

***STREPTOCOCCUS MILLERI* -RYHMÄ: TUNNISTUS
LAJITASOLLE JA ESIINTYVYYS TIETYISSÄ INFEKTIOISSA**

Pro gradu -työ
Helsingin Yliopisto
Soveltava kemian ja mikrobiologian laitos
Mikrobiologian osasto
Silja Mentula
Helsinki 1998

URN: NBN:fi-fe19991236

SISÄLLYSLUETTELO	2
Johdanto.....	4
1.0 STREPTOKOKIT	
1.1 Streptococcus-suku.....	5
1.2 Streptokokkien ominaisuudet.....	5
1.2.1 Hemolyttisyys.....	6
1.2.2 Seroryhmitys.....	6
1.3 Streptokokkien luokittelu.....	7
1.4 Viridans streptokokit.....	9
2.0 STREPTOCOCCUS MILLERI	
2.1 Luokittelu.....	11
2.2 Esiintyvyys.....	11
2.3 Patogeenisyys.....	12
2.4 Virulenssimekanismit.....	13
2.5 Ominaisuudet.....	14
3.0 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	
3.1 Eristys ja tunnistus.....	16
3.2 Materiaalit.....	16
3.2.1 Bakteerikannat.....	16
3.2.2 Elatusaineet ja kasvatusolosuhteet.....	16
3.3 Seroryhmitys.....	17
3.4 Hyaluronidaasiaktiivisuus.....	18
3.5 Entsyymiprofilointi.....	18
3.5.1 Kromogeeniset substraattitestit.....	20
3.5.2 Fluorogeeninen substraattitesti.....	21
3.6 Rasvahappoanalyysi.....	22
4.0 TULOKSET	
4.1 Tunnistus.....	24
4.2 Menetelmien arviointi.....	27
4.2.1 Fluorogeeninen entsyymitesti.....	27
4.2.2 Kromogeeniset entsyymitestit.....	28
4.3 Testien herkkyys.....	28
4.3.1 α - ja β -glukosidaasi.....	29
4.3.2 β -galaktosidaasi.....	31
4.3.3 β -N-asetyyliglukosaminidaasi.....	32
4.3.4 Muut entsyymitestit.....	32
4.4 Rasvahappoanalyysi.....	33
4.5 Esiintyvyys kehon eri osissa.....	33
4.5.1 Urogenitaalialueet.....	36
4.5.2 Oraaliset.....	36
4.5.3 Umpisuolikannat.....	38
4.5.4 Ryhmä V.....	39

5.0 TULOSTEN TARKASTELU	40
6.0 KIITOKSET	40
7.0 KIRJALLISUUSVIITTEET	41
8.0 LIITTEET	48
8.1 Ravintoalustat.....	48
8.2 Rasvahappoanalyysi.....	49
8.2.1 Reagenssit.....	49
8.2.2 Laitteet ja välineet.....	50
8.2.3 Suoritus.....	50
8.2.4 Dendrogrammi.....	51
8.2.5 Komponenttianalyysi.....	52

STREPTOCOCCUS MILLERI -RYHMÄ: TUNNISTUS LAJITASOLLE JA ESIINTYVYYS TIETYISSÄ INFEKTIOISSA

Johdanto

Streptococcus milleri -ryhmän bakteerit ovat osa ihmisen suun, nielun, suoliston ja genitaalialueen normaaliflooran bakteeristoa. Kommensaalien lisäksi ryhmään kuuluu kuitenkin myös merkittäviä patogeneenejä, jotka esiintyvät varsin runsaina löydöksinä monenlaisissa märkivissä infektioissa, yleensä sekapopulaatioina joko aerobien tai anaerobien kanssa. *S. milleri* -ryhmään kuuluu kolme lajia; *S. anginosus*, *S. constellatus* ja *S. intermedius*. Lajit ovat hyvin samankaltaisia, mutta eroavat toisistaan tuottamiensa entsyymien suhteen ja esiintymisessään kehon eri osissa. Käytännön laboratoriotyössä ryhmän jäsenien erottelu tuottaa vaikeuksia. Ryhmän yksittäisten lajien kliinisen tärkeyden arvioimiseksi kliiniset mikrobiologian laboratoriot tarvitsevat yksinkertaisia ja kustannuksiltaan kohtuullisia nopeita menetelmiä lajierotteluun.

Työn tarkoituksena oli tunnistaa erityyppisistä kliinisistä infektioista otetuista näytteistä eristettyjä *Streptococcus milleri* -ryhmään luokiteltuja kantoja ja selvittää niiden esiintymisyleisyyttä näissä infektioissa. Lajien erottelu perustuu eroihin bakteerien kyvyssä hajottaa tiettyjä substraatteja. Työssä testattiin käytössä olevia ja kehiteltiin uusia, lähinnä ennalta muodostuneiden entsyymien tunnistamiseen perustuvia erottelumenetelmiä. Vertailtavina oli kolme eri entsyymiprofilointimenetelmää, joista yksi on fluorogeeninen ja kaksi kromogeenistä. Työhön sisältyi myös erilaisten kasvatusalustojen sekä pH:n vaikutusten arviointia bakteerien entsyymiaktiivisuuksiin ja testituloksiin. Lisäksi työssä testattiin kromatografisen soluseinärasvahappoanalyysin soveltuvuutta lajien erotteluun. Menetelmiä tarkasteltiin herkkyyden sekä käytännön suorittamisen ja aiheutuvien kustannusten kannalta.

Työ suoritettiin Kansanterveyslaitoksen Bakteriologian osaston Anaerobiyksikössä.

1.0 STREPTOKOKIT

1.1 *Streptococcus*-suku

Streptococcus-suku on laaja ja heterogeeninen. Nimensä se on saanut bakteerien ketjumaisen kasvutavan mukaan (strepto=ketju). Siihen kuuluvat bakteerit ovat yleisiä luonnossa ja kuuluvat eläinten ja ihmisten normaaliflooraan. Ne kolonisoivat ruoansulatuskanavan, suuontelon ja genitaalialueen limakalvot sekä ihon. Suurin osa on apatogeneja, jotka aiheuttavat vain opportunistisia infektioita. Streptokokkien heimoon kuuluu kuitenkin myös virulentteja lajeja, jotka aiheuttavat hyvinkin vakavia tauteja. Useimmin streptokokit aiheuttavat ylähengitysteiden, ihon sekä pehmytkudoksen infektioita, hammaskariesta, sydäntulehduksia, aivokalvontulehduksia ja verenmyrkytyksiä (Schleifer ym., 1987; Bascomb ym., 1998). Maitohapon tuottajina tietyt streptokokit ovat tärkeässä asemassa meijeri- ja fermentointiteollisuuden hyötybakteereina, mutta myös pilaajina (Stiles ym., 1997). Ne ovat siis ihmisen kannalta varsin merkittävä bakteeriryhmä.

Streptokokkien suvun jakaminen pienempiin alaryhmiin on osoittautunut hankalaksi ja jako on edelleen kirjavaa. Fysiologisten ominaisuuksien perusteella suku on jaettu kolmeen uuteen sukuun; *Lactococcus*, *Enterococcus* ja *Streptococcus* (Schleifer ym., 1987). Näistä *Lactococcus* on merkityksellinen lähinnä maito- ja fermentointiteollisuudelle ja on harvoin patogeeninen. *Enterococcus* on etupäässä suolistoperäinen ja kuuluu suoliston normaaliflooraan eläimillä ja ihmisillä. *Streptococcus* kolonisoii ihon ja limakalvot ja on myös osa normaaliflooraa. *Enterococcus* ja *Streptococcus* ovat opportunistisia patogeneja. Aikaisemmin anaerobisiksi streptokokeiksi kutsutut peptostreptokokit on myös siirretty erilleen *Peptostreptococcus*-suvuksi. Nämä suvut jakautuvat luonnollisesti lukuisiin lajeihin (Schleifer, 1987; Janda, 1994; Facklam, 1995). Keskityn jatkossa vain *Streptococcus*-sukuun ja siinä erityisesti *S. milleri* -ryhmään.

1.2 Streptokokkien ominaisuudet

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) kuvaa *Streptococcus*-suvun seuraavasti: gram positiivinen, pareittain tai ketjuissa kasvava, liikkumaton, itiöimätön, pyöreä tai soikea kokki, halkaisijaltaan 0.5-2.0 µm, katalaasi-negatiivinen, fakultatiivisesti anaerobinen, kemo-organotrofinen, homofermentatiivinen, DNA:n GC-pitoisuus 34-46 mol%. Streptokokit kasvavat 25-45 °C:ssa, optimilämpötila on 37 °C. Useimmat lajit

kasvavat hapen läsnä ollessa ja korotettu CO₂-osapaine tai mikroaerofiiliset olosuhteet stimuloivat kasvua. Jotkut kannat vaativat kasvuun korotetun CO₂-osapaineen (5%) tai anaerobioosin. Streptokokit ovat ravinnevaatimuksiltaan vaihteleva, mutta vaativa ryhmä, minkä vuoksi bakteereja kasvatetaan rikkaalla kompleksisella alustalla, missä kasvu paranee veri- tai seerumilisäyksellä. Glukoosi ja muut hiilihydraatit käytetään fermentatiivisesti kaasua tuottamatta ja pääasiallisena lopputuotteena on maitohappo (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1994).

Streptokokkien tunnistaminen aloitetaan perinteisin menetelmin. Bakteerien gram-värjäytyvyys, pesäke- ja solumorfologia, liikkuvuus, hapensietokyky, kasvuvaatimukset ja antibioottiherkkyys määritetään. Fysiologisten ominaisuuksien, esiintyvyyden, taudinkuvan ja biokemiallisin entsyymitestein suoritettavan fenotyypityksen ohella streptokokkien luokitteluperusteina käytetään mm. DNA-DNA- ja DNA-RNA-hybridisaatiota, 16S rRNA-sekvensointia, rasvahappoanalyysiä, SDS-PAGE -solun kokonaisproteiinin profilointia, antigeenisia ominaisuuksia sekä bakteerien kykyä hajottaa punasoluja eli aiheuttaa hemolyysiä (Beighton ym., 1991; Whiley ym., 1991; Houang ym., 1995).

1.2.1 Hemolyttisyys

Hemolysin perusteella streptokokit jaetaan α -, β - ja γ -hemolyttisiin kantoihin (Brown, 1919). β -hemolyysi saa aikaan punasolujen täydellisen hajoamisen, jolloin verimaljalla pesäkkeen ympärille muodostuu kirkas, väritön, läpikuultava alue. Kun kyseessä on α -hemolyysi, punasolut hajoavat vain osittain, jolloin kasvualusta muuttuu harmaaksi tai vihertäväksi. Ei-hemolyttiset (γ) kannat eivät hajota punasoluja, eivätkä siten muuta alustan väriä. Hemolyysi on joillakin lajeilla varioiva ominaisuus eli voi vaihdella kannasta toiseen, jolloin se ei ole riittävä peruste lajin tunnistamiseen (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1994).

1.2.2 Seroryhmitys

Serologinen eli Lancefieldin ryhmitys jakaa streptokokit soluseinän polysakkaridien antigeenirakenteen perusteella ryhmiin A-V. Lisäksi erotetaan serologisesti ryhmittymättömät streptokokit. Ihmisestä eristetyt bakteerit kuuluvat useimmin ryhmiin A, B, C, D, F tai G.

Seroluokittelu kehitettiin alunperin β -hemolyyttisten streptokokkien identifiointiin, mutta myöhemmin huomattiin, että myös α - ja ei-hemolyyttisillä streptokokeilla on samoja seroryhmäantigenejä, joten ryhmittely laajennettiin koskemaan kaikkia streptokokkeja. Seroryhmitys ei yksin riitä streptokokkien luokitteluun tai tunnistamiseen, sillä monilta streptokokeilta seroryhmäantigenit puuttuvat kokonaan, saman lajin eri kannat voivat kuulua eri ryhmiin ja samaa antigeeniä voi esiintyä eri lajeihin kuuluvilla kannoilla (Lancefield, 1933; Schleifer, 1987).

Mikään Lancefieldin ryhmä ei ole spesifinen vain yhdelle streptokokkilajille tai suoraan sidoksissa johonkin fysiologiseen ominaisuuteen, patogeenisuuteen, infektion vakavuuteen tai esiintymispaikkaan. Joitakin yhteyksiä on kuitenkin todettu. Esimerkiksi pieniä pesäkkeitä muodostavat F, C tai G ryhmään kuuluvat bakteerit ovat yleensä *S. milleri* -kantoja ja F- tai G-antigeenin omaavat kannat ovat useimmin β -hemolyyttisiä (Coykendall ym., 1987).

1.3 Streptokokkien luokittelu

Fysiologisten ominaisuuksien perusteella streptokokit voidaan jakaa seuraaviin ryhmiin: pyogeeniset (I, III), fekaaliset (II), pneumokokit (IV), oraaliset (viridans) (V) ja maitohappoa tuottavat streptokokit (Jones, 1978). Kun myös seroryhmitys otetaan huomioon, luokitellaan streptokokit seuraavasti:

I Lancefieldin ryhmiin A ja B kuuluu pyogeenisiä monenlaisia infektioita aiheuttavia streptokokkeja, esim. nieluinfektioita aiheuttava *S. pyogenes* (A) ja erityisesti vastasyntyneen verenmyrkytyksiä ja meningiittiä aiheuttava *S. agalactiae* (B) (Kilpper-Bälz ym., 1984).

II Ryhmä D käsittää fekaalisia streptokokkeja, esim. suoliston normaaliflooraan kuuluva *S. bovis*. D-ryhmän yleisimmät edustajat, enterokokit, siirrettiin omaksi *Enterococcus*-suvukseen (Kilpper-Bälz ym., 1985).

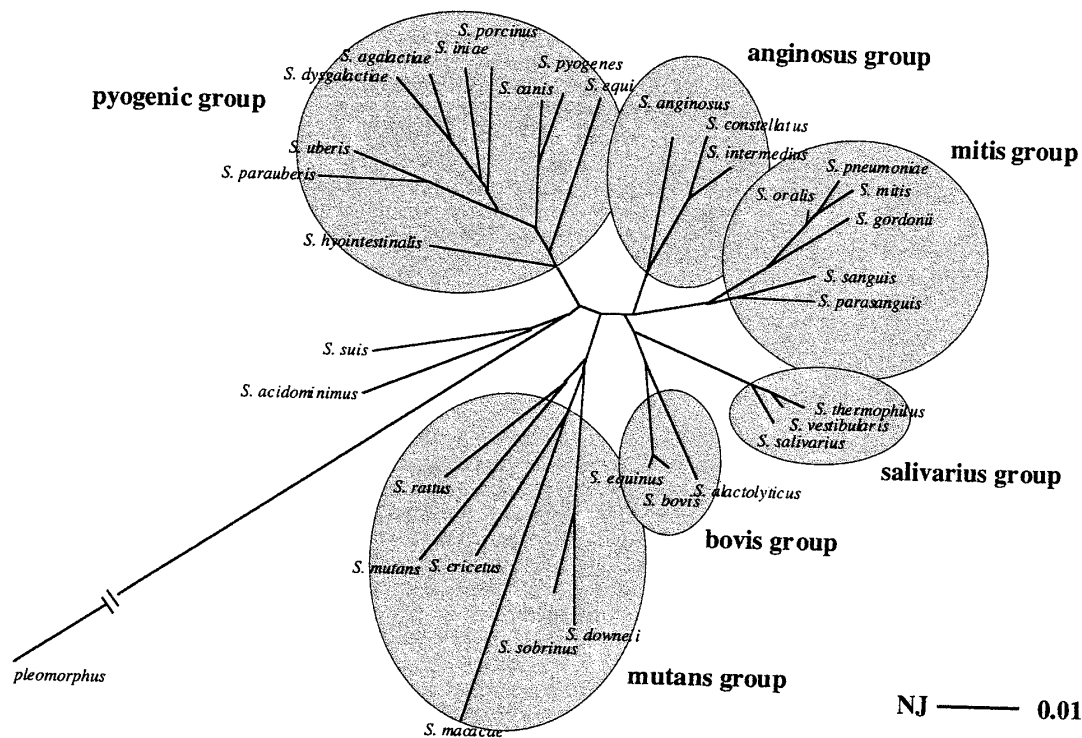
III C ja G ryhmien streptokokit aiheuttavat vastaavia oireita kuin *S. pyogenes* ja muistuttavat maljalla muuten *S. milleri* -lajeja, mutta muodostavat selvästi isompia pesäkkeitä. Ne ovat yleisiä eläimillä, mutta esiintyvät harvalukuisina myös ihmisen limakalvoilla ja tulehduksissa ollen yleensä nimenomaan eläinperäisiä, esimerkiksi *S. dysgalactiae* (C), *S. equisimilis* (C) ja *S. canis* (G) (Farrow ym., 1984; Vandamme ym., 1996).

