



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN



F I 0001 12504B

(12) **PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT**

(10) **FI 112504 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.12.2003

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12Q 1/68, 1/06, G01N 21/64

(21) Patentihakemus - Patentansökning

20021451

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

07.08.2002

(24) Alkupäivä - Löpdag

07.08.2002

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

15.12.2003

(73) Haltija - Innehavare

1 •Cyflo Oy, Hämeenkatu 13 B, 33100 Tampere, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Korkeamäki, Mika, Pöytyä, Tammitie 3, 21870 Riihikoski, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 •Vaahtovuori, Jussi, Uudenmaankatu 7 B 23, 20500 Turku, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Papula Oy

Fredrikinkatu 61 A, 6.krs, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä bakteerien tunnistamiseksi
Förfarande för identifiering av bakterier**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 6225046 A, Vesey et al., Methods for detecting microorganisms, Folia Microbiologica, vol. 46, nro 1, 2001, p. 53-55, Lipoglavsek L et al., Application of flow cytometry for Ecological Monitoring of the Rumen Microbial Ecosystem, Applied and Environmental Microbiology, May 1995, p. 1859-1866, Wallner, G et al., Flow Cytometric Analysis of Activated Sludge with rRNA-Targeted Probes, Zoetendal E.G., Molecular Characterization of Bacterial Communities in the Human Gastrointestinal Tract, Wageningen University dissertation nro 3078, Abstract, 13 November, 2001, CAPlus, AN: 200:660935, tiivistelmä julkaisusta: Nebe-von-Caron, G. et al., Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting, Journal of Microbiological Methods, vol. 42, nro 1, 2000, p. 97-114

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, ja jossa bakteerinäytteessä on partikkeleita. Menetelmälle on tunnusomaista se, että

- a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussavirtaussytometrissä toisella aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja

g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja, ja lisäksi fluorokromit ja monokromaattisen valonaallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla. Keksinnön kohteena on lisäksi mainitun menetelmän käyttö.

Uppfinningen avser ett förfarande för identifiering av en eller flera bakterier och/eller bakteriearter och för mätning av andelen av minst två bakterier och/eller bakteriearter i ett bakterieprov, vilket bakterieprov uppvisar partiklar. Kännetecknande för förfarandet är det, att

a) till minst en bakteries ribosomaliska RNA-molekyler i bakterieprovet binds sönder till vilka förbundits en första fluorokrom, vilken absorberar ljus på ett första våglängdsområde,

b) till minst en bakteries DNA i bakterieprovet binds en andra fluorokrom, vilken absorberar ljus på ett andra våglängdsområde,

c) bakterieprovet matas in i en flödescytometer,

d) nämnda första fluorokrom exciteras i nämnda flödescytometer med ett på ett första våglängdsområde befintligt monokromatiskt ljus,

e) nämnda andra fluorokrom exciteras i nämnda flödescytometer med ett på ett andra våglängdsområde befintligt monokromatiskt ljus,

f) ljuset, som sprider sig från provets partiklar, och fluorescensen av fluorokromen, som bundit sig till provets partiklar, detekteras, varvid en mängd spänningspulser erhålls, och

g) nämnda mängd spänningspulser analyseras,

och dessutom har fluorokromerna och det monokromatiska ljusets våglängdsområden valts, så att skillnaden mellan den genomsnittliga intensiteten av fluorescensen av sondersnas fluorokromer som bundits till bakterieprovets minst en bakteries ribosomaliska RNA-molekyler och av till bakterieprovets minst en bakteries DNA bundna fluorokromer är minst fyrdubbel på en logaritmisk skala. Uppfinningen avser även användningen av nämnda förfarande.

MENETELMÄ BAKTEERIEN TUNNISTAMISEKSI – FÖRFARANDE FÖR IDENTIFIERING AV BAKTERIER

Keksinnön kohteena on menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai
5 bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin
osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä sekä mainitun menetelmän käyttö.

TEKNIIKAN TASO

Bakteerien lajispesifinen tunnistaminen ja laskenta sekabakteerinäytteestä on
nykyisin käytössä olevilla menetelmillä työlästä ja hidasta. Sekabakteerinäytteellä
10 tarkoitetaan tässä yhteydessä useita eri bakteerilajeja sisältävää näytettä.
Tyyppiesimerkkejä sekabakteerinäytteistä ovat uloste ja jätevesi. Ihmisulosteen on
todettu sisältävän 300-400 eri bakteerilajia ja bakteeritiheys näytteessä on luokkaa
 10^{11} bakteerisolua per gramma näytettä (Human fecal flora: the normal flora of 20
Japanese-Hawaiians; W. E. C. Moore and L. V. Holdeman, Applied Microbiology,
15 1974, vol. 27, p. 961-979). Käyttökelpoisin tämänhetkinen menetelmä
bakteerilajien tunnistamiseksi ja laskemiseksi sekabakteerinäytteestä on
fluoresenssimikroskopiaa hyödyntävä mikroskopia-FISH (Extensive set of 16S
rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces; H. J. M. Harmsen et
al., Applied and Environmental Microbiology, 2002, vol. 68, p. 2982-2990).
Lyhenne FISH tulee sanoista Fluorescence In Situ Hybridization. FISH on yleisesti
20 käytössä oleva molekyylibiologinen tekniikka, jossa tunnistettavan solun
nukleiinihapposekvenssiin liitetään eli hybridisoidaan sekvenssispesifinen koetin.
Koetin on määrätyn emäsjärjestyksen omaava lyhyt nukleiinihappoketju, joka solun
sisään saatettuna liittyy vastinemäksiinsä. Koettimen spesifisyys perustuu koettimen
25 emäsekvenssin ja vastinemäsekvenssin yhteensopivuuteen. Bakteriologisessa
FISH-tekniikassa käytettävien koettimien kohdesekvensseinä ovat bakteerien
ribosomien 16S rRNA- tai 23S rRNA-rakenneyksiköiden nukleiinihapot. Koetin
sitoutuu hybridisaatiossa kohdesolun sekvenssiin vain, mikäli koettimen ja
kohdesolun 16S rRNA:n tai 23S rRNA:n sekvenssin muodostavat emäkset ovat
30 yhteensopivia. 16S rRNA- ja 23S rRNA-molekyylejä koodittavat geenialueet ovat
bakteerien evoluution kehittyessä pysyneet lähes muuttumattomina. Ko. geenit ja
ribosomien rakenne ovat sekvenssiltään samankaltaisia sellaisilla bakteerilajeilla,
jotka ovat evoluutiohistorialtaan lähekkäisiä. 16S tai 23S rRNA:han sitoutuvat
koettimet voidaan tämän vuoksi valmistaa sellaisiksi, että ne sitoutuvat vain
35 joidenkin, toisilleen sukua olevien bakteeriryhmien 16S rRNA- tai 23S rRNA-

nukleiinihapposekvensseihin (Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation; R. I. Amann et al., *Microbiological Reviews*, 1995, vol. 59, p. 143-169). Täten voidaan luoda esim. *Bifidobacterium*-suvulle spesifinen koetin. 16S rRNA-hybridisaatiossa koettimen sekvenssille sopivia 16S rRNA-molekyylejä on yhdessä bakteerisolussa muutamasta sadasta muutamiin tuhansiin kappaletta, joten koettimien määrän ollessa riittävä koettimia sitoutuu satoja tai tuhansia yhteen bakteerisoluuun.

