

Hirst JM. Bioaerosols: Introduction, Retrospect and Prospect. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995.

Ho J. Future of biological aerosol detection. Analytica Chimica Acta 2002;457:125–148.

Ho J. Real Time Detection of Biological Aerosols with Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer (FLAPS). Journal of Aerosol Science 1996;27(1):581–582.

Humppi T. Biologisen aseen käytön osoittaminen. BC-Suojelulääkintä, Tilannekatsaus 2001. Pääesikunnan terveydenhuolto-osasto, 2002.

Huovinen P. Hyvät, pahat, näkymättömät, miten selvitä elämässä mikrobien kanssa. WSOY, Helsinki, Suomi, 2003.

Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, Gerberding J, Hauer J, Hughes J, McDade J, Osterholm MT, Parker G, Perl TM, Russell PK, Tonat K. Anthrax as a Biological Weapon, 2002 Updated Recommendations for Management. Medical and Public Health Management JAMA 2002;287(17):2236–2252.

Iqbal SS, Mayo MW, Bruno JG, Bronk BV, Batt CA, Chambers JP. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. Biosensors & Bioelectronics 2000;15:549–578.

Ivnitski D, O'Neil DJ, Gattuso A, Schlicht R, Calidonna M, Fisher R. Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents. BioTechniques 2003;35:862–869.

Jayasena SD. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. Clinical Chemistry 1999;45(9):1628–1650.

Jernigan JA, Stephens DS, Ashford DA, Omenaca C, Topiel MS, Galbraith M, Tapper M, Fisk TL, Zaki S, Popovic T, Meyer RF, Quinn CP, Harper SA, Fridkin SK, Sejvar JJ, Shepard CW, McConnell M, Guarner J, Shieh WJ, Malecki JM, Gerberding JL, Hughes JM, Perkins BA, and members of the Anthrax Bioterrorism Investigation Team. Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax: The First 10 Cases Reported in the United States. Emerging Infectious Diseases 2001;7(6):933–943.

Jones SW, Dobson ME, Fracesconi SC, Schoske R, Crawford R. DNA Assays for Detection, Identification, and Individualization of Select Agent Microorganisms. Croatian Medical Journal 2005;46(4):522–529.

Joubert O, Keller D, Pinck A, Monteil H, Prévost G. Sensitive and Specific Detection of Staphylococcal Epidermolysins A and B in Broth Cultures by Flow Cytometry Assisted Multiplex Immunoassay. Journal of Clinical Microbiology 2005;43(3): 1076–1080.

Klewitz T, Gessler F, Beer H, Pflanz K, Scheper T. Immunochromatographic assay for determination of botulinum neurotoxin type D. Sensors and Actuators B, 2005; article in press.

Kortepeter MG, Parker GW. Potential Biological Weapons Threats. Emerging Infectious Diseases 1999;5(4):523–527.

Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. Nature Structural Biology 1998;5(10):898–902.

Lange JL, Thorne PS, Lynch N. Application of Flow Cytometry and Fluorescent In Situ Hybridization for Assessment of Exposures to Airborne Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 1997;63(4):1557–1563.

Leppla SH. Anthrax Toxin. Handbook of Experimental Pharmacology: Bacterial Protein Toxins, toim. Antories K, Just I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Saksa, 2000.

Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: A bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations in eukaryotic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 1982;79:3162–3166.

Li CS, Lin YC. Sampling Performance of Impactors for Bacterial Bioaerosols. Aerosol Science and Technology 1999;30:280–287.

Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and Developing Technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and Biowarfare. Clinical Microbiology Reviews 2005;18(4):583–607.

Liu H, Bergman NH, Thomason B, Shallom S, Hazen A, Crossno J, Rasko DA, Ravel J, Read TD, Peterson SN, Yates J, Hanna PC. Formation and Composition of the Bacillus anthracis Endospore. Journal of Bacteriology 2004;186(1):164–178.

Makino SI, Uchida I, Terakado N, Sasakawa C, Yoshikawa M. Molecular Characterization and Protein Analysis of the *cap* Region, Which Is Essential for Encapsulation in *Bacillus anthracis*. Journal of Bacteriology 1989;171(2):722–730.

Matsumoto G. Anthrax Powder: State of the Art?. Science 2003;302:1492–1497.

Microcyte ® Field and Microcyte ® Aqua, User Manual. BioDETECT, AS, Oslo, Norja, 2003.