IV *S. pneumoniae* lasketaan omaksi ryhmäkseen. Se kuuluu ylähengitysteiden normaaliflooraan ja on merkittävä taudinaiheuttaja normaalin asuinpaikkansa ympäristössä aiheuttaen mm. poskiontelo- ja korvatulehduksia sekä meningiittiä (Kilpper-Bälz ym., 1985).

V Oraalisiin (viridans) streptokokkeihin kuuluu useimpien streptokokki- ja seroryhmien edustajia (‘’) sekä yksittäisiä lajeja: *S. acidominimus*, ‘‘*S. milleri*’’, ‘‘*S. mitior*’’, *S. morbillorum*, ‘‘*S. mutans*’’, ‘‘*S. oralis*’’, *S. salivarius* ja *S. sanquis* (Falcklam, 1977). Oraalisesta ryhmästä kerrotaan tarkemmin kohdassa 1.4.

Jako ei ole täysin kattava tai yksiselitteinen, eikä varmasti lopullinen. Geneettiin ja fysiologisiin menetelmiin perustuvat jaottelut poikkeavat hieman toisistaan, mutta ovat lajikoostumukseltaan vastaavat (Bentley ym., 1991). Geneettisesti samankaltaiset lajit eroavat usein fenotyypiltään. Lisäksi geneettisissä tutkimuksissa isolaattien määrä on usein pienempi kuin fenotyypitutkimuksissa, joten kaikki lajinsisäinen variaatio ei aina tule esille. Geneettisissä menetelmissä ei myöskään aina analysoida genomia yhteneväisin osin; DNA:n emäskoostumus, DNA-hybridisaatio- ja multilokus-entsyymianalyysit saattavat jaotella organismit eri ryhmiin (Bascomb ym., 1998). Lajitasolla DNA-hybridisaatio on toistaiseksi luotettavin luokittelumenetelmä, ja se yleensä erottaa tehokkaasti myös läheistä sukua olevat organismit. Sitä vastoin jopa 97,5% 16S rRNA-homologia voi DNA-hybridisaatiossa jäädä selvästi alle 70% eli lajirajan alapuolelle. Sukutasolla 16S rRNA-sekvensointi on kuitenkin varsin toimiva menetelmä (Stackebrandt ym., 1994).

Fysiologisten tunnistusmenetelmien ongelmana on vaikeus optimoida testit kullekin organismiryhmälle, ja pienikin muutos testijärjestelmässä voi johtaa erilaisiin tuloksiin. Lisäksi fenotyypitestit mittaavat vain yksittäisten substraattien hajottamiskykyä, joten ne eivät suoraan kerro organismin aineenvaihduntareittejä, substraatin hajottamiseen tarvittavien entsyymien määrää tai substraattispesifisyyttä (Kilian ym., 1974). Luokitteluperustan valinta vaikuttaa siis jaotteluun oleellisesti. Mikään luokittelusysteemi ei ole vakiinnuttanut asemaansa muita parempana, joten eri lähteissä esiintyy varsin kirjava joukko erilaisia luokitteluehdotuksia.



Kuva 1. 16S rRNA:n sekvensointiin perustuva fylogeneettinen sukupuu 34 streptokokkilajille. Etäisyydet on määritetty naapuri-yhdistämis-menetelmällä (neighbor-joining-method). *S. pleomorphus* sijoittuu kauas muista lajeista, todellinen etäisyys risteyksestä on 0.16944 (Kawamura ym., 1995).

1.4 Viridans-streptokokit

“Viridans” (vihertävä, α -hemolyttinen) streptokokkien ryhmä muodostaa eräiden, Lancefieldin ryhmiin A, B tai D kuulumattomien, β -hemolyttisten streptokokkien kanssa merkittävän, joskin melko heterogeenisen ryhmän, johon kuuluu myös patogeenisiä lajeja. Viridans-ryhmää kutsutaan myös oraaliseksi streptokokeiksi, sillä se muodostaa 30-60% ihmisen oralisesta bakteerifloorasta (Colman ym., 1972). Niitä tavataan säännöllisesti myös hengitysteissä, ruoansulatuskanavassa, urogenitaali alueella ja lähes kaikkien elinten tulehduksissa; useimmin ylempien hengitysteiden, suoliston, genitaalialueen, keskushermoston, luuhun liittyvien lihasten, sydämen ja ihon infektiosta (Quinn, 1988). Ne voivat kuulua seroryhmiin A, C, E, F, G, H, K, M ja O tai seroryhmäantigeenit voivat puuttua kokonaan. Seroryhmällä ja fysiologisilla ominaisuuksilla tai esiintyvyydellä tietyssä ympäristössä ei ole todettu suoraa yhteyttä. Viridans streptokokit eivät tuota solunulkoisia

eksotoksiineja, mutta tuottavat mm. hydrolyyttisiä, proteolyyttisiä ja sakkarylyyttisiä entsyymejä (Roberts, 1988). Ryhmään kuuluvat organismit on esitetty taulukossa 1. Aiemmin ryhmään kuuluneet *S. adjacens* ja *S. defectivus* kuuluvat nykyluokituksen mukaan *Abiotrophia*-sukuun (*Abiotrophia adjacens*, *A. defectivus*), joka koostuu ravinnevaatimuksiltaan varioivista streptokokeista.

Taulukko 1. Viridans-ryhmän streptokokit (Kikuchi ym., 1995, Whiley ja Beighton 1998).

Salivarius-ryhmä	Mutans-ryhmä	Anginosus-ryhmä	Mitis-ryhmä
<i>S. thermophilus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. mitis</i>
<i>S. vestibularis</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. oralis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. sanquis</i>
	<i>S. rattus</i>		<i>S. gordonii</i>
	<i>S. macacae</i>		<i>S. parasanquis</i>
	<i>S. downei</i>		<i>S. crista</i>
	<i>S. ferus</i>		<i>S. pneumoniae</i>
			<i>S. pesoris</i>
			<i>S. infantis</i>

S. milleri -ryhmään kuuluu mikroaerofiilisiä streptokokeja, joista osa on hemolyyttisiä ja osalla on A, C, F tai G antigeeni. Nämä ominaisuudet ovat aiheuttaneet sekaannuksia diagnostiikassa, vaikka lajit ovatkin helposti ja nopeasti erotettavissa "oikeista" A-, C- tai G-streptokokeista, jotka muodostavat maljalla selvästi suurempia pesäkkeitä kuin *S. milleri* -ryhmän bakteerit ja ovat Voges-Proskauer (VP) negatiivisia *S. milleri* -ryhmän bakteerien ollessa VP positiivisia (Ruoff ym., 1985; Schleifer ym., 1987).

2.0 STREPTOCOCCUS MILLERI -RYHMÄ

2.1 Luokittelu

S. milleri -ryhmä, josta käytetään myös nimitystä “*S. anginosus*”-ryhmä, on yhtenäinen ja helposti tunnistettavissa (Kawamura ym., 1995). Ryhmä on kuitenkin fysiologisesti ja biokemiallisesti heterogeeninen, mikä on tehnyt sen jakamisen lajeihin vaikeaksi ja sekavaksi. Tähän ovat vaikuttaneet osittain ristiriitaiset tutkimustulokset, eri tutkijoiden käyttämät eri menetelmät tai testattavat ominaisuudet sekä tutkijoiden erilaiset näkemykset taksonomiaan ja nimeämiseen liittyvissä kysymyksissä. Lisäksi Amerikassa ja Euroopassa on ollut toisistaan poikkeavat nimeämissuuntaukset. Amerikassa *S. milleri* jaettiin kahteen ryhmään: *S. intermedius* (SMG-intermedius) ja *S. anginosus-constellatus*, kun taas Britanniassa nimiä *S. milleri* ja *S. anginosus* on käytetty synonyymeinä jakamatta genotyyppinä uusiksi lajeiksi. “Viridans”-streptokokkien ryhmässä oltiin pitkään tilanteessa, jossa oli kuvattu enemmän lajeja kuin mitä käytännössä voidaan yksinkertaisin biokemiallisin testeillä luotettavasti erotella (Facklam, 1984; Beighton ym., 1991).

Nykykäsityksen mukaan *S. milleri* -ryhmään kuuluvat *S. anginosus*, *S. constellatus* ja *S. intermedius* ja ne ovat kukin oma lajinsa (Whiley ym., 1991; Kawamura ym., 1995). Ne eroavat toisistaan mm. muodostamiensa entsyymien osalta, esiintyvyydessään kehon eri osissa ja hemolyysiominaisuuksiltaan. Tunnistus perustuu muiden streptokokkien tapaan hemolyysimäärityksiin sekä serologisiin ja biokemiallisiin testeihin. Tutkijat ovat korostaneet ryhmän sisäistä fenotyypistä homogeenisuutta, mutta toisaalta on haettu todisteita heterogeenisyydestä perusteina mm. erot kantojen fermentaatio-ominaisuuksissa, antigeeniluokissa, pitkäketjuisten rasvahappojen esiintymisessä, entsyymien elektroforeettisessa liikkuvuudessa ja DNA:n emäskoostumuksessa (GC%) (Beighton ym., 1990; Whiley ym., 1991).

2.2 Esiintyvyys

S. milleri -ryhmän bakteerit ovat osa ihmisen normaaliflooraa, ne kolonisoivat suoliston ja limakalvot. Runsaimmin niitä on suuontelossa, ruoansulatuskanavassa ja emättimessä. Hyödyllisten ja harmittomien kommensaalien lisäksi ryhmään kuuluu merkittäviä patogeeneja, jotka voivat säilyä hengissä ja lisääntyä merkittävässä määrin vielä kehon puolustusmekanismien aktivoituttua (Gossling, 1988).

Terveessä kudoksessa *S. milleri* käsittää enimmilläänkin vain muutaman prosentin streptokokkien kokonaisuudesta, mutta on kuitenkin vakinainen osa normaaliflooraa. Suuontelossa niitä tavataan erityisesti plakissa ja ientaskuissa, ylähengitysteissä mm. nielussa sekä nielu- ja kitarisoissa ja urogenitaalialueella erityisesti emättimessä (Poole ym., 1979). Tulehtuneessa kudoksessa *S. milleri* kuuluu usein valtalajistoon ja on tietyissä tulehduksissa vallitsevana lajina. Kliinisistä näytteistä mm. suuontelosta, aivo- ja maksapaiseista sekä keskushermostosta eristetyt kannat ovat useimmin *S. intermedius* -kantoja, urogenitaaliset ja ruoansulatuskanavasta eristetyt *S. anginosus* -kantoja ja verenkiertoon tai hengitysteihin liittyvät *S. constellatus* -kantoja. *S. anginosus* ja *S. constellatus* esiintyvät useammanlaisissa tulehduksissa ja laajemmin kehon eri osissa kuin *S. intermedius*. (Whiley ym., 1992; Taketoshi ym., 1993).

S. milleri -ryhmän bakteereja ei ole juurikaan tavattu aivan pienten lasten normaalifloorassa. Esiintymisfrekvenssi kasvaa selvästi iän myötä noin kahdesta ikävuodesta lähtien. Ensimmäiseksi ne kolonisoivat suun (Gossling, 1988). Useimmista opportuneista bakteereista poiketen frekvenssissä esiintyvää jyrkkää nousua vanhuksilla ei ole havaittu. Myös verenkiertoon ja kehon immuunijärjestelmää heikentäviin tiloihin liittyviä infektioita esiintyy vähemmän kuin opportunisteilla yleensä (Parker ym., 1976; Rytel ym., 1984).

2.3 Patogeenisyys

Vaikka *S. milleri* -ryhmän infektiivisyys on laajasti tiedossa, ovat virulenssimekanismit vielä huonosti tunnettuja (Ruoff, 1987). *S. milleri* -ryhmään kuuluvat bakteerit aiheuttavat muiden streptokokkien tapaan mm. sydämen sisäkalvontulehduksia sekä poskiontelo- ja korvatulehduksia, mutta muista streptokokeista poiketen ne esiintyvät varsin runsaina monenlaisissa vakavissa märkivissä infektioissa, useimmiten happipakoisina erilaisissa paiseissa. Niitä tavataan useimmin anaerobisten lajien kanssa sekapopulaationa, mutta myös aerobien kanssa ja ajoittain absesseissa lähes puhtasviljelminä. Eniten niitä on löydetty keuhkopaiseista ja keuhkopussin avomärkimistä, mutta myös aivo-, maksa-, kurkku-, vatsaontelon ym. paiseista, tulehtuneista umpilisäkkeistä, poski- ja nenäonteloiden tulehduksista sekä märkivistä avohaavoista (Gossling, 1988). Kurkkupaiseen bakteriologiaa käsittelevässä tutkimuksessa *S. milleri* -ryhmä oli yleisin löydös *Fusobacterium necrophorum* -kantojen ohella (Jousimies-Somer ym., 1993). Joihinkin tulehduksiin liittyy verenmyrkytys (Ruoff ym., 1988). Vastasyntyneillä on tavattu synnytyskanavasta saatuja infektioita

(Spencer, 1982). Huolimatta runsaasta esiintymisestään suuontelossa, *S. milleri* ei ole ihmiselle kariogeeninen (Loesche, 1982).

Vakavaa infektiota edeltää yleensä lievempi tulehdus avohaavassa, vatsahaava, kirurginen toimenpide, vaurio limakalvolla tai hammas-, keuhko-, sydän- tai maksasairaus. Lisäksi kehon puolustusjärjestelmää heikentävät krooniset tai akuutit tilat ovat infektiolle altistavia tekijöitä. Näitä ovat esimerkiksi diabetes, alkoholismi, infektiotaudit ja pahalaatuiset verisolutaudit (Poole ym., 1977; Gossling, 1988).

2.4 Virulenssimekanismit

S. milleri -ryhmän streptokokit eivät eritä toksineja, mutta tuottavat monenlaisia entsyymejä, esimerkiksi hemolyyttisiä, hydrolyyttisiä, lipolyyttisiä, proteolyyttisiä ja sakkarylyyttisiä entsyymejä sekä sidekudosten hyaluronihappoa hajottavaa hyaluronidaasia. Nämä edistävät bakteerien leviämistä ja aiheuttavat osaltaan tulehdusoireita (Ruoff ym., 1987). Ryhmän bakteerit tuottavat epäspesifistä ekstrasellulaarista polymeeriä (CEP=Crude Extracellular Product), joka ei ole sytotoksista, mutta suojaa bakteerisolua ja stimuloi lymfosyyttien supressoreita ja näin inhiboi kehon puolustusjärjestelmän toimintaa (Arala-Chaves ym., 1979 ja 1981). Siten ne selviytyvät tulehtuneessa tai nekroottisessa kudoksessa paremmin kuin useimmat muut streptokokit.

S. milleri -ryhmän bakteerit eivät tuota sakkaroosista ekstrasellulaarisia polysakkarideja, kuten dekstriinejä tai levaaneja, joita monet, erityisesti kariogeeniset streptokokit, tuottavat suoja- ja kiinnittymismateriaaliksi kolonisaation edistämiseksi (Michalek, 1982). Niillä on kuitenkin jonkinlainen kiinnittymismekanismi, perustuen ilmeisesti epäspesifiseen ekstrasellulaariseen polymeeriin, sillä bakteerien on todettu kiinnittyvän lasipinnoille ja voivan muodostaa plakkia steriilissä ympäristössä kasvatettujen laboratoriorottien hampaisiin (Yoshizaki, 1983). Lancefieldin ryhmään C kuuluvat *S. milleri* -ryhmän bakteerit aggregoivat verihituleita samaan tapaan kuin trombiini (Willcox ym., 1994). Mahdollisena virulenssitekijänä pidetään myös sitä, että Lancefieldin ryhmiin C ja G kuuluvilta β -hemolyyttisiltä streptokokeilta puuttuu reseptori immunoglobuliini G:n (IgG) Fc-fragmentille (Lebrun ym., 1986). Osalla kannoista on pintarakenteina fimbrioita tai fibrillejä, jotka toimivat kiinnittymisen alkuunsaattajina tai välittäjinä (Handley ym., 1985). Lisäksi *S. milleri* -ryhmään kuuluvat bakteerit sitovat mm. syljessä olevaa immuunijärjestelmän β_2 -mikroglobuliinia, mikä edistää aggregaatiota ja siten yhtymistä paikalla jo olevaan

bakteeripopulaatioon (Ericson ym., 1980). Sekapopulaatiossa kasvamisen on todettu stimuloivan bakteerien kasvua ja aggregaatiota (Young ym., 1996) sekä inhiboivan valkosoluihin kuuluvien neutrofiilien bakteriosidistä aktiivisuutta (Shinzato ym., 1994). Potentiaalisia virulenssimekanismeja on siis useampia, mutta vielä ei ole aukottomasti todistettu mitkä näistä ovat merkittävimpiä tai erityisesti vain *S. milleri* -ryhmälle ominaisia.