FISH-tekniikassa hybridisoituneen bakteerin tunnistus perustuu siihen, että koettimeen on liitetty fluoresoiva molekyyli eli fluorokromi. Fluorokromit virittyvät absorboidessaan energiaa niille luonteenomaisen absorbanssispektrin aallonpituuksilla. Viritystilän syntyminen edellyttää, että fluorokromimolekyylin elektroni(t) absorboi eli vastaanottaa energiakvantin ja siirtyy ulommalle elektronikuorelle. Kun viritystila purkautuu, elektroni emittoi eli luovuttaa energiakvantin ja palaa perustilaansa. Kunkin fluorokromin absorbanssispektrissä on absorptiomaksimi eli se aallonpituus, jota fluorokromi absorboi eniten. Viritystilän purkautuessa fluorokromit emittoivat viritysaallonpituutta pidempiaallonpitoisia fotoneja eli ne fluoresoivat. Myös emittoidun valon aallonpituudet muodostavat jakauman eli emissiospektrin. Emissiospektrin emissiomaksimi on se aallonpituus, jota fluorokromi emittoi eniten. Absorptio- ja emissiomaksimien eroa sanotaan Stokesin siirtymäksi. Tyypillinen FISH-menetelmässä käytetty fluorokromi on fluoreskaiini, jonka absorptiomaksimi on 494 nm, emissiomaksimi 520 nm ja Stokesin siirtymä täten 26 nm (*Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes*). Historiallisista syistä fluoreskaiini on käytetyin fluorokromi ja sitä käytetään yleisesti referenssifluorokromina. Käytön haittapuolia ovat suhteellisen nopea intensiteetin aleneminen (photobleaching), joka vaikeuttaa mikroskopia-FISH -menetelmässä bakteerien laskentaa. Lisäksi fluoreskaiinin emittoiman valon intensiteetin pH-herkkyys hankaloittaa sen käyttöä monissa sovelluksissa ja hidastaa reagenssien valmistusta. Fluoreskaiinilla on myös laaja emissiospektri, mikä vaikeuttaa sen käyttöä useita fluorokromeja hyödyntävissä sovelluksissa. Yleensä mikroskopia-FISH-menetelmässä näytettä valaistaan laajan aallonpituusspektrin omaavalla valonlähteellä, jolloin koettimiin sidotut leimat virittyvät ja emittoivat valoa emissiospektrinsä aallonpituuksien suhteessa. Kun näytettä tarkastellaan mikroskopia-FISH:ssä käytettävällä fluoresenssi-mikroskoopilla sopivan aallonpituussuodattimen läpi, ainoastaan hybridisoituneet bakteerit näkyvät emittoivina partikkeleina eli vaaleina pisteinä tummassa mikroskoopin näkökentässä.

FISH-tekniikkaan yhdistetään yleisesti DNA-värjäys näytteessä olevien kaikkien bakteerien eli kokonaisbakteerimäärän laskemiseksi. Luonnon sekabakteerinäytteet sisältävät bakteerien lisäksi aina myös ei-bakteeriperäistä materiaalia. Esimerkkeinä voidaan mainita ulosteen kuidut ja jätevesien epäorgaaniset materiaalit. Käytettävät DNA-värit ovat yleisesti DNA:n kaksoiskierteeseen interkalatoituvia fluorokromeja, joiden intensiteetti kasvaa moninkertaiseksi sitoutumisen seurauksena. Esimerkkejä DNA-väreistä ovat propidiumjodidi ja etidiumjodidi. DNA-värit sitoutuvat myös hybridisoituihin bakteereihin. Jotta koettimella hybridisoituneet bakteerit voidaan erottaa kaikkien DNA-värjäytyneiden bakteerien joukosta eri värisinä, on DNA-väriin emissiospektrin erottava koettimeen liitetyn fluorokromin emissiospektristä. Usein myös DNA-väriin absorptiospektri poikkeaa koettimen väriin absorptiospektristä. Käyttämällä DNA-värjäystä FISH:n yhteydessä saadaan hybridisoituneet ja DNA-värjäytyneet kohdebakteerit erotettua vain DNA-värjäytyneistä näytteen muista bakteereista ja DNA-värjäytymättömistä DNA:ta sisältämättömistä partikkeleista.

Mikroskopia-FISH-menetelmässä hybridisoitu sekabakteerinäyte tutkitaan fluoresenssimikroskoopilla. Tässä menetelmässä mikroskooppilasille kiinnitettyä näytettä valaistaan laajan aallonpituusspektrin omaavalla valonlähteellä, jolloin näytteessä olevat fluorokromit absorboivat energiaa ja emittoivat valoa emissiospektrinsä aallonpituusjakauman mukaisesti. Näytteen tarkastelu tapahtuu näytteestä heijastuvan valon eri aallonpituuksia suodattavien optisten komponenttien läpi. Hybridisoitujen bakteerien määrän laskemiseen käytetään suodatinta, joka päästää läpi vain koettimen fluorokromin emittoimaa valoa. Bakteerien kokonaismäärän laskemiseen käytetään suodatinta, joka päästää läpi vain DNA-väriin emittoimaa valoa. Tietämällä näytteen kohdebakteerien määrä ja kokonaisbakteerien määrä saadaan kohdebakteerien osuus laskettua.

Mikroskopia-FISH-menetelmän heikkouksia ovat sen hitaus ja tulosten tulkinnanvaraisuus epäspesifisen hybridisaation vuoksi. Epäspesifisessä hybridisaatiossa hybridisoitava koetin tarttuu muiden kuin varsinaisten kohdebakteerien nukleiinihappoihin ja jopa bakteerien pintarakenteisiin. Bakteeriin epäspesifisesti hybridisoituneen koettimen määrä on yleensä vähäisempi kuin koettimen määrä varsinaisissa hybridisoituneissa kohdebakteereissa, mutta vähäininkin koetinmäärä saa bakteerin näkymään taustaansa vaaleampana. Tämä aiheuttaa tulkinnan vaikeutta mikroskopia-FISH:ssä. Menetelmän hyvin hallitseva henkilö pystyy laskemaan enintään joitakin tuhansia bakteerisoluja tunnissa. Sekabakteerinäytteiden sisältämästä valtavasta bakteerimäärästä saadaan

kohtuullisella ajankäytöllä laskettua hyvin pieni osa, joten otosjoukko jää pieneksi (Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation; R. I. Amann et al., *Microbiological Reviews*, 1995, vol. 59, p. 143-169). Näistä syistä mikroskopia-FISH-menetelmällä saatujen tulosten toistettavuus jää usein huonoksi.