Mitchell JP. Aerosol Generation for Instrument Calibration. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995.

Mitchell JP. Particle Size Analyzers: Practical Procedures and Laboratory Techniques. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1995.

Miyamoto T, Kamikado H, Kobayashi H, Honjoh KI, Ho M. Immunomagnetic Flow Cytometric Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in Raw and Dry Milk. Journal of Food Protection 2003;66(7):1222–1226.

Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. Current Opinion in Microbiology 2004;7:19–24.

Mohr AJ. Aerosol. Encyclopedia of Bioterrorism Defense, toim. Pilch RF, Zilinskas RA. Wiley-Liss, Hoboken, USA, 2005.

Morse SS. Detecting Biological Warfare Agents. Biological Warfare: Modern Offense and Defense, toim. Zilinskas RA, Lynne Rienner Publishers, Inc. Colorado, USA, 2000.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology, fourth edition. Elsevier Mosby, Philadelphia, USA, 2002.

Mäkinen MJJ. CBNS-teknologiaohjelma. Puolustusvoimien Teknillisen Tutkimuslaitoksen henkilöstölehti Sensori 2/2004.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, USA, 2000. pp. 222–223, 231–233.

No-Weigh Maleimide-PEO_2-Biotin. Instructions. Pierce, Rockford, USA.

Ormerod MG. An introduction to fluorescence technology. Flow cytometry: a practical approach, toim. Ormerod MG. Oxford University Press, New York, USA, 1990.

Paek SH, Lee S-H, Cho JH, K Y-S. Developmenti of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay. Methods 2000;22:53–60.

Peruski AH, Peruski LF. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2003;10(4):506–513. a.

Peruski LF Jr, Peruski AH. Rapid diagnostic assays in the genomic biology era: detection and identification of infectious disease and biological weapon agents. BioTechniques 2003;35:840-846. b.

Phillips AP, Martin KL. Dual-parameter scatter-flow immunofluorescence analysis of Bacillus spores. Cytometry 1985;6(2):124–129.

Phillips AP, Martin KL. Immunofluorescence analysis of bacillus spores and vegetative cells by flow cytometry. Cytometry 1983;4(2):123–131.

Pile JC, Malone JD, Eizen EM, Friedlander AM. Anthrax as a Potential Biological Warfare Agent. Archives of Internal Medicine 1998;158:429–434.

Polsky-Cynkin R, Parsons GH, Allerdt L, Landes G, Davis G, Rashtchian A. Use of DNA Immobilized on Plastic and Agarose Supports to Detect DNA by Sandwich Hybridization. Clinical Chemistry 1985;31(9):1438–1443.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology, fifth edition. McGraw-Hill Companies, Inc. 2002.

Salkinoja-Salonen M (toim.). Mikrobiologian perusteita. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, Suomi, 2002.

SASS 2000 plus, Smart Air Sampler System. Instruction Manual. Research International, Monroe, USA.

Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. Microbiological Reviews 1992;56(1):80–99.

Sims NA. The Evolution of Biological Disarmament. Stockholm International Peace Research Institute. Oxford University Press, New York, USA, 2001. pp. 192–200.

Sincock SA, Kulaga H, Cain M, Anderson P, Stopa PJ. Applications of Flow Cytometry for the Detection and Characterization of Biological Aerosols. Field Analytical Chemistry and Technology 1999;3(4–5):291–306.

Song X, Shi J, Swanson B. Flow Cytometry-Based Biosensor for Detection of Multivalent Proteins. Analytical Biochemistry 2000;284:35–41.

Spurny KR. Chemical Analysis of Bioaerosols. Bioaerosols Handbook, toim. Cox CS, Wathes CM. CRC Press, Inc, USA, 1995.

Stopa PJ. The Flow Cytometry of Bacillus anthracis Spores Revisited. Cytometry 2000;41:237–244.

Wilchek M, Bayer EA. Introduction to avidin-biotin technology. Methods in Enzymology 1990;184:5–13.

Wilchek M, Bayer EA. Foreword and introduction to the book (strept)avidin–biotin system. Biomolecuolar Engineering 1999;16:1–4.

Williams DD, Benedek O, Turnbough CL Jr. Species-Specific Peptide Ligands for the Detection of *Bacillus anthracis* Spores. Appl. Environ. Microbiol 2003 oct;69 (10)6288-6293.