2.5 Ominaisuudet

S. milleri -ryhmän geneettinen samankaltaisuus on huomattavaa, useimpien kantojen DNA:n samankaltaisuus on 70-90% tai enemmän, myös eri biotyypin, serotyypin, hemolyyttisten ja ei-hemolyyttisten kantojen DNA:t hybridisoituvat kohtalaisesti. DNA:n GC-pitoisuus on 38-40 mol%. Tunnettuja geneettisiä eroavaisuuksia vastaavia fenotyyppisiä eroja ei vielä ole tunnistettu. (Coykendall ym., 1987).

S. milleri -ryhmän bakteerit voivat olla α -, β - tai ei-hemolyyttisiä. Alle puolet kannoista on yleensä hemolyyttisiä, loput vain lievästi hemolyyttisiä (α) tai ei-hemolyyttisiä (Whiley ym., 1991). Ne voivat kuulua johonkin Lancefieldin ryhmistä: A, C, F tai G tai olla serologisesti ryhmittymättömiä. Useimmin alle puolella kannoista on jokin Lancefield-antigeeni (Beighton ym., 1990). Kaikki ovat gram positiivisia, liikkumattomia, itiöttömiä, katalaasi negatiivisia, lyhyissä ketjuissa kasvavia, pienikokoisia (0,5-1,0 μ m) kokkeja. Verimaljalla pesäke on pieni, halkaisijaltaan 0,5-2mm, ulkonäöltään valkoinen tai läpikuultava, kiiltävä, kupera ja eheäreunainen. Joidenkin kantojen pesäkkeet ovat valkoisia ja mattapintaisia. Osa suklaamaljalla kasvatetuista pesäkkeistä voi olla leviäviä (Bergman ym., 1995). Columbia-agarilla pesäkkeet etenkin *S. intermedius* -kannoilla voivat olla sileitä tai karkeapintaisia. *S. constellatus* on saanut nimensä stereomikroskoopilla nähtävästä pesäkkeen tähtisisäarakenteesta (lat. "tähten kera"). Selkeästi tunnistettava, mutta varioiva piirre on kasvustojen toffeemainen tuoksu. Kasvu voi aerobisissa oloissa olla hidasta ja heikkoa, mutta paranee CO₂-lisäyksellä. Useimmat kannat kasvavat paremmin anaerobisesti ja jotkut kannat vaativat anaerobiset olot kasvaakseen ollenkaan. Fermentaatio- ja soluseinän rakenneominaisuuksiltaan ryhmä on muiden streptokokkien kaltainen. Useimmat tuottavat asetoiinia (VP), hydrolysoivat arginiinia ja eskuliinia, mutta eivät hajota ureaa, hippuraattia, glyserolia tai pyrridonyyliaryyliamidia (Whiley ym., 1991).

S. anginosus, *S. constellatus* ja *S. intermedius* eroavat toisistaan mm. β -fukosidaasin, α -glukosidaasin, β -glukosidaasin, β -galaktosidaasin, β -N-asetyyliagalaktosaminidaasin, β -N-asetyyli-glukosaminidaasin, hyaluronidaasin ja sialidaasin tuoton suhteen (Beighton ym., 1990) (taulukko 2). Tärkeimmät erottelevat entsyymiaktiivisuudet ovat β -fukosidaasi, α - ja β -glukosidaasi sekä hyaluronidaasi.

S. milleri -ryhmän streptokokit ovat herkkiä tavanomaisille streptokokkilääkkeille, kuten penisilliineille, aminopenisilliineille, kefalosporiineille, makrolideille sekä klindamysiinille ja vähemmän herkkiä mm. aminoglykosideille, erytromysiineille ja fluorokinoloneille. Ne ovat usein resistenttejä tetrasykliineille, sulfonamideille, kloramfenikolille, trimetopriimille ja streptomysiineille (Tillotson, 1984; Gossling, 1988; Piscitelli, 1992).

Taulukko 2. Eroja *S. milleri* -ryhmän entsyymiaktiivisuuksissa (Beighton ym., 1990)

Tuotettu entsyymi	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>
β -fukosidaasi	-	-	+
α -glukosidaasi	v	+	+
β -glukosidaasi	+	- ^a	v
β -galaktosidaasi (ONPG)	-	- ^b	+
β -N-asetyyliagalaktosaminidaasi	-	-	+
β -N-asetyyli-glukosaminidaasi (β -NAG)	-	-	+
sialidaasi	-	-	+
hyaluronidaasi	-	+	+

+ positiivinen (>85% positiivisia)

^a 4% positiivisia

- negatiivinen (<15% positiivisia)

^b 2% positiivisia

v vaihteleva (16-84% positiivisia)

2.6 Diagnostiikka

S. milleri -ryhmän bakteerit on totuttu merkitsemään vain niiden ryhmänimellä *S. milleri*. Lajitason tunnistus tarjoaisi kuitenkin tärkeää etiologista tietoa kliinisille laboratoriolle. Tunnistus tehdään tavallisesti entsyymitestein, mutta muitakin mm. DNA-menetelmiä on kehitteillä. Tässä työssä tunnistus on tarkoitus viedä lajitasolle asti ja samalla hakea tehokkain ja taloudellisin entsyymitestisarja tähän tarkoitukseen.

3.0 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Eristys ja tunnistus

Työssä lajien erotteluun käytettiin kolmea eri entsyymitestisarjaa, joilla mitattiin kahdeksaa taulukossa 2 mainittua entsyymiaktiivisuutta. Lisäksi epäselvissä tapauksissa käytettiin neljää ylimääräistä Roscon entsyymitestiä: VP (Voges-Proskauer), PYR (Pyrrilidonyyli), UREA (Ureaasi) ja ESC (Eskuliini), joilla varmistettiin kannan kuuluminen *S. milleri* -ryhmään. Kaikilta valmistajilta ei löydy jokaista entsyymisubstraattia, joten kaikkien entsyymien osalta eri menetelmien herkkyksiä ei voitu vertailla. Hyaluronidaasi, sialidaasi ja β -N-asetyyliagalaktosaminidaasi aktiivisuudet testattiin vain yhdellä menetelmällä. Lisäksi selvitettiin kantojen hemolytyisyys ja seroryhmät.

3.2 Materiaalit

3.2.1 Bakteerikannat

Vertailukantoina olivat tyypikannat *Streptococcus anginosus* (ATCC 33397), *S. constellatus* (ATCC 27823) ja *S. intermedius* (ATCC 27335). Tutkittavina oli 102 *S. milleri*-ryhmään luokiteltua kantaa, jotka oli eristetty erilaisista infektionäytteistä ja säilytetty -70°C :ssa maitosuspensiossa. Ennen analyysijä kannoista tehtiin puhdasviljelmät ja tarkastettiin pesäkkeiden ulkonäkö, hemolytyisyys ja tuoksu. Näytekannoista 34 oli lasten umpisuolileikkausnäytteistä eristettyjä kantoja, 28 aikuisten suusta (ientasku, leukaluu, hammas, viisaudenhammas), nielusta tai poskiontelosta eristettyjä, 15 naisten urogenitaalialueelta, 8 miesten urogenitaalialueelta ja 12 muualta kehosta eristettyjä kantoja (haava, silmä, korva, sappirakko, luuydin, munuaiskasvaimen erite).

3.2.2 Elatusaineet ja kasvatusolosuhteet

Viljely tehtiin yleisravintoalustoilla, joilla streptokokit kasvavat mahdollisimman hyvin. Kasvatusalustoina olivat verimalja, Brucella-verimalja, Chocolate-malja, FAA-malja ja TSA-verimalja (katso liite 8.1). Hyaluronidaasin testaukseen käytettiin perusalustana Brain Heart Infusion -agaria, joka ei sisällä verta. Verimaljoilla määritettiin hemolytyisyys, pesäkkeen ulkonäkö, tuoksu ja kasvatettiin massaa seroryhmämäärittelyyn. Brucella, Chocolate, FAA ja

TSA-maljoilla kasvatettiin bakteerimassaa entsyymaattisiin määrityksiin. Kasvatus tapahtui +37°C lämpöhuoneessa sekä aerobisesti (5% CO₂-kaappi) 2vrk, että anaerobisesti 2vrk. Bakteerimassan tuottamiseksi maljoja kasvatettiin anaerobiastioissa, jolloin kasvu oli runsaampaa.

Kanteen asetetuilla venttiileillä varustetut anaerobiastiat saatettiin anaerobioosiin nk. tyhjiötäyttö-menetelmällä. Ennen kaasun vaihtoa astiaan laitettiin katalysaattori, joka muuttaa jäännöshapen vedeksi ja indikaattoriliuska anaerobioosin tarkkailemista varten. Indikaattoriliuska sisältää metyleenisineä, joka pelkistyy ja muuttuu sinisestä valkoiseksi anaerobioosissa (Dry Anaerobic Indicator Strips, BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, USA). Liuska aktivoidaan ennen käyttöä vedessä kostuttamalla. Katalysaattoreina toimivat palladiumilla päällystetyt alumiinihiukkaset. Katalysaattorikenoja kuumennettiin 2-4 tuntia +160°C:ssa jokaisen käytön jälkeen, koska runsas kosteus ja H₂S inaktivoivat hiukkasia. Astiat vedettiin vakuumiin ja täytettiin seoskaasulla (90% N₂, 5% CO₂, 5% H₂, Aga). Toimenpide suoritettiin 3-4 kertaa. Automatisoitu Anoxomat® (Lichtenvoore, Belgia) tarkistaa ennen täyttöä anaerobiastioiden tiiviyden.

3.3 Seroryhmitys

Mahdollinen Lancefieldin seroryhmä testattiin Streptex latex ZL50 -pikatestillä ohjeen mukaan (Murex Biotech Ltd. England). Seroryhmän määrittäminen perustuu soluseinän antigeenien tunnistamiseen kullekin seroryhmälle spesifisten vasta-aineiden avulla. Testattavat ryhmät olivat *S. milleri* -ryhmälle tyypilliset A, C, F ja G. Kukin streptokokkikanta voi kuulua vain yhteen seroryhmään, muttei välttämättä ole reaktiivinen millekään ryhmälle. Vasta-aineet ovat maitomaisessa liuoksessa polystyreeni lateksipartikkelien pinnalle kiinnitettynä. Testattavasta kannasta tehdään bakteerisuspensio (10⁵-10⁸cfu/ml) testisarjan mukana tulevaan proteolyttiseen entsyymiliuokseen. Bakteerimassa kerätään verimaljoilta 2vrk:n ikäisiltä kasvustoilta tai kun massaa on riittävästi. Suspensiota inkuboidaan 10-60 minuuttia +37°C:ssa. Tällöin soluseinän rakenteet rikkoutuvat ja antigeenit vapautuvat liuokseen. Pisara kutakin vasta-aineliuosta ja inkuboitua bakteerisuspensiota sekoitetaan objektilasilla tai mustalla pahvikortilla ja käännellään niin, että muodostunut pisara sekoittuu edelleen. Vasta-aineelle homologisen antigeenin läsnäollessa lateksipartikkelit sakkautuvat voimakkaasti. Muussa tapauksessa vasta-ainesuspensio jää maitomaiseksi. Positiivinen sakkautumisreaktio on selkeä ja se tapahtuu välittömästi tai vähintään minuutin sisällä pisaroiden sekoittamisesta. Positiivisena

kontrollina on testiin kuuluva polyvalentti kontrolliliuos ja negatiivisena kontrollina steriili vesi.

3.4 Hyaluronidaasiaktiivisuus

Hyaluronidaasin tuotto testattiin Smith ja Willett'in kuvaamalla menetelmällä (Smith ym., 1968). Testaus tapahtuu Brain Heart Infusion -agarilla (BBL), joka sisältää 1%(wt/vol) naudan seerumialbumiinia (Bovine Serum albumin, fractionV, Sigma) ja 400 µl/ml hyaluronihappoa (Hyaluronic acid, gradeIII, Sigma). Maljalle tiputetaan tippa bakteerisuspensiota (10^8 cfu/ml) tai silmukallinen bakteerimassaa ja inkuboidaan $+37^{\circ}\text{C}$:ssa 5%CO₂ 2vrk. Inkuboinnin jälkeen maljalle kaadetaan 2 mol/l etikkahappoliuosta niin, että agarin pinta peittyy kokonaan ja annetaan seistä 10 minuuttia. Tämän jälkeen etikkahappo kaadetaan pois ja tutkitaan pesäkkeitä ympäröivää agaria. Jos bakteeri on tuottanut hyaluronidaasia, hyaluronidi on depolymeroitunut ja huuhtoutunut pois, jolloin maljalle on syntynyt läpikuultava alue pesäkkeen ympärille. Jos kanta ei ole tuottanut hyaluronidaasia, polymeeriseen muotoon jäänyt hyaluronidi saostuu seerumialbumiinin kanssa etikkahapon vaikutuksesta ja malja jää pesäkkeen ympäriltä kermaisen sameaksi. Tulos on selkeä ja helppo lukea tummaa taustaa vasten.

3.5 Entsyymiprofilointi

Oraalisten streptokokkien tunnistamiseen ja toisistaan erottamiseen on perinteisten tunnistusmenetelmien ohelle vakiintumassa biokemiallinen entsyymiprofilointimenetelmä. Usein muuten samankaltaiset bakteerilajit eroavat tuottamiensa entsyymien osalta, joten entsyymikartoitus täydentää perinteisiä menetelmiä varsin hyvin. Entsyymiprofilointi on uusia ja kiisteltyjäkin geneettisiä menetelmiä yksinkertaisempi ja paremmin rutiinilaboratorioihin sopiva fenotyypin määrittämiseen tähtäävä testisarja. Perinteiset biokemialliset menetelmät ovat vaatineet tutkittavan organismin kasvua havaittavan reaktion aikaansaamiseksi. Vaikeasti kasvatettavien tai hitaasti kasvavien organismien kasvuvaatimukset tekevät testit hitaiksi, epäkäytännöllisiksi tai kokonaan mahdottomiksi (Maiden ym., 1996). Sopivalla alustalla kasvaessaan bakteerimassa sisältää kuitenkin ennalta muodostuneita spesifisiä entsyymejä, jotka ovat suoraan tunnistettavissa, ja joiden aktiivisuus säilyy viileässä säilytetyssä bakteerisuspensiossa jopa 5vrk (Mangels, 1984). Entsyymit ovat konstitutiivisia tai sopivalla kasvualustalla tai kasvuolosuhteilla helposti indusoituvia (Edberg ym., 1996). Näiden entsyymien osoittamista käytetään bakteerien identifioinnissa.