Mikroskopia-FISH:n heikkouksien vuoksi sen tilalle on pyritty kehittämään nopeampia ja luotettavampia menetelmiä. Yhtenä ratkaisuvaihtoehtona on esitetty menetelmä, jossa mikroskoopin okulaareihin on kiinnitetty video- tai digitaalikamera. Kameran kuvaamat kuvat on analysoitu tietokoneistetulla kuvankäsittelyohjelmalla, joka tunnistaa kustakin kuvasta säädettyä kirkkausrajaa kirkkaammat partikkelit ja laskee nämä tutkittaviksi bakteereiksi (Automatic signal classification in fluorescence in situ hybridization images; B. Lerner et al., *Cytometry*, 2001, vol. 43, p. 87-93). Tällä menetelmällä saadaan analyysinopeutta lisättyä hieman, mutta näytteen analysointi on edelleen melko hidasta. Aivan kuten ihmisvoimin tehdyssä mikroskopia-FISH:ssä, koneellisen mikroskopia-FISH:nkin ongelma on tunnistettavan kirkkausrajan määrittäminen ja epäspesifisesti hybridisoituneiden bakteerien erottaminen hybridisoituneista kohdebakteereista. Koneellinen mikroskopia-FISH ei ole levinnyt laajaan käyttöön.

Virtausytometria on jo vuosikymmeniä käytössä ollut menetelmä, jolla voidaan analysoida ja laskea nesteessä olevia partikkeleita hyvin nopeasti. Monet partikkelit voidaan suspensoida liuokseksi. Virtausytometrian avulla saadaan näytteen partikkeleista mitattua useita parametrejä samanaikaisesti. Virtausytometriaa käytetään useissa erilaisissa kliinisissä ja teollisissa sovelluksissa, erityisesti biolääketieteen alalla. Virtausytometria on nykyään tärkein nestemäisten eukaryoottisolunäytteiden kvalitatiivinen tunnistus- ja laskentamenetelmä. Mm. ihmisen veren valkosoluja tutkitaan rutiininomaisesti automatisoiduilla virtausytometreilla. Sen sijaan prokaryoottisolujen eli bakteerien virtausytometriset analyysimenetelmät eivät ole levinneet laajaan käyttöön. Virtausytometriaan perustuvien bakteriologisten analyysi- ja laskentamenetelmien yleistymisen esteenä on ollut virtausytometrialaitteiden tekniikan ja virtausytometrian osaamisen taso, joka ei ole sallinut eukaryoottisoluja huomattavasti pienempien prokaryoottisolujen luotettavaa analyysiä. Viimeisten kymmenen vuoden aikana virtausytometrialaitteistojen kehittymisen myötä virtausytometriaan perustuvia menetelmiä bakteerien analysoimiseksi on kuitenkin julkaistu (Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses; H. M. Davey and D. B. Kell,

Microbiological Reviews, 1996, vol. 60, p. 641-696). Tällä hetkellä tunnetut menetelmät eivät ole soveliaita rutiinikäyttöön eikä niillä voida laskea sekabakteerinäytteiden bakteerikonsentraatioita. Myöskään analysoidut näytteet eivät ole olleet ulosteen kaltaisia lajikirjoltaan tuntemattomia sekabakteerinäytteitä.

5 Esitetyt menetelmät bakteerien tunnistamiseksi virtaussytometrillä eivät perustu virtaussytometrin ja fluoresoivien hybridisaatiokoettimien yhtäaikaiseen käyttöön (esimerkiksi julkaisut US 2002/076,743, US 6,165,740, DE 19608320, DE 19945553, EP 337 189). Tieteellisissä artikkeleissa on perehdytty lähinnä yhtä bakteerilajia sisältävien puhtasviljelmänäytteiden analysointiin, tutkittu bakteerien ja veren valkosolujen interaktioita, bakteerien aineenvaihduntaprosesseja ja lisäntymistä sekä erotettu eläviä bakteereja kuolleista (Analysis of bacterial function by multi-color fluorescence flow cytometry and single cell sorting; G. Nebe-von-Caron et al., Journal of Microbial Methods, 2000, vol. 42, p. 97-114). Sekabakteerinäytteiden virtaussytometristä tutkimista on kokeiltu käyttämällä bakteereihin tarttuvia vasta-aineita (Multiparameter flow cytometry of bacteria: implications for diagnostics and therapeutics; H. M. Shapiro, Cytometry, 2001, vol. 43, p. 223-226, ja Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry; L. G. Chitarra et al., Cytometry, 2002, vol. 47, p. 118-126, ja D. Vealin patentti US6225046, ja L. Terstappenin patentti EP0347039). Vasta-aineiden käyttöön perustuneet menetelmät eivät kuitenkaan ole mahdollistaneet luotettavaa sekabakteerinäytteiden lajispesifistä tutkimista, koska vasta-aineet eivät ole bakteerilajispesifisiä. Vasta-aineet tarttuvat bakteerien pintarakenteisiin, jotka eivät ole laji- tai sukuspesifisiä, ja voivat sitoutua siis useisiin erilaisiin bakteerilajeihin.. Samoja pintarakenteita on löydettävissä hyvin erilaisista bakteereista ja toisaalta samakantaisilla bakteereilla voi olla hyvin erilaisia pintamolekyylejä (What determines arthritogenicity of a bacterial cell wall?; X. Zhang, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).

10 ja veren valkosolujen interaktioita, bakteerien aineenvaihduntaprosesseja ja lisäntymistä sekä erotettu eläviä bakteereja kuolleista (Analysis of bacterial function by multi-color fluorescence flow cytometry and single cell sorting; G. Nebe-von-Caron et al., Journal of Microbial Methods, 2000, vol. 42, p. 97-114). Sekabakteerinäytteiden virtaussytometristä tutkimista on kokeiltu käyttämällä bakteereihin tarttuvia vasta-aineita (Multiparameter flow cytometry of bacteria: implications for diagnostics and therapeutics; H. M. Shapiro, Cytometry, 2001, vol. 43, p. 223-226, ja Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry; L. G. Chitarra et al., Cytometry, 2002, vol. 47, p. 118-126, ja D. Vealin patentti US6225046, ja L. Terstappenin patentti EP0347039). Vasta-aineiden käyttöön perustuneet menetelmät eivät kuitenkaan ole mahdollistaneet luotettavaa sekabakteerinäytteiden lajispesifistä tutkimista, koska vasta-aineet eivät ole bakteerilajispesifisiä. Vasta-aineet tarttuvat bakteerien pintarakenteisiin, jotka eivät ole laji- tai sukuspesifisiä, ja voivat sitoutua siis useisiin erilaisiin bakteerilajeihin.. Samoja pintarakenteita on löydettävissä hyvin erilaisista bakteereista ja toisaalta samakantaisilla bakteereilla voi olla hyvin erilaisia pintamolekyylejä (What determines arthritogenicity of a bacterial cell wall?; X. Zhang, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).