Ennalta muodostuneiden entsyymien tunnistamiseen perustuvissa menetelmissä ei organismin kasvu kokeen aikana ole tarpeen. Tämä nopeuttaa testejä huomattavasti ja vähentää kontaminaatioista aiheutuvia virhereaktioita. Entsyymien määrä on suoraan verrannollinen bakteerimassan määrään, joten selkeän reaktion tuottamiseksi testeissä käytetään tiheää bakteerisuspensiota (10^8 - 10^9 cfu/ml). Bakteerit kasvatetaan agarmaljoilla, kunnes massaa on riittävästi (n. 2 vrk.). Maljoilta bakteerimassa on helppo kerätä ja on mahdollista tarkistaa kasvuston puhtaus silmämääräisesti. Samalla vältetään liemiviljelystä määrityksiin kulkeutuvien virhetulkintoja aiheuttavien komponenttien läsnäolo. Käytettävä testivalikoima voidaan optimoida kullekin bakteeriryhmälle, jolloin päästään lyhyilläkin testisarjoilla varsin tarkkoihin tuloksiin ja voidaan erotella lajeja, joita perinteiset biokemialliset menetelmät eivät erota. Menetelmiin sisältyy tutkittavasta lajista riippuen fermentaatio- ja hydrolyysitestejä sekä erilaisia nukleaasi-, esteraasi-, fosfataasi-, glykosidaasi-, lipaasi- ja peptidaasiaktiivisuusmäärityksiä. Glykosidaasitestit ovat eniten käytettyjä ja esim. peptidaaseja spesifisempiä. Lipaasi- ja endopeptidaasisubstraatteja tunnetaan useita, mutta niitä on hankala saattaa kuivattuun, helposti "elvytettävään" muotoon. Nukleaasisubstraatteja ei vielä ole saatavilla helposti detektoitavassa muodossa. Tunnistus jää lajitasolle (Mangels ym., 1993; Bascomb ym., 1998).

Testit perustuvat bakteerien kykyyn hajottaa synteettisiä substraatteja. Substraatit ovat tavallisesti sokeri-, aminohappo- tai peptidikonjugaatteja, ja niitä on kaupallisesti saatavilla lukuisia erilaisia. Testit muodostuvat yleensä puskuroidussa systeemissä tapahtuvista yksittäisten substraattien hajoamisreaktioista. Pieneen tilavuuteen konsentroitua bakteerisubstraattisuspensiota ja ravintoliuoksessa usein läsnäolevien häiritsevien tekijöiden eliminointi tarjoavat mahdollisuuden nopeisiin ja selkeisiin reaktioihin, joiden tulkinta on mahdollista muutamassa tunnissa, usein jo minuuteissa tai jopa sekunneissa. Uudet menetelmät toimivat vanhoja täydentäen ja tarkentaen tai ne kokonaan korvaten (Maiden ym., 1996).

Kaupallisia entsyymaattisia identifiointitestejä ovat mm. Anaerobe Panel (MicroScan, Baxter Healthcare Corp.), API ZYM (bio Merieux, Hazelwood, MO), AN-Ident (bio Merieux, Hazelwood, MO), Microscan GP Panels (Dade Intl. Inc. West Sacramento, Calif.), RapID-Strep (Innovative Diagnostic Systems, Inc. Atlanta, Ga), ROSCO Diagnostic Tablets (ROSCO, Taastrup, Denmark), WEETABS (Key Scientific Products Company, Texas), 4-Methylumbelliferyl-Linked-Substrate-Test (Sigma, USA), Vitek GPI Card (bio Merieux-Vitek Inc. Hazelwood, MO). Reaktioiden tulkinnat perustuvat värin muodostumiseen tai

fluoresenssiin. Lajin tunnistaminen tapahtuu vertaamalla saatua entsyymiprofiilia tunnettujen kantojen profiileihin.

3.5.1 Kromogeeninen substraattitesti

Kromogeeniset substraatit ovat useimmin nitrofenyyli- tai naftyyliamidi-yhdisteitä, joilla testataan glukosidaasi- tai aminopeptidaasiaktiivisuuksia. Aminohappoon, sokeriin tai peptidiin kytketty nitrofenyyli tai naftyyli irtoaa substraattikompleksista entsyymattisen hajoamisen seurauksena, ja se nähdään värin muutoksena heti tai kehitysreagenssin vaikutuksesta. Näistä substraateista aminohappo-naftyyliamidikonjugaatit ovat karsinogeenisia ja voivat inhiboida joidenkin streptokokkien kasvua. Tosin useimmissa testeissä organismin kasvu kokeen aikana ei ole tarpeen. Lisäksi naftyyli- ja nitrofenolipohjaisten testien on joissakin entsyymiaktiivisuuksissa todettu antavan erilaisia tuloksia. Erot voivat johtua esim. erilaisista inkubaatio-olosuhteista, kasvatusalustoista, siirroksen koosta, pH:sta, entsyymien affiniteetista synteettistä substraattia kohtaan, substraatin stabiiliudesta tai siitä, mitä reaktiota testit määrittävät (Bascomb ym., 1998; Kilian ym., 1989). Substraattityyppi onkin huomioitava aina tuloksia vertailtaessa. Testit voivat perustua myös pH-muutokseen tai tietyn komponentin (lopputuotteen) läsnäolon havaitsemiseen. Työssä käytettiin kahden eri valmistajan kromogeenisiä nitrofenyyli-pohjaisia substraattitabletteja: ROSCO Diagnostic Tablets (ROSCO, Danmark) ja WEETABS (Key Scientific Products, USA).

Suoritus: Rosco

Rosco-substraattitabletteja käytettiin ohjeen mukaan. Bakteerisuspensio tehtiin 2vrk ikäisiltä kasvustoilta (*Brucella* tai verimalja) 0,9% NaCl-liuokseen tiheyteen, joka vastaa sameudeltaan 4 McFarland-yksikköä ($1,2 \times 10^9$ cfu/ml). Tiheyden voi määrittää myös spektrofotometrisesti, tällöin absorbanssin (optical density) 620 nm:ssa tulisi olla 0,1. Rosco-substraattitabletit lisätään 0,5 ml:iin bakteerisuspensiota, sekoitetaan pyörösekoittajalla muutama sekunti (Vortex genie 2, Scientific Industries Inc. USA) ja inkuboidaan 4 tuntia tai yön yli +37 °C:ssa. Arginiinin hydrolyysitestiin lisätään pinnalle öljykerros ennen inkubointia. α -glukosidi, β -glukosidi, β -N-asetyyli-glukosamiini, ONPG, urea, eskuliini ja β -mannoosidi inkuboidaan ja tulkitaan sellaisenaan. VP-putkiin lisätään ennen tulkintaa reagenssit VP1 ja VP2. Positiivinen tulos on keltainen, paitsi arginiinilla ja VP:llä punainen ja eskuliinilla musta. Negatiivinen tulos on väritön tai haalean keltainen, paitsi arginiinilla ja VP:llä keltainen ja eskuliinilla vaalean harmaa. Arginiini, eskuliini, mannoosi, urea ja VP

testit erottavat *S. milleri* -ryhmän muista streptokokeista, muut testit erottelevat ryhmän lajit toisistaan.

Suoritus: Weetabs

Toisena kromogeenisenä testinä oli Weetabs-glykosiditabletit. Osa tableteista sisältää nitrofenolin lisäksi fluorogeenisen 4-metyyli-umbelliferyyli-komponentin (4MU) ja naftyyliamidin. Entsymaattisen hydrolyysin seurauksena substraalista vapautunut nitrofenyyli nähdään keltaisena värinä, naftyyliamidi punaisena ja 4MU fluoresenssina (kts. kohta 3.5.2). Tabletit ovat valmiiksi pienissä koeputkissa. Putket inokuloidaan 0.25-0.5 ml:llä steriiliin veteen tehtyä, sameudeltaan 3-4 McFarland-yksikköä vastaavaa bakteerisuspensiota ja inkuboidaan 2-4 tuntia +37 °C:ssa. Tableteilla testattiin seuraavat entsyymiaktiivisuudet: arginiini, β -fukosidaasi, α -glukosidaasi, β -glukosidaasi, β -galaktosidaasi (ONPG ja MBGA) ja β -N-asetyyli-glukosaminidaasi. β -galaktosidaasiaktiivisuus määritettiin siis kahdella erilaisella substraattilla, joista toinen on kromogeeninen o-nitrofenoli- β -D-galaktopyranosidi (ONPG) ja toinen fluorogeeninen 4MU- β -D-galaktosidi (MBGA). Osa testeistä on yhteen tablettiin sisällytettyjä kaksois- tai kolmoistestejä, jolloin ensimmäinen tulos luetaan suoraan inkuboinnin jälkeen, toinen UV-valossa ja kolmas 15 minuuttia aminopeptidaasi-reagenssin (PEP) lisäyksen jälkeen. Näitä ovat α -glukosidaasi/arginiini ja β -N-asetyyli-glukosaminidaasi/MBGA/trypsiini. Jälkimmäiseen kuuluva kolmatta testiä ei kuitenkaan tässä työssä tarvittu, koska sillä ei ole erotteluarvoa tutkitussa bakteeriryhmässä.

3.5.2 Fluorogeeninen substraattitesti

Fluorogeeninen substraattitesti on uusi, herkkä ja nopea menetelmä spesifisten entsyymien tunnistamiseen. Menetelmällä voidaan erottaa pieniäkin suhteellisia eroja entsyymiaktiivisuuksissa. Substraattiliuosta ja bakteerisuspensiota inkuboidaan, kunnes selkeä reaktio on havaittavissa. Substraatti-fluorogeeni-kompleksin hajoaminen vapauttaa substraattiin kytketyn 4-metyyli-umbelliferyyli-komponentin, joka fluoresoi UV-valossa (366 nm). Menetelmä ei vaadi kehitysreagenssia ja on jopa 1000 kertaa herkempi kuin vastaava kromogeeninen menetelmä. Näin ollen fluorogeeninen testi on yksinkertaisempi suorittaa ja tarvitsee pienemmät reaktiutilavuudet ja lyhyemmän inkubointiajan. Tulos näkyy nopeimmillaan jo muutamassa minuutissa tai viimeistään muutamassa tunnissa, yleisimmin inkuboidaan 3 tuntia. Voimakkaamman reaktion aikaansaamiseksi inkubointia voi jatkaa pidempään, ei kuitenkaan yön yli. Testi tehdään suodatinpaperilla tai kuoppalevyllä. Suuria

näytemääriä tutkittaessa kuoppalevyt ovat varsin käteviä ja tarvittavat suspensiotilavuudet pieniä. Harvoin suoritettaviin yksittäisiin testeihin suodatinpaperimenetelmä (spot test) on mielekkäämpi, mutta kuluttaa enemmän substraattia testiä kohden (Maiden ym., 1996; Moncla, 1991). Testijärjestelmässä on otettava huomioon, että tietyt sakkaridit, esim. glukoosi ja riboosi, inhiboivat fluorogeenisten substraattien hydrolyysiä (Schaufuss ym., 1986; Littel ym., 1983).

Suoritus: 4MU

4MU-menetelmää käytettiin Whiley ja Beighton'in kuvaamalla tavalla (Whiley ym., 1990). Käytetyt substraatit olivat β -fukosidi, α -glukosidi, β -glukosidi, ONPG, β -N-asetyyliagalaktosamiini, β -N-asetyyli-glukosamiini ja sialihappo. Substraatit liuotetaan dimetyylisulfoksidiin (10 mg/ml) varastoliuokseksi, jota säilytetään pakastimessa. Käyttöä varten varastoliuoksia laimennetaan puskuriliuoksella konsentraatioon 0.1 mg/ml. Työssä testattiin kahta eri puskuriliuosta, joilla oli erilaiset pH:t; 50 mM TES-puskuri pH 7.5 (Sigma) ja 1M Natriumfosfaattipuskuri pH 5.0. Molemmissa menetelmissä bakteerisuspensio tehtiin puskuriin niin, että suspensio vastasi sameudeltaan 4 McFarland-yksikköä. Kutakin puskuriin laimennettua substraattiliuosta otettiin 20 μ l ja inkuboitin 50 μ l bakteerisuspension kanssa kuoppalevyn kuopassa (Cliniplate, Labsystems, Helsinki) 0.5-4 tuntia. Positiiviset reaktiot tuottavat sinertävän kirkkaan fluoresenssin UV-lampulla (Mineralite UVSL-25 ja CC-10 Chromatoview Cabinet, Ilmonen Oy) tarkasteltaessa. Negatiiviset testit eivät fluoresoi. Positiivisina kontrolleina inkuboitin ATCC-vertailukannat *S. anginosus*, *S. constellatus* ja *S. intermedius*, negatiivisina kontrolleina olivat substraattiliuokset ja bakteerisuspensio yksinään. Rutiinin muodostuttua positiivisena kontrollina oli vain *S. intermedius*.

3.6 Rasvahappoanalyysi

Lipidit ovat bakteerimembraanien tärkein rakenneosia, erityisesti fosfolipidit ovat merkittävässä asemassa kalvojen toimivuuden kannalta. Lisäksi lipidejä on soluseinässä, granuloissa, flagelloissa ja pieniä määriä muualla solussa. Koska bakteerit sopeutuvat ympäristöönsä, myös niiden membraanien koostumus, rakenne ja toiminta ovat spesifisiä kullekin tietynlaisessa ympäristössä viihtyvälle bakteerille. Säilyttääkseen membraanien joustavuuden ympäristön olosuhteiden muuttuessa yksittäiset bakteerit voivat muuttaa lipidien rasvahappokoostumusta (Takagi ym., 1986). Rasvahappokoostumus muuttuu myös

bakteerin kasvuvaiheen mukaan ollen stabiilein myöhäisessä logaritmisessa kasvuvaiheessa. Nykyään tunnetaan 115 bakteerilipideistä eristettyä rasvahappoa, ne voivat olla suora- tai haaraketjuisia, tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä, hydroksi- tai syklopropanirasvahappoja. Monitydyttymättömät rasvahapot ovat bakteereilla harvinaisia. Lisäksi bakteerien kokonaisrasvahappomäärät vaihtelevat lajeittain, joten laadullisia ja määrällisiä yhdistelmiä on paljon. Spesifiset fosfolipidit ja solun kokonaisrasvahappokoostumus ovatkin oleellisia indikaattoreita bakteerien kemotaksoniassa. Usein määritetään fosfolipidien ja kokonaislipidien suhde tai fosfolipidien ja membraanilipidien suhde (Moss ym., 1982). Kaupallista rasvahappoihin perustuvaa tunnistusmenetelmää kutsutaan nimellä MIS (Microbial Identification System).

Kasvuston ikä, kasvutiheys maljalla, kasvatusalusta ja olosuhteet (lämpö, aika, kaasutila) vaikuttavat lipidikoostumukseen, joten koeolosuhteet on standardisoitava tarkasti ja säilytettävä muuttumattomina koko testisarjan ajan. Näin kunkin bakteerin rasvahappoprofiili säilyy muuttumattomana ja tulokset ovat luotettavia kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti (Drucker ym., 1981). Kasvatus voidaan suorittaa maljoilla tai liemessä. Tässä työssä kasvatus tapahtui PYG-liemessä.

Saatu bakteerimassa sentrifugoidaan, solut rikotaan, vapautuneet rasvahapot saippuoidaan natriumsuoloiksi, metyloidaan haihtuviksi metyyliestereiksi, uutetaan orgaaniseen faasiin ja pestään emäksellä. Näin ne on saatu puhtaiksi ja kromatografia-ajoa varten haihtuvaan muotoon. Analyysi on automatisoitu, joten se on helppo ja nopea. Analyysi suoritetaan kaasukromatografisesti (GC) tai korkean paineen nestekromatografiaa käyttäen (HPLC). Kromatogrammien piikit tunnistetaan retentioaikojen perusteella tunnettujen standardien avulla. MIS-systeemi tulostaa jokaisesta ajetusta bakteerikannasta kaasukromatogrammin, rasvahappokoosteraportin ja vertailukaavion. Rasvahappokoosteraportti sisältää eluoituneiden yhdisteiden retentioajat, nimet ja prosenttiosuudet sekä tunnistustuloksen todennäköisyyksineen. Vertailukaavioita yhdistämällä voidaan tehdä dendrogrammeja sukulaisuussuhteiden määrittämiseksi tai bakteerien ryhmittelemiseksi tiettyjen ominaisuuksien mukaan. Identifiointi rasvahappoprofiilien perusteella korreloi hyvin nykyisten taksonomisten sopimusten kanssa, mutta referenssikirjasto on vielä puutteellinen joissakin bakteeriryhmissä, joten tunnistamisen varmuus vaihtelee lajeittain (Moore ym., 1994).

Suoritus reagenssineen on esitetty liitteessä 8.2.

4.0 TULOKSET

Kaikki käytetyt entsyymimenetelmät (Rosco, Weetabs, 4MU, hyaluronidaasi) osoittautuivat toimiviksi. Menetelmät testattiin ensin vertailukannoilla ja “ajettiin sisään”, ennen kuin varsinaisia näytekantoja alettiin tutkia. Entsyymitestien tulokset korreloivat keskenään ja kirjallisuuden kanssa hyvin. Kannat karakterisoitiin, tunnistettiin lajitasolle ja lajien esiintyvyyttä kehon eri osissa voitiin vertailla.

Testatuista maljoista valittiin käyttöön verimalja ja Brucella-agar, näillä kasvu oli hyvää ja kasvustoa oli helpointa tutkia. Entsyymimääritykset antoivat keskenään hyvin korreloivia tuloksia kaikilla testatuilla maljoilla.

4.1 Tunnistus

S. milleri -ryhmän lajeista *S. intermedius* erottui muista helpoiten ollen positiivinen kaikissa entsyymitesteissä. *S. anginosus* ja *S. constellatus* ovat entsyymiprofiililtaan hyvin samankaltaisia, joten niiden erottaminen toisistaan oli astetta hankalampaa. Kahden viimeksi mainitun tunnistamisessa tärkeiksi erottaviksi testeiksi osoittautuivat erityisesti hyaluronidaasi- sekä α - ja β -glukosidaasitestit. Vertailukannat noudattivat kirjallisuudessa ilmoitettuja profiileitaan hyvin.

Tutkituista 102 *S. milleri* -kannasta tunnistettiin 58 *S. anginosus*-kantaa, 29 *S. constellatus*-kantaa, 10 *S. intermedius*-kantaa, 2 kantaa hylättiin tutkittujen kantojen rinnakkaisnäytteinä ja 3 kantaa hylättiin *S. milleri* -ryhmään kuulumattomina. Kaikilta *S. milleri* -kannoilta määritettiin entsyymiprofiilin lisäksi seroryhmä ja hemolytyisyys. Taulukossa 3 on esitetty tunnistuskriteereinä käytettyjen erilaisten entsyymiprofiilien osuudet lajikohtaisesti.

Taulukko 3. Tunnistuskriteereinä käytettyjen entsyymiprofiilien osuudet lajikohtaisesti. Kunkin lajin kohdalla vertailukannalla (ATCC, ref) saadut tulokset ensimmäisenä.

β-fuc		α-glu			β-glu			ONPG			β-NAG			G	Si	H	yht
M	W	M	W	R	M	W	R	M	W	R	M	W	R	M	M	S	
<i>S. anginosus</i>																	
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	ref
-	-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-/+	-	-	-	-	-	20
-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-/+	-	-	-	-	-	12
-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
-	-	-	-/+	-/+	+	+/-	+/-	-/+	-	-/+	-/+	-	-	-	-	-	12
-	-	-	-/+	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	-/+	-	-	-	-	-	13
																	58
<i>S. constellatus</i>																	
-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	ref
-	-	+	+	+	-/+	+	+	+/-	-	+	-/+	-	-	-	-	+	17
-	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-/+	-	-	-	-	+	4
-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	4
-	-	-	-	-/+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	4
																	29
<i>S. intermedius</i>																	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ref
+	+	+	+	+	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7
+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+	3
																	10

M: 4MU-substraatti

G: β-N-asetyyli-galaktosaminidaasi

W: Weetab

Si: Sialidaasi

R: Rosco

H: Hyaluronidaasi

S: Sigma

S. anginosus -kannoista valtaosa oli joko α- tai ei-hemolyyttisiä ja reaktiivisia ryhmälle F tai serologisesti ryhmittymättömiä. *S. constellatus* -kannoista valtaosa oli β-hemolyyttisiä ja reaktiivisia ryhmälle F tai C tai serologisesti ryhmittymättömiä. *S. intermedius* -kannoista valtaosa oli joko α- tai ei-hemolyyttisiä ja reaktiivisia ryhmälle F tai C tai serologisesti ryhmittymättömiä. Jakaumat on esitetty tarkemmin taulukoissa 3A, 3B ja 3C.

Hemolyttisyyden määrittämiseen α -hemolyysin kohdalla vaikutti kasvuston ikä ja kasvuolosuhteet niin, että mitä vanhempi kasvusto oli ja mitä aerobisemmissä oloissa kasvanut, sitä selvemmin α -hemolyttisyys näkyi. β -hemolyysi näkyi selvästi jo vuorokaudessa kasvuolosuhteista huolimatta. Kannoista vajaa kolmannes (29.9% 29/97) oli β -hemolyttisiä, α -hemolyttisiä oli saman verran (28.9% 28/97) ja 41.2% (40/97) ei-hemolyttisiä.

Seroryhmän testaus oli selkeä prosessi. Kannoista 66% (64/97) oli reaktiivisia jollekin seroryhmälle, useimmin ryhmälle F, melko usein ryhmälle C, muutama ryhmälle G ja yksi ryhmälle A.

Taulukko 3A. *S. anginosus* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

<i>Hemolyysi</i>	<i>Seroryhmä</i>				<i>Ei ryhmää</i>	<i>Yhteensä</i>
	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>A</i>		
α -hemolyysi	10		2		8	20 (34.5%)
β -hemolyysi	2	1	1	1		5 (8.6%)
γ -hemolyysi	15	6	1		11	33 (56.9%)
Yhteensä	27 (46.6%)	7 (12.1%)	4 (6.9%)	1 (1.7%)	19 (32.8%)	58 (100%)

Taulukko 3B. *S. constellatus* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

<i>Hemolyysi</i>	<i>Seroryhmä</i>				<i>Ei ryhmää</i>	<i>Yhteensä</i>
	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>A</i>		
α -hemolyysi		2			3	5 (18.5%)
β -hemolyysi	9	3	1		6	19 (70.3%)
γ -hemolyysi	1				2	3 (11.1%)
Yhteensä	10 (37.0%)	5 (18.5%)	1 (3.7%)		11 (40.7%)	29 (100%)

Taulukko 3C. *S. intermedius* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

<i>Hemolyysi</i>	<i>Seroryhmä</i>				<i>Ei ryhmää</i>	<i>Yhteensä</i>
	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>A</i>		
α -hemolyysi	2	1			1	4 (40.0%)
β -hemolyysi		1			1	2 (20.0%)
γ -hemolyysi	1				3	4 (40.0%)
Yhteensä	3 (30.0%)	2 (20.0%)			5 (50.0%)	10 (100%)

4.2 Menetelmien arviointi

4.2.1 Fluorogeeninen entsyymitesti

Fluorogeeninen 4MU-entsyymitesti antoi lopullisen tuloksen varsin pienillä substraattimäärillä (2 µg/testi) useimmin jo tunnissa ja osoittautui herkimmäksi ja nopeimmaksi kolmesta testatusta entsyymiprofilointimenetelmästä. Fluoresenssi on helppo todeta yksiselitteisesti kyllä tai ei -periaatteella. Fluoresenssin tarkastelu vaatii UV-lampun, UV-valon kanssa työskennellessä tarvittavia suojavälineitä ja tarkkuutta kuoppalevyn koordinaattien lukemisen kanssa. Lisäksi on tarkistettava, että positiiviset kaivot todella fluorisoivat, eivätkä vain heijasta viereisten kaivojen fluoresenssiä. Fluorisointi näkyy parhaiten, kun kuoppalevyä katsotaan kohtisuoraan ylhäältäpäin. Testin onnistuminen edellyttää tarkkaa työskentelyä substraattiliuoksia valmistettaessa ja huolellista pipetointia kuoppalevyn kaivoihin.

Fluorogeeninen entsyymitesti on tehtävä kaupallisista 4-metyyli-umbelliferyyli-substraattijauheista eteenpäin itse. Kun systeemin saa pystyyn, on menetelmä varsin kätevä etenkin suurille näytemäärille. Kuoppalevyjä käytettäessä tarvittavat substraattimäärät ja bakteerisuspensiotilavuudet ovat varsin pieniä, mikä tekee menetelmästä kustannuksiltaan edullisen. Substraattiliuokset voi pipetoida kuoppalevyille valmiiksi ja varastoida pakkaseen. Levyjä sulatetaan aina tarpeen mukaan, jolloin testipäivänä voidaan pipetoida bakteerisuspensio valmiille levyille. Eri substraattien hinnat vaihtelivat Sigmalla jopa satakertaisesti ollen halvimmillaan alle penni/testi (β -glukosidaasi) ja kalleimmillaankin vain vajaa 15 penniä/testi (β -N-asetyyliglukosaminidaasi, sialidaasi).

Käytetyt kaksi pH-arvoiltaan erilaista puskuriliuosta antoivat yhteneviä tuloksia. Kuitenkin siten, että natrium-fosfaattipuskuri (pH 5.0) ei aina tuottanut yhtä kirkasta fluoresenssia kuin TES-puskuri (pH 7.5). Lisäksi muutamassa tapauksessa fluoresenssia ei NaP-puskurilla ilmaantunut lainkaan, vaikka muut menetelmät antoivat positiivisen tuloksen. Koska TES-puskuri antoi herkemmin selkeitä tuloksia ja oli siten mielekkäämpi käyttää, NaP-puskurin käytöstä luovuttiin työn alkuvaiheessa. Työssä ei käynyt ilmi, johtuiko alhaisemman pH:n alempi herkkyys entsyymin aktiivisen pH-alueen alittamisesta, pH:sta aiheutuvasta substraattien käyttökelpoisuuden tai affiniteetin muutoksesta vai jostain muusta esim. fluoresenssin detektioon liittyvästä seikasta. Valtaosa näytekantojen analyyseistä tehtiin siis vain TES-puskurilla, jolloin ONPG-substraattia ja muutamaa β -N-

asetyyli-glukosaminidaasitestiä (β -NAG) lukuun ottamatta kaikki 4MU-substraatit tuottivat kirkkaan fluoresenssin tai eivät fluoresoineet lainkaan.

4.2.2 Kromogeeniset entsyymitestit

Molemmat kromogeeniset testit ovat suorittamisen kannalta varsin selkeitä, eivätkä siirrostusvaiheessa vaadi ehdotonta aseptiikkaa. Bakterimaljoilla on tietenkin ehdottomasti oltava puhtasviljelmiä. Kromogeenisillä testeillä värin kylläisyys vaihtelee portaattomasti esim. haalean keltaisesta voimakkaan keltaiseen, jolloin rajan veto negatiivisen ja positiivisen näytteen välille ei aina ole täysin ongelmaton. Tällöin myös vaihtelu eri työntekijöiden tulkintojen välillä kasvaa. Toisaalta putkessa tapahtuva värireaktio on fluoresenssiin verrattuna käytännössä helpompi todeta suoraan koeputkesta ilman lisälaitteita. Weetabs ja Rosco ovat 4MU-testiä selvästi kalliimpia, eikä eri substraattien hintojen välillä ole juuri eroa. Weetabs maksaa n.1.4 mk/testi ja Rosco n.1.9-2.8 mk/testi.

Weetabs-tabletit ovat valmiiksi merkityissä pienissä koeputkissa, joten siirrostaminen bakteerisuspensiolla oli nopeaa ja helppoa. Menetelmä ei kaikkien substraattien osalta ollut yhtä herkkä kuin toiset menetelmät ja reaktioiden tuottamat värit jäivät useammin melko vaaleiksi verrattuna värin intensiteettiin Roscon testillä. Fluorisointi oli yleensä selkeä, joskin senkin intensiteetti vaihteli hieman. Tulos oli kuitenkin yleensä selvästi luettavissa.

Siirrostusvaiheessa Rosco-entsyymitesti vaatii suurimmat siirrostustilavuudet ja siten eniten bakteerimassaa. Lisäksi putkien merkitseminen, tablettien jakaminen putkiin ja pisin inkubaatioaika tekivät menetelmästä eniten aikaavievän ja työläimmän. Tulosten lukemiseen ohjeiden tulisi olla tarkemmat värisävyjä ja värin voimakkuutta koskien.

4.3 Testien herkkyys

Entsyymiprofiilit noudattivat kirjallisuusprofiileita hyvin (taulukko 4A). Vaihtelua saman lajin eri kantojen välillä esiintyi kirjallisuudessaakin vaihtelua sisältävissä aktiivisuuksissa, näitä ovat α - ja β -glukosidaasi ja β -galaktosidaasi. Samoilla testeillä löytyi myös menetelmien välisiä eroja. 4MU-substraatit olivat β -galaktosidaasi- ja β -N-asetyyli-glukosaminidaasi-määrittelyissä herkempiä, mutta α - ja β -glukosidaasi-määrittelyissä keskimäärin vähemmän herkkiä kuin kromogeeniset testit. Seuraavassa tarkastellaan

vaihtelua tarkemmin. Kahdella menetelmällä testattu β -fukosidaasiaktiivisuus oli molemmilla menetelmillä kaikilla *S. intermedius* -kannoilla positiivinen ja muilla kannoilla negatiivinen.

Taulukko 4A. Vertailu tässä työssä saatujen ja odotettujen (Whiley ym., 1990) positiivisten tulosten prosenttiosuudet.

Entsyymi	<i>S. anginosus</i>				<i>S. constellatus</i>				<i>S. intermedius</i>			
	Exp	Mu	We	Ro	Exp	Mu	We	Ro	Exp	Mu	We	Ro
β -fukosidaasi	0	0	0	-	0	0	0	-	100	100	100	-
α -glukosidaasi	19	41	53	67	90	79	86	90	100	80	90	100
β -glukosidaasi	96	91	79	95	2	24	69	76	47	70	100	80
β -galaktosidaasi	0	79	19 ^a	45	2	76	28 ^a	48	100	100	100	100
	-	-	93 ^b	-	-	-	90 ^b	-	-	-	100	-
β -N-asetyyli-ga laktosaminidaasi	0	0	-	-	0	0	-	-	100	100	-	-
β -N-asetyyli- glukosaminidaasi	0	28	0	3.4	0	7	0	0	100	100	80	100
Sialidaasi	0	0	-	-	0	0	-	-	100	90	-	-
Hyaluronidaasi ^c	4	2	-	-	88	100	-	-	98	100	-	-

Exp: odotettu (Whiley et al 1990)

-substraattia ei saatavilla

Mu: 4-metyyli-umbelliferyyli-substraatti (Sigma)

^a ONPG substraatti

We: Weetabs (Key Scientific)

^b MBGA substraatti

Ro: Rosco Diagnostic tablets (Rosco)

^c ei-fuorisoiva menetelmä (Smith & Willet -68)

4.3.1 α - ja β -glukosidaasi

Tulokset on esitetty prosentteina lajeittain eriteltyinä taulukossa 4B (1 ja 2). 97 kannasta 4MU-testi antoi 10 kannalle α -glu-negatiivisen tuloksen ja 8 kannalle β -glu-negatiivisen tuloksen, kun Rosco ja Weetabs määrittivät samat kannat vastaavissa aktiivisuuksissa positiivisiksi.

Vastaavasti Rosco määrittä 8 α -glu- ja 2 β -glu-positiivista kun 4MU ja Weetabs määrittivät samat kannat negatiivisiksi.

Weetabs määrittä 8 β -glu-negatiivista tai antoi vain hyvin heikon reaktion, kun muut menetelmät antoivat positiivisen tuloksen.

Taulukko 4B (1). α -glukosidaasi-positiivisten osuudet menetelmä- ja lajikohtaisesti.

Menetelmä	α -glukosidaasi-positiivisia		
	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>
4MU	41.4% (24/58)	79.3% (23/29)	80.0% (8/10)
Weetabs	53.4% (31/58)	86.2% (25/29)	90.0% (9/10)
Rosco	67.2% (39/58)	89.7% (26/29)	100% (10/10)
Keskiarvo	54.0% (31.3/58)	85.1% (24.6/29)	90.0% (9/10)

Taulukko 4B (2). β -glukosidaasi-positiivisten osuudet menetelmä- ja lajikohtaisesti.

Menetelmä	β -glukosidaasi-positiivisia		
	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>
4MU	91.4% (53/58)	24.1% (7/29)	70.0% (7/10)
Weetabs	79.3% (46/58)	69.0% (20/29)	100% (10/10)
Rosco	94.8% (55/58)	75.9% (22/29)	80.0% (8/10)
Keskiarvo	88.5% (51.3/58)	56.3% (16.3/29)	83.3% (8.3/10)

S. anginosus-kannoista α -glukosidaasi-positiivisia löytyi keskimäärin 54.0% ja maksimissaan 67.2%; β -glukoosi-positiivisia 88.5% ja 94.8% vastaavasti. Kirjallisuuden mukaan valtaosa *S. anginosus* -kannoista on α -glukosidaasi-negatiivisia ja β -glukosidaasi-positiivisia, mutta vaihtelua esiintyy.