15 bakteereihin tarttuvia vasta-aineita (Multiparameter flow cytometry of bacteria: implications for diagnostics and therapeutics; H. M. Shapiro, Cytometry, 2001, vol. 43, p. 223-226, ja Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry; L. G. Chitarra et al., Cytometry, 2002, vol. 47, p. 118-126, ja D. Vealin patentti US6225046, ja L. Terstappenin patentti EP0347039). Vasta-aineiden käyttöön perustuneet menetelmät eivät kuitenkaan ole mahdollistaneet luotettavaa sekabakteerinäytteiden lajispesifistä tutkimista, koska vasta-aineet eivät ole bakteerilajispesifisiä. Vasta-aineet tarttuvat bakteerien pintarakenteisiin, jotka eivät ole laji- tai sukuspesifisiä, ja voivat sitoutua siis useisiin erilaisiin bakteerilajeihin.. Samoja pintarakenteita on löydettävissä hyvin erilaisista bakteereista ja toisaalta samakantaisilla bakteereilla voi olla hyvin erilaisia pintamolekyylejä (What determines arthritogenicity of a bacterial cell wall?; X. Zhang, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).

20 Vasta-aineiden käyttöön perustuneet menetelmät eivät kuitenkaan ole mahdollistaneet luotettavaa sekabakteerinäytteiden lajispesifistä tutkimista, koska vasta-aineet eivät ole bakteerilajispesifisiä. Vasta-aineet tarttuvat bakteerien pintarakenteisiin, jotka eivät ole laji- tai sukuspesifisiä, ja voivat sitoutua siis useisiin erilaisiin bakteerilajeihin.. Samoja pintarakenteita on löydettävissä hyvin erilaisista bakteereista ja toisaalta samakantaisilla bakteereilla voi olla hyvin erilaisia pintamolekyylejä (What determines arthritogenicity of a bacterial cell wall?; X. Zhang, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).

25 useisiin erilaisiin bakteerilajeihin.. Samoja pintarakenteita on löydettävissä hyvin erilaisista bakteereista ja toisaalta samakantaisilla bakteereilla voi olla hyvin erilaisia pintamolekyylejä (What determines arthritogenicity of a bacterial cell wall?; X. Zhang, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).

30 Virtaussytometrin tärkeimmät komponentit ovat paineistettu näytteensyöttöjärjestelmä, laser ja signaalintunnistuslaitteisto. Virtaussytometrillä tutkittavista partikkeleista saatu tieto analysoidaan virtaussytometriin liitettyllä tietokoneella. Virtaussytometrin paineistettu näytteensyöttöjärjestelmä pumppaa tutkittavaa näytettä näytteensyöttöneulaan. Näytteensyöttöneulan päässä olevasta reiästä näyte virtaa virtauskammioon, joka sisältää vaippanestettä. Vaippanesteenä käytetään optisilta ominaisuuksiltaan näyteliuoksen kaltaista nestettä. Näytteensyöttöneulasta tullutta ohutta näyteliuosvirtaa ympäröivä vaippaneste pakottaa näyteliuosvirrassa olevat partikkelit erilleen toisistaan ja yhtenäiseksi

jonoksi. Tapahtumaa kutsutaan hydrodynaamiseksi fokusoinniksi. Partikkelijono on kohdistettu virtausytometriin kuuluvan laserin kanssa siten, että lasersäde kohtaa partikkelit suorassa kulmassa. Näytteensyöttölaitteiston ja laserin lisäksi kolmas virtausytometrin keskeinen laitteistokomponentti on signaalintunnistuslaitteisto.

5 Tutkittavassa näytteessä olevat partikkelit aiheuttavat lasersäteen siroamista. Lasersäteen siroaminen laserin kulkusuunnassa pienissä kulmissa tunnistetaan fotodiodilla laserin tulosuuntaa vastaan. Siroamiskulman suuruutta mitataan Forward Scatter -parametrina (FSC). Laserin siroamista suuremmissa kulmissa kulkusuuntaansa nähden mitataan Side Scatter -parametrina (SSC)

10 valomonistinputkella. FSC korreloi karkeasti tunnistettavien partikkelien kokoon siten, että suuret lasersäteeseen osuneet partikkelit sirottavat lasersädettä enemmän kuin pienet. SSC-parametri korreloi partikkelin muotoon ja jyväisyyteen. SSC- ja FSC-detektorien lisäksi signaalintunnistuslaitteistoon kuuluu valomonistinputkia näytteestä tulevan fluoresenssin tunnistamiseksi. Laserin korkeaenergiset fotonit

15 virittävät tutkittavissa partikkeleissa olevia fluorokromeja. Fluorokromien viritystilan purkautuessa ne emittoivat valoa emissiospektriensä mukaisesti. Fluoresenssi mitataan sopivaa aallonpituutta tunnistavilla valomonistinputkilla. Fluoresenssidetektorit sijaitsevat laseriin nähden yleensä samassa suunnassa kuin SSC-detektori. Emittoitunut valo rekisteröidään sopivaa aallonpituutta tunnistavilla valomonistinputkilla suorassa kulmassa laserin ja nestevirran tulosuuntiin nähden.

20 Tavallisimmissa virtausytometreissä fluoresenssia tunnistetaan neljällä valomonistinputkella, joiden lyhenteet ovat vastaavasti FL1, FL2, FL3 ja FL4. FL-detektorien valoteille asetetuilla aallonpituussuodattimilla saadaan kukin detektori vain määrätyn aallonpituusalueen tunnistavaksi. Tutkittavien partikkelien

erottamiseksi laitteiston taustakohinasta ja näyteliuoksen epäpuhtauksista voidaan 25 määrittää kynnsarvo yhdelle tai useammalle sironta- tai fluoresenssikanavalle. Mikäli partikkeli aiheuttaa ko. kanavalla (kanavilla) kynnsarvon ylittävän signaalin, virtausytometrin elektroniikka mittaa kyseisen partikkelin parametrit.

Mikäli partikkelin kynnsarvokanavalla aiheuttama signaali alittaa kynnsarvon, partikkelin parametrit jätetään mittaamatta. Kynnsarvot tulisi asettaa siten, että 30 tutkittavia partikkeleita ei jää mittaamatta eli analysoitava otos on edustava eikä vääristynyt. Virtausytometrin eri detektoreilta kerätyt signaalit johdetaan signaalinkäsittelylaitteistoon ja saatu tieto analysoidaan tietokoneohjelman avulla.