S. constellatus -kannoista α -glukosidaasi-positiivisia löytyi keskimäärin 85.1% ja maksimissaan 89.7%; β -glukosidaasi-positiivisia 56.3% ja 75.9%. Suurin menetelmien välinen ero oli β -glukosidaasiaktiivisuuksissa, joissa 4MU-testi tuotti muihin menetelmiin verrattuna selkeästi pienimmän osuuden positiivisia ja Rosco suurimman. Kirjallisuuden mukaan valtaosa *S. constellatus* kannoista on α -glu-positiivisia ja β -glu-negatiivisia, mutta vaihtelua esiintyy.

S. intermedius -kannoista α -glukosidaasi-positiivisia löytyi keskimäärin 90.0% ja maksimissaan 100%; β -glukosidaasi-positiivisia 83.3% ja 100%. Suurin ero oli jälleen 4MU-

testin muita pienemmässä osuudessa β -glukosidaasi-positiivisia. Kirjallisuudessa *S. intermedius* luokitellaan α - ja β -glukosidaasi-positiiviseksi.

4.3.2 β -galaktosidaasi (ONPG, MBGA)

Herkkyys eri menetelmien välillä vaihteli eniten β -galaktosidaasiaktiivisuutta mittaavissa ONPG- ja MBGA-testeissä. ONPG oli myös tulkinnan kannalta ongelmallisin testi. Sigman fluorogeenitestissä muista substraateista poiketen se tuotti himmeän, mutta selvästi havaittavan fluoresenssin lähes 80% *S. anginosus* ja *S. constellatus* -kannoista, jotka kirjallisuuden mukaan ovat ONPG-negatiivisia. Kirjallisuuden mukaan positiivinen *S. intermedius* tuotti kirjallisuutta noudattaen kirkkaan fluoresenssin kaikilla *S. intermedius*-kannoilla.

Myös Roscon ja Weetabsin testit antoivat ONPG-positiivisia *S. anginosus* ja *S. constellatus* -kantoja, mutta huomattavasti harvemmin kuin fluorogeeninen testi; Rosco alle puolet, Weetabs 20-30% (taulukko 4C). Vastaavasti kaikki *S. intermedius* -kannat olivat molemmilla kromogeenisillä menetelmillä ONPG-positiivisia. Weetabsin fluorogeeninen β -galaktosidaasitesti (MBGA) erosi kromogeenisistä testeistä ja Sigman fluorogeenisestä testistä ollen näitä huomattavasti herkempi. *S. anginosus* ja *S. constellatus* -kannoista n.90% määrittyi β -glukosidaasi-positiivisiksi. β -galaktosidaasimääritykset ovat aikaisemmissakin vertailuissa antaneet huomattavaa vaihtelua sisältäneitä tuloksia (Houang ym., 1995).

Taulukko 4C. β -galaktosidaasi-positiivisten osuudet menetelmä- ja lajikohtaisesti.

Menetelmä	β-galaktosidaasi-positiivisia		
	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>
4MU, ONPG (Sigma)	79.3% (46/58)	75.9% (22/29)	100% (10/10)
Weetabs, ONPG	18.9% (11/58)	27.6% (8/29)	100% (10/10)
Weetabs, MBGA	93.1% (54/58)	89.7% (26/29)	100% (10/10)
Rosco, ONPG	44.8% (26/58)	48.3% (14/29)	100% (10/10)
Keskiarvo	59.0% (34.3/58)	60.4% (17.5/29)	100% (10/10)

4.3.3 β -N-asetyyli-glukosaminidaasi (β -NAG)

β -N-asetyyli-glukosaminidaasiaktiivisuus määritettiin kolmella menetelmällä; Roscon ja Weetabsin tableteilla sekä Sigman 4MU-substraatilla (taulukko 4D). 4MU-testi oli herkin antaen eniten positiivisia tuloksia. Kaikki menetelmät määrittivät *S. intermedius* -kannat kirjallisuutta noudattaen positiivisiksi, lukuun ottamatta kahta kantaa, jotka Weetabs määritti negatiivisiksi. Kirjallisuuden mukaan negatiivisista *S. anginosus* -kannoista Roscon testi määritti 2 kantaa positiivisiksi ja 2 heikosti positiivisiksi. Weetabs määritti 2 kantaa heikosti positiivisiksi. 4MU määritti 16 kantaa positiivisiksi ja 9 heikosti positiivisiksi. Kirjallisuuden mukaan negatiivisista *S. constellatus* -kannoista vain 4MU antoi positiivisia tuloksia; 2 positiivista ja 2 heikosti positiivista kantaa. Taulukossa 4D on esitetty vain selkeästi positiiviset tulokset.

Taulukko 4D. β -N-asetyyli-glukosaminidaasi-positiivisten osuudet menetelmä- ja lajikohtaisesti.

Menetelmä	β -NAG positiivisia		
	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>
4MU	27.6% (16/58)	6.9% (2/29)	100% (10/10)
Weetabs	0%	0%	80.0% (8/10)
Rosco	3.4% (2/58)	0%	100% (10/10)
keskiarvo	10.3% (6/58)	2.3% (0.67/29)	93.3% (9.3/10)

4.3.4 Muut entsyymitestit

Vain yhdellä menetelmällä testatut hyaluronidaasi, β -N-asetyyli-galaktosaminidaasi ja sialidaasi tuottivat muiden tulosten kanssa johdonmukaisia ja selkeitä tuloksia ollen oleellinen osa testisarjaa. *S. intermedius* -kannat olivat kirjallisuutta noudattaen positiivisia kaikissa näissä testeistä, lukuun ottamatta yhtä kantaa, joka oli sialidaasi-negatiivinen. Kaikki *S. constellatus* -kannat olivat kirjallisuutta noudattaen hyaluronidaasi-positiivisia ja muissa näistä testeistä negatiivisia. *S. anginosus* -kannat olivat odotetusti kaikissa näistä testeistä negatiivisia, yhtä kantaa lukuun ottamatta, joka oli hyaluronidaasi-positiivinen.

4.4 Rasvahappoanalyysi

Yhteensä 14 entsyymimenetelmällä jo tunnistettua, umpisuolinäytteistä eristettyä kantaa valittiin rasvahappoanalyysiin. *S. anginosus* ja *S. constellatus* -kantoja otettiin kumpaakin viisi ja *S. intermedius* -kantoja neljä, lisäksi analysoitiin kunkin lajin vertailukanta. Analyysi tunnisti rasvahapot, muttei onnistunut lajien identifioinnissa eikä lajien mukaisessa ryhmittelyssä. Lisäksi näytteiden valmistaminen oli entsyymimenetelmiin verrattuna työlästä. Vertailukannoista MIS tunnisti oikein vain *S. anginosus* -kannan. Kaikki näytekannat tunnistettiin kolmea *S. constellatus* -kantaa lukuun ottamatta ensisijaisesti streptokokeiksi, mutta täysin oikein vain kerran (*S. anginosus*). *S. constellatus* -kannoista kolmen ensisijainen tunnistus oli *Clostridium clostridiforme*. Muut yleisimmät identifiointitulokset olivat *Streptococcus intermedius*, *S. parasanquis*, *S. gordonii*, *S. oralis* ja *S. M7*.

Lajit eivät myöskään ryhmittyneet dendrogrammissa tai pääkomponenttianalyysissä selvästi erilleen omiksi ryhmikseen. Ainoastaan *S. anginosus* -kannat, vertailukantaa lukuun ottamatta, ryhmittyivät samaan haaraan, mutta jäivät suhteellisen etäälle toisistaan, osittain jopa lajirajan ulkopuolelle. Euklidinen etäisyys (ED) 10 on lajiraja, 6 alalaji- tai biotyypiraja ja 2.5 kantaraja. *S. constellatus* ja *S. intermedius* ryhmittyivät keskenään sekaisin ja osittain niin hajalleen, että lajiraja ylittyi useasti. Rasvahappomääritys ei tässä työssä soveltunut lajitason tunnistukseen, joten määrittäisiä ei tehty lopuille kannoille. Dendrogrammi ja komponenttianalyysi tulokset on esitetty liitteessä 7.3.

4.5 Esiintyvyys kehon eri osissa

Näytekannat jaettiin viiteen ryhmään näytteenottoaikan (infektion) sijainnin mukaan:

I urogenitaalialue, naiset, 15 kantaa (vagina 14, virtsa 1).

II urogenitaalialue, miehet, 8 kantaa (virtsaputki 4, esinahka 4).

III oraali 28 kantaa (suuontelo 5, nielu 5, leukaluu 4, poskiontelo 14).

IV umpisuoli 34 kantaa.

V muut 12 kantaa (haava 7, silmä 1, korva 1, sappirakko 1, luuydin 1, munuaiskasvain1).

Jako on melko laava, mutta jakaa kannat selvästi kehon eri osiin. Eri ryhmien sisäiset jakaumat seroryhmän ja hemolyytisyyden suhteen on esitetty taulukoissa 5A ja 5B. Eri lajien välinen jakauma näytteenottoaikan suhteen on esitetty taulukossa 5C.

Seuraavassa kerrotaan esiintyvyys kehon eri osissa ensin pääpiirteittäin, sitten kukin ryhmä tarkemmin eriteltynä.

Taulukko 5A. Kantojen jakauma seroryhmän suhteen, lajeja ei ole eritelty.

	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
Urogen (I)	12 (80.0%)				3 (20.0%)	15 (100%)
Urogen(II)	3 (37.5%)				5 (62.5%)	8 (100%)
Oraali (III)	8 (28.6%)	6 (21.4%)			13 (50.0%)	28 (100%)
Umpis (IV)	9 (26.5%)	8 (23.5%)	4 (11.8%)	1 (2.9%)	12 (35.3%)	34 (100%)
Muut (V)	9 (75.0%)		1 (8.3%)		2 (16.7%)	12 (100%)
Yhteensä	41 (42.3%)	14 (14.4%)	5 (5.2%)	1 (1.0%)	36 (37.1%)	97 (100%)

Taulukko 5B. Kantojen jakauma hemolytyyisyyden suhteen, lajeja ei ole eritelty.

	Hemolyysi			Yhteensä
	α	β	γ	
Urogen (I)	4 (26.7%)		11 (73.3%)	15 (100%)
Urogen (II)	2 (25.0%)		6 (75.0%)	8 (100%)
Oraali (III)	9 (32.1%)	12 (42.9%)	7 (25.0%)	28 (100%)
Umpis (IV)	8 (23.5%)	12 (35.3%)	14 (41.2%)	34 (100%)
Muut (V)	7 (58.3%)	3 (25.0%)	2 (16.7%)	12 (100%)
Yhteensä	30 (30.9%)	27 (27.8%)	40 (41.2%)	97 (100%)

Taulukko 5C. Eri lajien välinen jakauma näytteenottoaikan suhteen (Ryhmät I-V).

Infektioalue	<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. intermedius</i>	Yhteensä
Urogenitaali I	100% (15)			15 (100%)
Urogenitaali II	87.5% (7)	12.5% (1)		8 (100%)
Oraali III	39.3% (11)	42.9% (12)	17.9% (5)	28 (100%)
Umpisuoli IV	50.0% (17)	38.2% (13)	11.8% (4)	34 (100%)
Muut V	66.7% (8)	25.0% (3)	8.3% (1)	12 (100%)
Yhteensä	59.8% (58)	27.8% (29)	10.3% (10)	97 (100%)

Urogenitaalialueella (ryhmät I ja II) ei- β -hemolytyttiset seroryhmälle F reaktiiviset *S. anginosus* -kannat olivat selkeästi vallitseva biotyyppe (Taulukko 6A,B). Seroryhmistä tavattiin vain ryhmää F.

Oraalisista (ryhmä III) kannoista *S. anginosus* ja *S. constellatus* muodostivat yhtä suuret osuudet ja *S. intermedius* puolta pienemmän vähemmistön (Taulukko 7A-C). Etenkin *S. constellatus* -kannoilla β -hemolyysi oli yleinen, seroryhmistä tavattiin ryhmiä F ja C.

Umpisuolikannoista (ryhmä IV) puolet oli *S. anginosus* -kantoja, vajaa 40% *S. constellatus* ja loput n.10% *S. intermedius* -kantoja (Taulukko 8A-C). β -hemolyysi oli etenkin *S. constellatus* -kannoilla yleinen, seroryhmistä esiintyi kaikkia testattuja ryhmiä.

Sekalaisessa ryhmässä (V) kannoista reilusti yli puolet oli ei- β -hemolyyttisiä *S. anginosus* -kantoja, neljännes kannoista oli β -hemolyyttisiä *S. constellatus* -kantoja ja yksi oli *S. intermedius* (Taulukko 9). Tässä ryhmässä kantojen vähäinen lukumäärä antaa sattumalle suuren merkityksen.

Esiintyvyys erilaisissa infektioissa myötäili varsin selvästi aikaisemmissa tutkimuksissa saatuja tuloksia. Taulukossa 5D on rinnakkain kahdessa aikaisemmassa ja tässä työssä saadut tulokset eri lajien esiintyvyydestä tietyissä infektioissa. Näytteenottoaikoja on jouduttu hieman mukailemaan; tämän työn oraaliset näytekannat rinnastetaan kirjallisuusviitteiden hengitysteihin liittyviin (respiratory) kantoihin ja umpisuolikannat kirjallisuusviitteiden ruoansulatuskanavaan liittyviin (gastrointestinal) kantoihin.

Taulukko 5D. Vertailu *S. milleri* -ryhmän eri lajien esiintyvyydestä erilaisissa infektioissa tässä työssä (M) ja kahdessa aikaisemmassa tutkimuksessa (Whiley ym., 1992 (W); Ruoff ym., 1995 (R)).

Infektiopaikka	<i>S. anginosus</i> %			<i>S. constellatus</i> %			<i>S. intermedius</i> %		
	M	W	R	M	W	R	M	W	R
Urogenitaalialue	94	91	80	6	9	20	0	0	0
Hengitysteihin liittyvät	39	29	42	43	57	42	18	14	17
Ruoansulatuskanavaan liittyvät	50	79	50	38	17	25	12	4	25
Iho,pehmytkudos, luu	67	53	50	25	26	33	8	21	17

4.5.1 Urogenitaalialueet (Ryhmät I ja II)

Urogenitaalialueella *S. anginosus* oli vallitseva laji. Ryhmän I kaikki kannat ja ryhmän II kaikki yhtä lukuun ottamatta olivat samaa lajia. Kummassakaan ryhmässä ei ollut yhtään β -hemolyyttistä kantaa. Naisilla suurin osa ja miehillä vajaa puolet kannoista kuului seroryhmään F, loput olivat serologisesti ryhmittymättömiä. Lajin sisäinen jakauma hemolyyttisyyden ja seroryhmien suhteen on esitetty taulukoissa 6A ja 6B.

Miesten urogenitaalialueen (ryhmä II) kannoista 87.5% (7/8) oli *S. anginosus* -lajia. Yksi kanta (12.5%) kuului *S. constellatus* -lajiin. Kanta oli ei-hemolyyttinen ja serologisesti ryhmittymätön.

Taulukko 6A. Naisten urogenitaalialueen *S. anginosus* -kantojen jakauma hemolyyttisyyden ja seroryhmän suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi	4					4 (26,7%)
β -hemolyysi					3	11 (73.3%)
γ -hemolyysi	8					
Yhteensä	12 (80.0%)				3 (20.0%)	15 (100%)

Taulukko 6B. Miesten urogenitaalialueen *S. anginosus* -kantojen jakauma hemolyyttisyyden ja seroryhmän suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi	1				1	2 (28.6%)
β -hemolyysi					3	5 (71.4%)
γ -hemolyysi	2					
Yhteensä	3 (42.8%)				4 (57.1%)	7 (100%)

4.5.2 Oraaliset (Ryhmä III)

Oraalisista kannoista 39.3% (11/28) oli *S. anginosus*, 42.9% (12/28) *S. constellatus* ja 17.9% (5/28) *S. intermedius* -kantoja. β -hemolyysi oli yleinen; *S. constellatus* -kannoista suurin osa,

S. intermedius -kannoista 20% ja *S. anginosus* -kannoista vajaa 10% oli β -hemolyyttisiä. Kaikilla lajeilla seroryhmät F ja C olivat yhtä yleisiä eikä muita seroryhmiä tavattu. *S. anginosus* ja *S. intermedius* -kannoista yli puolet ja *S. constellatus* -kannoista vajaa kolmannes oli serologisesti ryhmittymättömiä. Lajien sisäinen, tarkempi jakauma on esitetty taulukoissa 7A, 7B ja 7C.