Tutkittavan näytteen sisältämät partikkelit esitetään yleisimmin kaksiulotteisessa 35 pistekuvaajassa, jossa kummallakin akselilla on jokin tunnistusparametreista: FSC, SSC tai jokin fluoresenssikanavista. Tunnistetut partikkelit esitetään kuvaajassa pisteinä, jolloin samantyyppiset partikkelit muodostavat pisteryhmiä eli populaatioita. Pistekuvaajaa käytettäessä on näytteestä mahdollista analysoida vain

kahta muuttujaa kerrallaan. Mikäli halutaan erotella populaatioita useamman kuin kahden muuttujan perusteella, täytyy analyysi suorittaa useammassa pistekuvaajassa.

5 Merkittävä ero mikroskopiaan ja virtaussytometriaan perustuvien FISH-sovellusten välillä on näytteessä olevien fluorokromien virittämiseen käytetyn valonlähteen erilaisuus. Mikroskopia-FISH:ssä näytettä valaistaan laajaspektrisellä valolla, joka kykenee virittämään usean eri viritysaallonpituuden omaavia fluorokromeja samanaikaisesti. Aallonpituussuodatinta vaihtamalla samasta näytteestä voidaan kulloinkin laskea halutun fluorokromin sisältävä bakteeripopulaatio.

10 Virtaussytometriassa fluorokromien virittäminen tapahtuu usein yhtä aallonpituutta sisältävällä laserilla. Mikäli yhdellä laserilla varustetulla virtaussytometrillä tutkitaan kahta tai useampaa fluorokromia samanaikaisesti, on käytettävien fluorokromien oltava sellaisia, että ne virittyvät samalla aallonpituudella, mutta niiden emissiot eroavat siten, että kukin populaatio voidaan tunnistaa omalla FL-

15 detektorillaan. Tällaisten fluorokromiyhdistelmien käyttö on yleistä eukaryoottisolunäytteiden analyyseissa, mutta toimivia FISH-tekniikkaan sopivia fluorokromiyhdistelmiä ei tunneta (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes). Käytännössä tämä on tarkoittanut sitä, että virtaussytometria-FISH:llä ei ole ollut mahdollista erottaa ja laskea koettimella

20 hybridisoitunutta ja DNA-värjäytynyttä kohdepopulaatiota vain DNA-värjäytyneestä näytteen muut bakteerit sisältävästä populaatiosta sekä ei-bakteeriperäisten partikkelien muodostamasta taustapopulaatiosta samassa analyysissä.

Tähänastisissa, vain tieteelliseen tutkimuskäyttöön soveltuvissa, virtaussytometria-FISH –menetelmissä 16S rRNA-hybridisoituneen kohdepopulaation erottaminen näytteen muista bakteereista ja taustapopulaatiosta on perustunut useaan eriaikaiseen analyysiin sekä muiden kuin fluoresenssiparametrien käyttöön. Näytteen sisältämien bakteerisolujen määrää ja hybridisoituneiden kohdebakteerien osuutta ei ole voitu laskea samassa analyysissä. Toistaiseksi parhaassa

30 virtaussytometria-FISH -menetelmässä kohdebakteerit on fluoresenssin erotuskyvyn lisäämiseksi hybridisoitu kahdella eri koettimella (Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples with fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA targeted probes; E. G. Zoetendal et al., väitöskirjassa Molecular characterization of bacterial communities in the human gastrointestinal tract, 2001, E. G. Zoetendal, Wageningenin yliopisto, Hollanti). Koettimet on leimattu erilaisilla fluorokromeilla,

35

5 jotka näkyvät eri fluoresenssikanavilla. Koettimien fluorokromien viritys- ja emissioaallonpituusspektrit ovat niin kaukana toisistaan, että fluorokromien virittäminen ei enää onnistu yhdellä laserilla, vaan joudutaan käyttämään kahta eri aallonpituuden laseria, joiden säteet osuvat näytteen partikkeleihin eri aikaan. Tässä menetelmässä kumpaakin laseria joudutaan käyttämään kohdepopulaation erottamiseen näytteen muista bakteereista. Samoin pistekuvaajan kummatkin akselit käytetään kohdepopulaation erottamiseen näytteen muista bakteereista eikä kokonaisbakteeripopulaation samanaikainen erottaminen taustapopulaatiosta ole mahdollista. Kokonaisbakteerimäärän laskemista varten joudutaan tekemään toinen 10 analyysi, jossa näyte ei ole hybridisoitu vaan ainoastaan DNA-värjätty. Zoetendalin menetelmässä myös kohdepopulaation erottuminen näytteen muista bakteereista jää heikoksi mm. menetelmässä käytettyjen fluorokromien heikon intensiteetin ja suuren taustan vuoksi.

Toisessa käytössä olevassa sovellusvaihtoehdossa kohdepopulaatio on hybridisoitu 15 yhdellä koettimella, jossa on yksi fluorokromi (Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes; G. Wallner et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, p 1859-1866). DNA:ta sisältävien partikkelien erottamiseksi DNA:ta sisältämättömistä partikkeleista hybridisoitu näyte on värjätty DNA-värillä, joka ei ole viritettävissä samalla laserilla kuin 20 koettimen fluorokromi, joten tässäkin menetelmässä käytetään kahta laseria. Tavoitteena Wallnerilla on ollut kohdebakteeripopulaation, näytteen muiden bakteerien ja taustapopulaation samanaikainen erottaminen samassa kuvaajassa. DNA-väriksi Wallner on valinnut ultraviolettiaallonpituusalueen valoa absorboivan ja emittoivan fluorokromin (Hoechst Blue, Molecular Probes) ja koettimeen liitetty 25 fluorokromi on sinivihreän aallonpituusalueen fluoreskaiini. Vaikka menetelmässä on käytetty hyvin voimakkaita ja kalliita, satojen milliwattien tehoisia vesijähdytteisiä lasereita, käytettyjen fluorokromien intensiteetti jää heikoksi ja populaatioita ei voida tyydyttävästi erottaa toisistaan yhdessä analyysissä. Erottaakseen DNA-värjäytyneet partikkelit DNA-värjäytymättömistä partikkeleista 30 Wallner joutuu käyttämään ylimääräistä sovellusohjelmaa, joka jättää DNA-värjäytymättömät partikkelit kokonaan analyysin ulkopuolelle eikä DNA-värjäytyneitä ja DNA-värjäntymättömiä partikkeleita saada samaan pistekuvaajaan. Tämä heikentää menetelmän luotettavuutta. Wallner ei myöskään laske bakteerien konsentraatiota tilavuusyksikköä kohden, vaan ainoastaan 35 bakteerilajien suhteellisia osuuksia.

Kolmas tieteellisissä julkaisuissa esitetty virtausytometrinen menetelmä 16S rRNA-hybridisoitujen sekabakteerinäytteiden analysoimiseksi perustuu yhden laserin ja sille sopivien DNA-värin ja koettimeen liitetyn fluorokromin käyttöön (Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations; R. Amann et al., Applied and Environmental Microbiology, 1990, vol. 56, p. 1919-1925). Tässäkään 5 menetelmässä koettimissa käytettyjen fluorokromien fluoresenssin matala intensiteetti ei mahdollista kohdebakteerien eli analysoitavien bakteerien erottumista näytteen muista bakteereista. Käytetyn DNA-värin absorptiomaksimi on 10 samalla aallonpituusalueella kuin koettimen fluorokromin emissiomaksimi. Kohdebakteereita näytteen muista bakteereista erottava koettimen fluorokromi kuluttaa emissioenergiaansa DNA-värin virittämiseen eikä kohdebakteerien fluoresenssi riitä niiden luotettavaan erottumiseen näytteen muista bakteereista. Mikäli DNA-väri ja fluorokromilla leimattu koetin ovat sitoutuneet riittävän lähelle 15 toisiaan, voi näiden välinen energiansiirto tapahtua myös suoraan molekyylien välisenä energiansiirtona ilman fotoneja esimerkiksi FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) -ilmiönä (Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: Advantages and limitations; P. Batard Cytometry, 2002, vol. 48, p. 97-105). 20 Kohdebakteeripopulaatio ja näytteen muiden bakteerien muodostama populaatio jäävät pistekuvaajalla päällekkäiseksi eikä bakteerisolujen lukumäärää ja kohdebakteerien osuutta näytteen kokonaisbakteerimäärästä voida laskea.

Kuten edellä on esitetty, Zoetendalin, Wallnerin kuin Amannin menetelmissä kaikkia kolmea populaatioita: kohdebakteereita, näytteen muita bakteereita ja DNA-värjäytymättömiä partikkeleita ei saada luotettavasti erottumaan. Näytteen 25 bakteerikonsentraatiota ja kohdebakteerien osuutta ei saada laskettua luotettavasti. Nämä menetelmät eivät siis sovellu monimutkaisten sekabakteerinäytteiden kuten ulosteen bakteerikonsentraatioiden laskemiseen sekä yksittäisten bakteerilajien spesifiseen ja luotettavaan tunnistamiseen ja laskemiseen. Tämän seurauksena 30 virtausytometriset sekabakteerinäyteanalyysit ovat olleet epäluotettavia ja mikroskopia-FISH on edelleen ainoa varteenotettava menetelmä sekabakteerinäytteiden sisältämien bakteerien lajispesifiseksi tunnistamiseksi ja laskemiseksi.

Keksinnön tavoitteena onkin nyt saada aikaan menetelmä, jolla on mahdollista 35 analysoida sekabakteerinäyte, tunnistaa siinä olevat bakteerit ja/tai bakteerilajit sekä mitata niiden osuudet näytteessä. Keksinnön tavoitteena on lisäksi saada aikaan

menetelmä, jolla on mahdollista mitata myös bakteerien ja/tai bakteerilajien konsentraatiot näytteessä. Edelleen keksinnön tavoitteena on saada aikaan tällainen menetelmä joka olisi nopea, halpa ja luotettava.

KEKSINNÖN LYHYT KUVAUS

5 Edellä esitetyt tavoitteet on nyt saavutettu keksinnön mukaisella menetelmällä.

Keksinnön kohteena on menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, joka bakteerinäyte sisältää partikkeleita. Keksinnölle on tunnusomaista se, mitä on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä

- a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- 15 c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- 20 e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä toisella aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- 25 g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja,

ja lisäksi fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla.

30

Keksinnön kohteena on lisäksi keksinnön mukaisen menetelmän käyttö bakteerikantojen tunnistamiseen ja niiden osuuksien mittaamiseen.

KEKSINNÖN TARKEMPI KUVAUS

Keksinnön mukaisessa menetelmässä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, joka bakteerinäyte sisältää partikkeleita,

- 5 a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- 10 c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä
- 15 f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja,

20 ja lisäksi fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella

25 asteikolla.

Keksinnön mukainen menetelmä siis ratkaisee yllä kuvatut ongelmat ja mahdollistaa virtaussytometrian laajamittaisen käytön sekabakteerinäytteiden sisältämien bakteerilajien lajispesifisessä tunnistamisessa ja bakteerisolujen laskemisessa. Keksinnön mukaisella menetelmällä on siis mahdollista analysoida

30 sekabakteerinäyte, tunnistaa siinä olevat bakteerit ja/tai bakteerilajit sekä mitata niiden osuudet näytteessä, kuten jäljempänä esitetään. Lisäksi keksinnön mukainen menetelmä on nopea, halpa ja luotettava.

Keksinnön mukainen virtaussytometrinen menetelmä bakteerien lajispesifiseksi tunnistamiseksi ja niiden osuuden mittaamiseksi sekabakteerinäytteestä eroaa

merkittävästi aiemmin kuvatuista menetelmistä siinä, että kohdebakteerien, näytteen muiden bakteerien ja taustapopulaation erottaminen sekä näytteen sisältämien bakteerisolujen tarkan lukumäärän ja kohdebakteerien osuuden laskeminen on mahdollista yhdellä analyysillä.

- 5 Olennainen ero Zoetendalin kahta laseria hyödyntävään menetelmään on siinä, että Zoetendalin menetelmässä kumpaakin laseria käytetään koettimissa olevien fluorokromien virittämiseen eli kohdebakteerien erottamiseen näytteen muista bakteereista eikä DNA-värjäytynyttä kokonaisbakteeripopulaatiota voida erottaa taustapopulaatiosta samassa analyysissä. Analysoitavien partikkelien kynnsarvo on
- 10 Zoetendalin menetelmässä säädetty FSC-parametrille. Tämä on johtanut otoksen vääristymään, koska suurella osalla bakteerisoluista FSC-parametrin arvo on jäänyt alle säädetyn kynnsarvon. Heikko otos on todettavissa Zoetendalin julkaisun kuvista. Kahden eri analyysin ja näytteen käyttö heikentää tulosten luotettavuutta olennaisesti. Kahden koettimen käyttö lisää kustannuksia ja osaltaan myös
- 15 heikentää menetelmän luotettavuutta, koska koettimet eivät välttämättä hybridisoi samoja bakteerilajeja. Zoetendalin menetelmässä ei myöskään voida osoittaa, että koettimet todella olisivat sitoutuneet DNA:ta sisältäviin partikkeleihin, koska DNA-värjäytyneitä ja hybridisoituneita bakteereita tarkastellaan eri näytteistä.