Taulukko 7A. Oraalisen ryhmän *S. anginosus* -kantojen jakauma hemolyyttisyyden ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi	1				5	6 (54.5%)
β -hemolyysi		1				1 (9.1%)
γ -hemolyysi	1	1			2	4 (36.4%)
Yhteensä	2 (18.2%)	2 (18.2%)			7 (36.6%)	11 (100%)

Taulukko 7B. Oraalisen ryhmän *S. constellatus* -kantojen jakauma hemolyyttisyyden ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi		1			1	2 (16.7%)
β -hemolyysi	5	2			3	10 (83.3%)
γ -hemolyysi						
Yhteensä	5 (41.7%)	3 (25.0%)			4 (33.3%)	12 (100%)

Taulukko 7C. Oraalisen ryhmän *S. intermedius* -kantojen jakauma hemolyyttisyyden ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi		1				1 (20.0%)
β -hemolyysi					1	1 (20.0%)
γ -hemolyysi	1				2	3 (60.0%)
Yhteensä	1 (20.0%)	1 (20.0%)			3 (30.0%)	5 (100%)

4.5.3 Umpisuolikannat (Ryhmä IV)

Umpisuolikannoista 50.0% (17/34) oli *S. anginosus*, 38.2% (13/34) *S. constellatus* ja 11.8% (4/34) *S. intermedius* -kantoja. β -hemolyysi oli yleinen; *S. constellatus* -kannoista yli puolet, *S. intermedius* -kannoista neljännes ja *S. anginosus* -kannoista vajaa viidennes oli β -hemolyyttisiä. Ryhmä IV oli serologisesti heterogeenisin, seroryhmät F ja C olivat yleisimpiä, ryhmä G seuraavaksi yleisin ja ryhmä A tavattiin kerran. Lajien sisäiset jakaumat on esitetty tarkemmin taulukoissa 8A, 8B ja 8C.

Taulukko 8A. Umpisuoliryhmän *S. anginosus* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi	1		1		1	3 (17.6%)
β -hemolyysi	1		1	1		3 (17.6%)
γ -hemolyysi	3	5	1		2	11 (64.7%)
Yhteensä	5 (29.4%)	5 (29.4%)	3 (17.6%)	1 (5.8%)	3 (17.6%)	17 (100%)

Taulukko 8B. Umpisuoliryhmän *S. constellatus* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi		1			2	3 (23.1%)
β -hemolyysi	2	1	1		4	8 (61.5%)
γ -hemolyysi	1				1	2 (15.4%)
Yhteensä	3 (23.1%)	2 (15.4%)	1 (7.8%)		7 (53.8%)	13 (100%)

Taulukko 8C. Umpisuoliryhmän *S. intermedius* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi	1				1	2 (40.0%)
β -hemolyysi		1				1 (25.0%)
γ -hemolyysi					1	1 (25.0%)
Yhteensä	1 (25.0%)	1 (25.0%)			2 (50.0%)	4 (100%)

4.5.4 Ryhmä V

Sekalaisessa ryhmässä *S. anginosus* oli yleisin (66,7%, 8/12) *S. constellatus* toiseksi yleisin (25.0%, 3/12) ja *S. intermedius* löytyi vain kerran (8.3%, 1/12). *S. constellatus* -kannat olivat kaikki β -hemolyyttisiä ja reaktiivisia seroryhmälle F. Muilla lajeilla β -hemolyysiä ei esiintynyt. *S. intermedius* -kanta oli α -hemolyyttinen ja reaktiivinen seroryhmälle F. *S. anginosus* -kannoilla seroryhmä F oli yleisin, myös ryhmä G oli edustettuna. Neljännes *S. anginosus* -kannoista oli serologisesti ryhmittymättömiä, tarkempi jakauma on esitetty taulukossa 9. Muita lajeja ei kantojen vähäisyyden vuoksi ole taulukoitu.

Taulukko 9. Ryhmän V *S. anginosus* -kantojen jakauma hemolyysin ja seroryhmien suhteen.

Hemolyysi	Seroryhmä				Ei ryhmää	Yhteensä
	F	C	G	A		
α -hemolyysi	4		1		1	6 (75.0%)
β -hemolyysi						
γ -hemolyysi	1				1	2 (25.0%)
Yhteensä	5(62.5%)		1 (12.5%)		2 (25.0%)	8 (100%)

5.0 TULOSTEN TARKASTELU

Asetetut tavoitteet saavutettiin. Eri lajit noudattivat entsyymiprofiiliaan muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta hyvinkin säännöllisesti. Lajien sisäinen variaatio hemolyysiominaisuuksissa oli merkittävää ja *S. milleri* -ryhmän eri lajien sekä hemolyysiltään ja seroryhmältään erilaisten kantojen esiintyvyydessä kehon eri osissa havaittiin selkeitä eroja.

Osa havaitusta kantojen välisestä variaatiosta voi johtua suorittamiseen liittyvistä epävarmuustekijöistä. Näitä ovat mm. huomaamatta jääneet kontaminaatiot, pipetointivirheet sekä satunnainen vaihtelu maljojen koostumuksessa tai kasvatusolosuhteissa. Siirroksen tiheys vaikuttaa reaktion voimakkuuteen, joten jos suspensiota ei ole sekoitettu kunnolla ennen pipetointia, saattavat jotkut reaktiot jäädä heikoiksi liian laimean bakteerisuspension vuoksi. Lisäksi erot värien sävyissä ja voimakkuuksissa vaikeuttivat tulkintaa. Menetelmien väliset erot voivat johtua mm. eroista substraattien herkkyyksissä tai niiden käyttökelpoisuudessa kullekin entsyymille liittyen bakteerisolun läpäisevyyteen tai entsyymin aktiivisten kohtien topologiaan (Maiden ym., 1996).

Rasvahappoanalyysi todettiin toivotun lajien mukaisen ryhmittelyn epäonnistumisen sekä lajitunnistamisen epätarkkuuden vuoksi tähän työhön sopimattomaksi menetelmäksi.

Käytetyt entsyymimenetelmät yhdessä tekivät lajien tunnistamisesta melko helppoa. *S. milleri* -ryhmään kuuluvat kolme lajia ovat heterogeenisiä, sisältävät karakterisoitavissa olevia biotyyppejä ja ovat selvästi toisistaan erotettavissa. Mikään kolmesta vertaillusta entsyymimenetelmästä ei osoittautunut selkeästi toisia paremmaksi, jokainen antoi toistettavia tuloksia ja jokaisella menetelmällä oli omat etunsa. Mikään menetelmä ei yksinään riittäisi tunnistamiseen, sillä osa kannoista vaatii aina varmistustestejä. Hyaluronidaasitesti oli tärkeä lisä ennaltamuodostuneiden entsyymien havaitsemiseen perustuvien testien ohelle. Testatusta kahdesta puskuriliuoksesta pH-arvoltaan lähempänä neutraalia oleva osoittautui paremmin tähän työhön sopivaksi antaen herkemmin ja useammin selkeitä positiivisia tuloksia kuin hapan puskuri. On huomattava, että toivotun entsyymaattisen substraatin hajoamisreaktion optimi pH ja fluoresenssin suurimman intensiteetin tuottava pH-arvo voivat poiketa toisistaan oleellisestikin. Tällöin inkubointi voidaan suorittaa entsyymin optimi pH:ssa ja muuttaa pH-arvoa ennen fluoresenssin lukemista lisäämällä puskuria, joka nostaa pH-olosuhteet fluoresenssille suotuisiksi eli lähelle pH-arvoa 10.3 (Hoppe, 1993; Münster ym., 1989). Fluoresenssin intensiteetti kasvaa merkittävästi jo pH-arvosta 7 lähtien, joten tässä työssä fluoresenssin lukua varten pH-arvoa ei erikseen kohotettu.

Kustannuksiltaan 4MU-testi on halvin ja substraattireaktioltaan nopein, mutta vaatii eniten valmistelua ja on kätevimmillään nimenomaan suurilla näytemäärillä. Weetabs oli helpoin suorittaa ja soveltuu hyvin myös yksittäisten kantojen testaukseen. Rosco oli kallein, joskaan ei juuri kalliimpi kuin Weetabs, ja vaati eniten putkien, maljojen ja reagenssien kanssa puuhailua, mutta oli muuten selkeä ja helppo menetelmä, joka soveltuu myös yksittäisten kantojen testaukseen. Molemmilla kromogeenisillä menetelmillä suurin haitta oli värisävykarttojen puuttuminen tulosten tulkinnan selkeyttämiseksi. Vastaavaan tutkimukseen suosittelisin 4MU-testiä, jonka lisänä on hyaluronidaasitesti. Minimissään *S. milleri* -ryhmän lajien erotteluun tarvitaan 4 entsyymitestiä: β -fukosidaasi, α - ja β -glukosidaasi ja hyaluronidaasi.

6.0 KIITOKSET

Lämmin kiitos työni ohjaajalle Hannele Jousimies-Somerille, Merja Rautiolle sekä Marjalle, Annelle ja Arjalle.

7.0 KIRJALLISUUSVIITTEET

Arala-Chaves, M.P., Higerd, T.B., Porto, M.T. et al: Evidence for the synthesis and release of strongly immunosuppressive, non-cytotoxic substances by *Streptococcus intermedius*, J. Clin. Invest. 64:871, 1979.

Arala-Chaves, M.P., Porto, M.T., Arnaud, P., Saraiva, M.J., Geada, H., Patric, C.C., Fudenberg, H.H.: Fractionation and characterization of the immunosuppressive substance in crude extracellular products released by *Streptococcus intermedius*, J. Clin. Invest. 68:294-302, 1981.

Ball, L.C., Parker, M.T.: The cultural and biochemical characters of *Streptococcus milleri* strains isolated from human sources, J. Hyg. (Camb.) 82:63-78, 1979.

Bascomb, S., Manafi, M.: Use of the enzyme tests in characterization of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci, Clin. Microbiol. Rev. 11(2):318-340, 1998.

Beighton, D.J., Hardie, J.M. and Whiley, R.A.: A scheme for the identification of viridans streptococci, J. Med. Microbiol. 35:367-372, 1991.

Bentley, R.W., Leigh, J.A. and Collins, M.D.: Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences, Int. J. Syst. Bacteriol. 41:487-494, 1991.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Gram-positive cocci. p. 532-558. John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H.A. Sneath, James T. Staley, Stanley T. Williams (ed.), 9th edition, Williams & Wilkins, 1994, Baltimore, USA.

Bergman, S., Selig, M., Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Baron, E.J., Dickersin, G.R., Ruoff, K.L.: "Streptococcus milleri" strains displaying a gliding type of motility, Int. J. Syst. Bacteriol. 1995, 45: 235-239.

Brown, J.H.: The use of blood agar in the study of streptococci, Monography no. 9, New York, 1919, Rockefeller Institute for Medical Research.

Colman, G. and Williams, R.E.O.: 1972. Taxonomy of some human viridans streptococci, p.281-299. In L.W. Wannamaker and J.M. Matsen (ed), *Streptococci and streptococcal diseases; recognition, understanding and management*. Academic Press, Inc, New York.

Coykendall, A.L., Wesbecher, P.M. and Gustafson, K.B.: "*Strptococcus milleri*", *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius* are later synonyms of *Streptococcus anginosus*, Int. J. Syst. Bacteriol. 37:222-228, 1987.

Drucker, D.B., Lee, S.M.: Fatty acid fingerprints of "*Streptococcus milleri*", *Streptococcus mitis* and related species, Int J. Syst. Bact. 31(3):219-225, 1981.

Edberg, S.E. and McLaughlin, J.C.: Constitutive enzyme tests, Clin. Microbiol. Newsl. 18(33):97-100, 1996.

Ericson, D., Björck, L., Kronvall, G.: Further characteristics of β 2-microglobulin binding to oral streptococci, Infect. Immun. 30:117-124, 1980.

Facklam, R.R.:Physiological differentiation of viridans streptococci, J. Clin. Microbiol. 5:184-201, 1977.

Facklam, R.R.: The major differencies in the American and British *Streptococcus* taxonomy schemes with special reference to *Streptococcus milleri*, Eur. J. Clin. Microbiol. 3:91-93, 1984.

Facklam, R.R. and Washinton, J.A. II: *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci, p.238-257. In A. Balows, W.J. Hausler JR, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Facklam, R.R.: Identification, classification and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci, Clin. Microbiol. Rev. 8:479-495, 1995.

Farrow, J.A. and Collins, M.D.: Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxa, Syst. Appl. Microbiol. 5:483-4493, 1984.

Gossling, J.: Occurrence and pathogenity of *Streptococcus milleri* group, Rev. Infect. Dis. 10:257-285, 1988.

Handley, P.S., Carter, P.L., Wyatt, J.E., Hesketh, L.M.: Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera, Infect. Immun. 47:217-227, 1985.

Hoppe, G.: Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria, p.423-431. In Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology, Lewis Publishers, 1993.

Houang, E., Ahmet, Z. and Warren, M.: Species identification of members of the *Streptococcus milleri* group isolated from the vagina by ID 32 Strep System and differential phenotypic characteristics, J. Clin. Microbiol. 33(6):1592-1595, 1995.

Janda, W.M.: Streptococci and “Streptococcus-like” bacteria: old friends and new species, Clin. Microbiol. Newsl. 16:161-170, 1994.

Jones, D.: Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*, p.1-49. In F.A. Skinner and L.B. Quesnel (ed.), *Streptococci*, Academic Press, Ltd., London, United Kingdom, 1978.

Jousimies-Somer, H., Savolainen, S., Mäkitie, A., Ylikoski, J.: Bacteriologic findings in peritonsillar abscesses in young adults, Clin. Inf. Dis. 16Suppl 4:292-298, 1993.

Kawamura, Y., Hou, X., Sultana, F., Miura, H., Ezaki, T.: Determination of 16s rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*, Int J. Syst. Bacteriol. 45(2):406-408, 1995.

Kikuchi, K., Enari, T., Totsuka, K., Shimizu, K.: Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridisation results, and results with a commercial rapid biochemical and enzymatic reaction system for identification of Viridans group *Streptococci*, J. Clin. Microbiol. 33(5):1215-1222, 1995.

Kilian, M., Mikkelsen, L., Henrichsen, J.: Taxonomic study of viridans streptococci; description of *Streptococcus gordonii* sp. nov and emended descriptions of *Streptococcus*

sanguis, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis*, Int. J. Syst. Bacteriol. 39:471-484, 1989.

Kilpper-Bälz, R., Williams, B.L., Luticken, R. and Schleifer, K.H.: Relatedness of “*Streptococcus milleri*” with *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus constellatus*, Syst. Appl. Microbiol. 5:494-500, 1984.

Kilpper-Bälz, R., Wenzig, B., Schleifer, K.H.: Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982). Int J. Syst. Bacteriol. 35:482-488, 1985.

Lancefield, R.C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci, J. Exp. Med. 57:571-595, 1933.

Lebrun, L., Guibert, M., Wallet, P., de Maneville, M.M. and Pillot, J.: Human Fc (γ) receptors for differentiation in throat cultures of group C “*Streptococcus eguisimilis*” with group C “*Streptococcus milleri*”, J. Clin. Microbiol. 24:705-707, 1986.

Littel, K.J., Hartman, P.A.: Fluorogenic selective and differential medium for isolation of fecal streptococci, Appl. Environ. Microbiol. 45(2):622-627, 1983.

Loesche, W.J.: Dental caries: a treatable infection. Springfield, III: Charles C Thomas, 1982.

Maiden, M.F.J., Tanner, A. and Macuch, P.J.: Rapid characterization of periodontal bacterial isolates by using fluorogenic substrate tests, J. Clin. Microbiol. 34(2):376-384, 1996.

Mangels, J., Edvalson, I. and Cox, M.: Rapid presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group organisms with use of 4-methylumbelliferone-derivate substrates, Clin. Infect. Dis. 16(Suppl 4):S319-21, 1993.