- Toisaalta taas nyt kehitetyn menetelmän olennainen ero Wallnerin menetelmään
- 20 nähden on mm. siinä, että Wallner käyttää DNA-värinä UV-aallonpituusalueen fluorokromia ja hybridisaatiokoettimessa sinivihreän aallonpituusalueen fluorokromia. Wallnerin käyttämät fluorokromit ovat niin matalaintensiteettisiä, että näytteen eri populaatiot eivät erotu luotettavasti. Wallnerin kynnsarvona on SSC-parametri, mikä aiheuttaa otosjoukon vääristymän. Wallner poistaa DNA-värjäytymättömät partikkelit analyyseistä tietokoneohjelman avulla, mikä johtaa
- 25 otoksen lisävääristymään. Menetelmäjärjestelynsä vuoksi Wallner käyttää suuritehoisia ja kalliita satojen milliwattien vesijäähdytteisiä argon-ionilasereita eikä kohdebakteereita silti pystytä erottamaan näytteen muista bakteereista. Wallnerin julkaisussa sekabakteerinäytteenä on käytetty vedenpuhdistuksessa
- 30 käytettävää aktiivilietettä, joka on keinotekoinen sekabakteerinäyte. Aktiivilietteen bakteerit sisältävät enemmän rRNA:ta kuin luonnontilaiset bakteerit, joten Wallnerin käyttämää näytettä ei voi verrata suoliston bakteeriflooran kaltaiseen monimutkaiseen ekosysteemiin. Wallner itsekin toteaa artikkelissaan, että hänen menetelmänsä ei toimi aktiivilietettä monimutkaisempien sekabakteerinäytteiden
- 35 kuten ulosteen tutkimisessa.

Amannin menetelmä yksilaserosvelliuksineen taas on perustavalla tavalla erilainen kuin tässä patenttihakemuksessa esiteltävä menetelmä.

5 Merkittävä etu tämän patenttihakemuksen kohteena olevalla menetelmällä saavutetaan siinä, että kaikkien kolmen populaation: kohdebakteeripopulaation, näytteen muiden bakteerien muodostaman populaation ja taustapopulaation luotettava samanaikainen erottaminen on mahdollista. Tämä nopeuttaa näytteiden analyysiä ja tekee sekabakteerinäytteiden sisältämien bakteerien lajispesifisestä tunnistamisesta ja laskemisesta aiempaa luotettavampaa sekä mahdollistaa näytteen bakteerikonsentraation selvittämisen.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä hybridisoituneiden koettimien voidaan todistaa todella olevan bakteereissa eikä esimerkiksi taustapopulaation partikkeleissa, koska hybridisoituneet partikkelit voidaan havaita DNA-värjäytyneinä samassa analyysissä. Lisäetu nyt kehitetyssä menetelmässä on se, että menetelmä sopii käytettäväksi ainakin yleisimmissä helposti automatisoitavissa
15 olevista virtausytometreista. Myös käytettävät fluorokromit ovat hinnaltaan edullisia ja laajalti kaupallisesti saatavilla. Käyttämällä esimerkiksi hybridisaatiokoettimeen liitettynä fluorokromina punaisen aallonpituusalueen valoa riittävästi absorboivaa ja emittoivaa fluorokromia ja DNA-väriä (eli DNA:han sitoutuneena fluorokromina) oranssin tai lyhyemmän aallonpituusalueen valoa
20 riittävästi absorboivaa ja emittoivaa fluorokromia, ei haittaavaa energian siirtoa fluorokromien välillä tapahdu. Mikäli fluorokromeja käytettäisiin siten, että hybridisaatiokoettimeen liitettäisiin lyhyemmän aallonpituusalueen valoa absorboiva ja emittoiva fluorokromi ja DNA-väriä käytettäisiin pidemmän aallonpituusalueen valoa absorboivaa ja emittoivaa fluorokromia, voisi
25 kohdebakteerien erottumista näytteen muista bakteereista haittaavaa energian siirtoa fluorokromien välillä tapahtua.

Keksinnön mukainen FISH-tekniikalla hybridisoitujen bakteerien virtausytometrinen analyysi on nopeana, koneellisena ja automatisoitavissa olevana menetelmänä huomattavasti mikroskopia-FISH:ä parempi menetelmä
30 monimutkaisten sekabakteerinäytteiden lajispesifiseksi tutkimiseksi ja laskemiseksi. Virtausytometrillä pystytään luotettavasti tunnistamaan jopa tuhansia partikkeleita sekunnissa. Aikayksikössä tunnistettujen bakteerien määrä on täten moninkertainen mikroskopiaan nähden. Oikein viritetyn virtausytometrialaitteiston antama tieto on yksiselitteistä, mikä vähentää inhimillisten tekijöiden aiheuttamaa virhettä.
35 Virtausytometrialla voidaan myös laskea näytteen sisältämien bakteerien lukumäärä muita menetelmiä tarkemmin ja nopeammin.

Bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamisella tarkoitetaan suhteellisen tai absoluuttisen osuuden mittaamista. Keskimääräinen fluoresenssin intensiteetti (mean fluorescence intensity) lasketaan joko aritmeettisella tai geometrisella tavalla. Edullisesti käytetään geometrista keskiarvoa. Alan ammattilaiselle on selvää, että
5 mikäli jakauma noudattaa oleellisesti Gaussin käyrää, saadaan molemmilla tavoilla sama tulos, mutta mikäli näin ei ole, saadaan geometrisella tavalla kuvaavampi tulos.

Koettimen sitouttamisella tarkoitetaan sitä, että näytteeseen lisätään koetinta ylimäärä ja se sitoutuu ainoastaan niihin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin
10 (rRNA-molekyyli) johon se on tarkoitettu sitoutumaan. Menetelmässä käytetään erityisen edullisesti spesifisiä koettimia ja fluorokromeja, joita tunnetaan useita. Esimerkkejä koettimista on annettu muun muassa julkaisussa *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*; R. I. Amann et al., *Microbiological Reviews*, 1995, vol. 59, p. 143-169 ja
15 esimerkkejä fluorokromeista on annettu muun muassa julkaisussa *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes*. Ylimäärä koetinta voidaan joko pestä pois näytteestä tai jättää näytteeseen, sillä siitä tulevan fluoresenssin ja siroamisen intensiteetti ei ole riittävän korkea häiritäkseen tulosten tulkintaa.

20 Fluorokromi on yleensä liitetty koettimeen jo ennen koettimen sitouttamista bakteerin rRNA-molekyyliin. Fluorokromi voi olla liitetty koettimeen jo koetinta ostettaessa tai se on mahdollista liittää siihen ennen menetelmän mukaisen käsittelyn aloittamista.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan mainitut koettimet sitoutetaan
25 ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin jotka on valittu joukosta, jossa on 16S-ribosomaaliset RNA-molekyylit ja 23S- ribosomaaliset RNA-molekyylit.