Michalek, S.M., McGhee Jr.: Oral streptococci with emphasis on streptococcus mutans. In McGhee Jr., Michalek, S.M., Gassel, G.H. (ed), Dental Microbiology. Philadelphia: Harper& Row, 1982:679-690.

Moncla, B.J., Braham, P., Rabe, L.K. and Hillier, S.L.: Rapid presumptive identification of black-pigmented gram-negative anaerobic bacteria by using 4-methylumbelliferone derivatives, *J. Clin. Microbiol.* 29(9):1955-1958, 1991.

Moore, L.V.H., Bourne, D.M., Moore, W.E.C.: Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic gram-negative bacilli, *Int. J. Yst. Bact.* 44(2):338-347, 1994.

Moss, C.W. and Nunez-Montiel, O.L.: Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column, *J. Clin. Microbiol.* 15(2):308-311, 1982.

Murray, B.E.: The life and times of the *Enterococcus*, *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65, 1990.

Münster, U., Plön, Einiö, P., Nurminen, J.: Evaluation of the measurements of extracellular enzyme activities in a polyhumic lake by means of studies with 4-methylumbelliferyl-substrates, *Arch. Hydrobiol.* 115:321-337, 1989.

Parker, M.T., Ball, L.C.: Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man, *J. Med. Microbiol.* 9:275-302, 1976.

Piscitelli, S.C., Schwed, J., Schreckenberger, P. and Danzinger, L.H.: *Streptococcus milleri* group: renewed interest in an elusive pathogen, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:491-498, 1992.

Poole, P.M. and Wilson, G.: *Streptococcus milleri* in the appendix, *J. Clin. Pathol.* 30:937-942, 1977.

Poole, P.M. and Wilson, G.: Occurrence and cultural features of *Streptococcus milleri* in various body sites, *J. Clin. Pathol.* 32:764-768, 1979.

Quinn, J.P., DiVincenzo, C.A., Lucks, D.A., Luskin, R.L., Shatzer, K.L. and Lerner, S.A.: Serious infections due to penicillin-resistant viridans streptococci with altered penicillin-binding protein, *J. Infect. Dis.* 157:764-769, 1988.

Roberts, R.B.: Viridans and beta hemolytic (non group A, B and D) streptococci, p.1162-1170. In Mandell, G.L., Douglas, R.G.Jr., Bennett, J.E. (ed), Principles and Practise of Infectious Diseases, 2nd ed, Churchill Livingstone Inc, 1988.

Ruoff, K.L. and Ferraro, M.J.: Hydrolytic enzymes of “*Streptococcus milleri*”, J. Clin. Microbiol. 25(9):1645-1647, 1987.

Ruoff, K.L., Kunz, L.J. and Ferraro, M.J.: Occurence of *Streptococcus milleri* among beta-hemolytic streptococci isolated from clinical specimens, J. Clin. Microbiol. 22:149-151, 1985.

Ruoff, K.L.: *Streptococcus anginosus* (“*Streptococcus milleri*”): the unrecognised pathogen, Clin. Microbiol. Rev. 1:102-108, 1988.

Ruoff, K.L.: *Streptococcus*, p.299-307. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Rytel, M.W., Mogabgab, W.J.: Clinical manual of infectious diseases. Chigago: Year Book Medical Publishers, 1984.

Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R.: Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*: a review, System. Appl. Microbiol. 10:1-19, 1987.

Schaufuss, P., Lammler, C., Blobel, H.: Rapid differentiation of streptococci isolated from cows with mastitis, J.Clin. Microbiol. 24:1098-1099, 1986.

Shinzato, T., Saito, A.: A mechanism of pathogenicity of “*Streptococcus milleri* group” in pulmonary infection: synergy with an anaerobe, J. Med. Microbiol. 40(2):118-123, 1994.

Smith, R.F. and Willet, N.P.: Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing micro-organisms, Appl. Microbiol. 16:1434-1436, 1968.

Spencer, R.C., Nanayakarra, C.S., Coup, A.J.: Fulminant neonatal sepsis due to *Streptococcus milleri* (letter), J. Infect. 4:88-89, 1982.

Stackebrandt, E., Goebel, B.M.: Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Bact.* 44(4):846-849, 1994.

Stiles, M.E. and Holzappel, W.H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *Int. J. Food Microbiol.* 30:1-29, 1997.

Takagi, N., Tsuchiya, H., Sato, M., Kato, M., Namikawa, I.: High-performance liquid chromatographic analysis of bacterial fatty acid composition for chemotaxonomic characterization of oral streptococci, *J. Clin. Microbiol.* 24(1):81-85, 1986.

Taketoshi, M., Kitada, K., Yakushi, T., Inoue, M.: Enzymatic differentiation and biochemical and serological characteristics of the clinical isolates of *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* and *Streptococcus constellatus*, *Microbios.* 76(307):115-129, 1993.

Tillotson, G.S. and Ganguli, L.A.: Antibiotic susceptibilities of clinical strains of *Streptococcus milleri* and related streptococci, *J. Antimicrob. Chemoter.* 14:557-558, 1984.

Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., Devriese, L.A.: Taxonomic study of lancefield streptococcal groups C, G and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov, *Int. J. Syst. Bact.* 46(3):774-781, 1996.

Whiley, R.A., Frazer, H.Y., Hardie, J.M. and Beighton, D.: Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus anginosus* within the “*Streptococcus milleri* group”, *J. Clin. Microbiol.* 28:1497-1501, 1990.

Whiley, R.A., Beighton, D.: Emended descriptions and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* and *Streptococcus anginosus* as distinct species, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(1):1-5, 1991.

Whiley, R.A. and Beighton, D.: Current classification of the oral streptococci, *Oral Microbiol. Immunol.* 13: 195-216, 1998.

Willcox, M.D., Oakey, H.J., Harty, D.W., Patrikakis, M., Knox, K.W.: Lancefield group C *Streptococcus milleri* group strains aggregate human platelets, *Microb. Pathogen.* 16(6):451-7, 1994.

Yoshizaki, N.: Cariogenicity of *Streptococcus intermedius* ATCC 27335, Aichi Gakuin University, *J. Dent. Sci.* 21:371-386, 1983.

Young, K.A., Allaker, R.P., Hardie J.M., Whiley, R.A.: Interactions between *Eikenella corrodens* and *Streptococcus milleri*-group organisms: possible mechanisms of pathogenicity in mixed infections, *Antonie. van Leeuwenhoek.* 69(4):371-373, 1996.

8.0 LIITTEET

8.1 Ravintoalustat

1. Veri malja

Sheep blood agar base (Difco) 40 g
Tislattu vesi ad 1000 ml
Valmistus ja sterilointi tuottajan ohjeen mukaan.

2. Brucella blood agar

Brucella blood agar (BBL 11086)
Hemiiniä lopulliseen konsentraatioon 5 µg/ml
Valmistus ja sterilointi tuottajan ohjeen mukaan.
Jäähtyneeseen agariin lisätään steriilisti 5% defibrinoitua lampaan verta ja K1-vitamiinia lopulliseen konsentraatioon 10 µg/ml (Nutritional Biochemical Corp.)

3. FAA (Fastidious Anaerobe Agar)

Valmistetaan kuten Brucella blood agar, pohjana FAA-jauhe (Lab M).

4. GC-0 malja (Chocolate)

GC agar (Oxoid) 500 ml
Hemoglobiiniliuos 2% (HEMO) 500 ml
Isovitalex rikaste 7.5 ml
L-tryptofaani 10mg/ml 10 ml
Valmistus ja sterilointi valmistajan ohjeen mukaan.

5. Brain Heart Infusion agar, johon lisätty hyaluronidihappoa 400 µg/ml ja naudan seerumialbumiinia 1%

Brain Heart Infusion (BBL 11059) 61.7 g
Agar Noble (Difco 0142-01) 16.7 g
Tislattu vesi ad 1000 ml
Säädetään pH 6.7-6.9
Keitetään 1min, sterilointi 121 °C 15 min.

Lisäysliuokset:

Lisätään jäähtyneeseen agariin.
Hyaluronic acid from human umbilical cord sodium salt, 2 mg/ml (Sigma 1876) 200 mg
Tislattu vesi ad 100 ml
Steriilisuodatus 0.2 µm

Bovine serum albumin, fraction V 5% (Sigma A-8022) 5 g

Tislattu vesi ad 100 ml
Steriilisuodatus 0.2 µm

6. PYG-liemi

Peptoni, Trypticase 1.25 g
Hiivauute 2.5 g
Peptoni, Bact. Peptone (Oxoid L37) 1.25 g
Tisl. Vesi 250 ml

Lisäysliuos

Resatsuriini 1.0 ml
Suolaliuos 10 ml
Glukoosi 2.5 g
Hemiini 2.5 ml
K₁-vitamiini 2 tippaa
Kysteiini 0.125 g

Keitetään, lisäykset jäähtyneeseen alustaan. Säädetään pH n.7.1.

8.2 Rasvahappoanalyysi

8.2.1 Reagenssit

Reagenssi 1, Saponifikaatioreagenssi

Natriumhydroksidi, NaOH (Sigma S-0899) 45 g
Metanoli (Merck 6007, gradient grade) 150 ml
Steriloitu, pyrogeenivapaa vesi 150 ml

Lisää natriumhydroksidikiteet ja metanoli veteen, anna sekoittua kunnes kiteet ovat liunneet.

Reagenssi 2A, Metylaatioreagenssi

6.0N Suolahappo, HCL (Merck 317, pro anal.) 325 ml
Metanoli (Merck 6007, gradient grade) 275 ml
Lisää suolahappo metanoliin, anna sekoittua.

Reagenssi 2B, Metylaatioreagenssi

50% Rikkihappo, H₂SO₄ 110 ml
Metanoli (Merck 6007, gradient grade) 91 ml
Lisää rikkihappo metanoliin, anna sekoittua.

Reagenssi 3, Ekstraktioreagenssi

Heksaani (Rathburn RH 1002, HPLC grade) 200 ml
Metyyli-tert-butyylieetteri 200 ml
(Rathburn RH 1008, HPLC grade)

Lisää metyyli-tert-butyylieetteri heksaaniin, anna sekoittua.

Reagenssi 4, Emäspesureagenssi

Natriumhydroksidi, NaOH (Sigma S-0899)	4.5 g
Steriloitu, pyogeenivapaa vesi	450 ml
Lisää natriumhydroksidikiteet veteen, anna sekoittua kunnes kiteet ovat luienneet.	
Kyllästä liuos natriumkloridilla:	
Natriumkloridi, NaCl	120 g
Natriumhydroksidi-vesi-seos	450 ml

8.2.2 Laitteet, välineet

Hewlett-Packard 5890 Series II kaasukromatografi
Hewlett-Packard 7673B automaattinen näytteensyöttäjä
Hewlett-Packard Vectra 486/33N tietokone + MIDI Sherlock ohjelma
Hewlett-Packard Laserjet 4L tulostin
Hewlett-Packard lasipullot, mikropullot, korkit, korkittaja, ruisku

Keittolevy
Vesihaude
Vortex
Koeputkien heiluttaja (Heidolph)

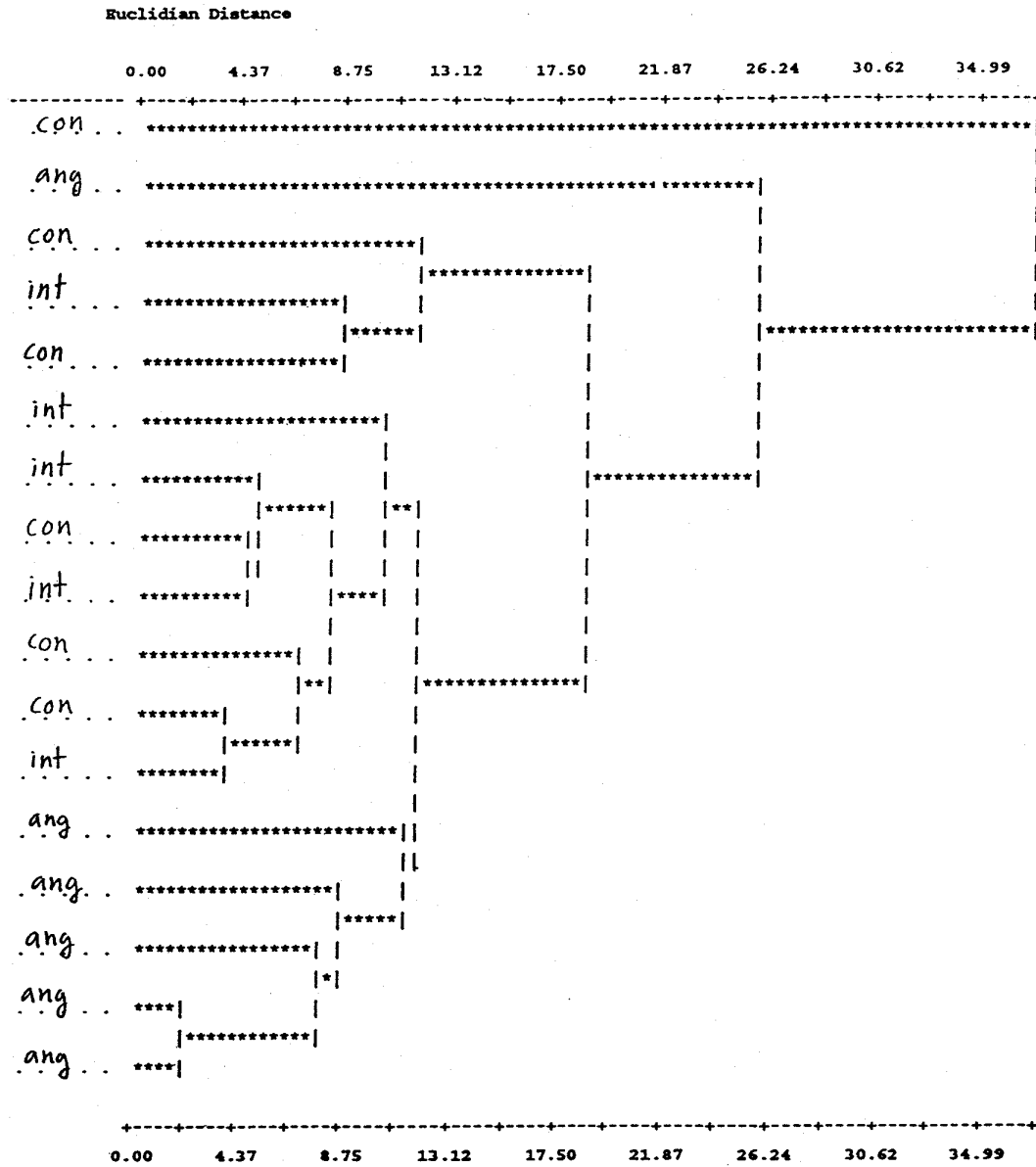
8.2.3 Suoritus

Bakteerimassaa korkillisessa koeputkessa (40-50 mg)

1. Lisää 1ml reagenssia 1, vorteksoi, kuumenna kiehuvässä vedessä 5 min. Vorteksoi, kuumenna 25 min. Jäähdytä huoneenlämpöiseksi.
2. Lisää 1ml reagenssia 2A ja 1 ml reagenssia 2B, vorteksoi. Kuumenna 80°C vesihauteessa 10 minuuttia. Jäähdytä putket nopeasti jäisessä vedessä huoneenlämpöiseksi.
3. Lisää 1.25 ml reagenssia 3. Sekoita putkia koeputkiheiluttajassa 10 minuuttia. Pipetoi ylempi faasi uuteen koeputkeen Pasteur-pipetillä, jonka kärki on liekitetty.
4. Lisää 3 ml reagenssia 4. Sekoita koeputkiheiluttajassa 5 minuuttia. Pipetoi 2/3 päällimmäistä faasia Hewlett-Packardin pieniin lasipulloihin (mikropulloon) ja korkita pullot.
5. Järjestä putket automaattiseen näytteensyöttäjään. Valmista tietokone ja kaasukromatografi ajokuntoon MIS Operating Manualin mukaan.

8.2.4 Rasvahappoanalyysiin perustuva dendrogrammi

Rasvahappokoostumusten yhtenevyydet on muutettu bakteerien sukulaisuusuheteita kuvaaviksi euklidisiksi etäisyyksiksi.



8.2.5 Rasvahappoanalyysiin perustuva komponenttianalyysi

Yksittäisten lajien kuuluisi sijoittua selkeisiin ryhmiin.