Keksinnön erään toisen suoritusmuodon mukaan vaiheessa d) virtausytometriin syötettävässä bakteerinäytteessä on lisäksi mikropartikkeleita, joiden sirontaominaisuudet ja/tai fluoresenssiominaisuudet eroavat bakteerinäytteen
30 partikkeleiden sirontaominaisuuksista ja/tai fluoresenssiominaisuuksista. Bakteerinäytteen partikkeleilla tarkoitetaan tässä sen sisältämiä bakteereja, epäpuhtauksia ja muita valoa sirottavia ja/tai fluoresoivia yksiköitä. Keksinnön mukaisessa menetelmässä on mahdollista käyttää lisäksi vakioidun näytemäärän annostelevaa syöttölaitetta, virtausmittaria tai jotakin muuta alan ammattimiehen
35 sinänsä tuntemaa laitetta, jolla on mahdollista mitata analysoidun näytteen määrä.

Tällä tavoin on mahdollista määrittää analysoitavien bakteerien ja bakteerilajien konsentraatio näytteessä. Analysoitavan näytteen sisältämien bakteerisolujen tarkan lukumäärän, bakteerikonsentraation ja kohdebakteerien osuuden laskemiseksi voidaan siis käyttää esimerkiksi fluoresoivia mikropartikkeleita tai vakioisen
5 näytemäärän annostelevaa syöttölaitetta.

Bakteerien kappalemäärä voidaan siis määrittää käyttämällä kaupallisia näyteputkia, jotka sisältävät tunnetun lukumäärän mikropartikkeleita (esimerkiksi TruCount™, valmistaja Becton Dickinson). Mikropartikkelit ovat luotettavasti erotettavissa muista sekabakteerinäytteen partikkeleista sironta- ja fluoresenssiominaisuuksiensa
10 perusteella. Näyteputki sisältää tunnetun määrän mikropartikkeleita ja näyteputken annostellaan tunnettu määrä tutkittavaa näytettä. Näytteeseen homogeenisesti jakautuneista mikropartikkeleista tunnistetaan osa. Tunnistettujen mikropartikkelien osuus putken kaikista mikropartikkeleista on suoraan verrannollinen samassa ajassa tunnistettujen bakteerien osuuteen näytteen kaikista bakteereista. Täten näytteen
15 bakteerikonsentraatio voidaan helposti laskea. Toinen vaihtoehto näytteen sisältämien bakteerien lukumäärän laskemiseksi on vakioisen näytemäärän annostelevan syöttölaitteen käyttäminen (esimerkiksi Particle Analysing System PAS, Partec). Syöttölaite annostelee tunnetun tilavuuden näytettä. Annostellun tilavuuden osuus näytteen kokonaistilavuudesta on suoraan verrannollinen
20 tunnistettujen bakteerien osuuteen näytteen kokonaisbakteerimäärästä.

Käytettäessä mainittuja mikropartikkeleita, jotka siis eroavat sironta- ja/tai fluoresenssiominaisuuksiltaan näytteen partikkeleista, voidaan nämä mikropartikkelit lisätä vaiheiden a)-c) mukaisesti käsiteltyyn näytteeseen tai
25 päinvastoin. Samoin mainitut mikropartikkelit on mahdollista lisätä näytteeseen missä tahansa vaiheessa ennen vaihetta d) eli näytteen syöttämistä virtaussytometriin. Erityisen edullisesti käytetään valmiita koeputkia, joissa on ennalta määritelty määrä mikropartikkeleita. Tällaisia putkia valmistaa ja markkinoi muun muassa yritys Becton Dickinson.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä mainitut ensimmäisellä ja toisella
30 aallonpituusalueella olevat monokromaattiset valot voidaan tuottaa yhdellä, kahdella, kolmella tai useammalla valonlähteellä. Mikäli mainitut valot tuotetaan useammalla kuin yhdellä valonlähteellä, voivat nämä valonlähteet olla sijoitettu siten, että niiden tuottamat valonsäteet kohdistuvat laitteessa yhteen, kahteen tai useampaan kohtaan. Mikäli valonsäteet kohdistuvat useampaan kuin yhteen
35 kohtaan, käytetään menetelmässä edullisesti signaalinviivästyslaitteistoa ensimmäisellä valonlähteellä syntyneiden jännitepulssien viivästämiseksi.

fluorokromeja viritetään punaisen aallonpituusalueen laserilla tutkittavan lajin bakteerien erottamiseksi muista bakteereista. Näytteessä oleviin DNA:ta sisältäviin partikkeleihin sitoutunut DNA-väri viritetään oranssin tai lyhyemmän aallonpituusalueen laserilla DNA:ta sisältävien partikkelien erottamiseksi DNA:ta sisältämättömistä partikkeleista. Näytteen sisältämien bakteerisolujen tarkka lukumäärä ja kohdebakteerien osuus kaikista bakteereista lasketaan näytteeseen homogeenisesti suspensoituja fluoresoivia mikropartikkeleita käyttämällä. Menetelmän toimivuus on testattu laskemalla *Bifidobacterium*-suvun bakteerien määrä ihmisulostenäytteistä ja laskemalla samasta analyysistä ihmisulosteen kokonaisbakteerimäärä sekä *Bifidobacterium*-suvun bakteerien osuus ulostenäytteiden kaikista bakteereista, kuten jäljempänä on esitetty kokeellisessa osassa. Verrokkimenetelmänä on käytetty ainoaa laajassa käytössä olevaa sekabakteerinäytteiden analyysimenetelmää eli mikroskopia-FISH:ä. Työläs mikroskopia-FISH suoritettiin erityistä huolellisuutta ja tarkkuutta noudattaen. Menetelmät antavat yhtäpitävät tulokset, mikä todistaa virtausytometrisen menetelmän toimivuuden. Tässä esitetty menetelmä on siis esimerkki keksinnön mukaisesta menetelmästä.

Keksinnön kohteena on lisäksi tämän menetelmän käyttö bakteerikantojen tunnistamiseen ja niiden osuuksien mittaamiseen. Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan mainittu bakteerikanta on probioottinen bakteerikanta. Alan ammattilaiselle on selvää, että keksinnön mukaista menetelmää on mahdollista käyttää myös minkä tahansa muun bakteerikannan tunnistamiseen, edellyttäen että tunnistettavalle bakteerikannalle on saatavissa menetelmään soveltuvia koettimia ja fluorokromeja. Keksinnön mukaista menetelmää on mahdollista käyttää esimerkiksi prebioottien tutkimiseen.

Teollista ja tieteellistä sovellettavuutta menetelmällä on näin ollen esimerkiksi elintarvike- ja rehuteollisuudessa sekä lääketieteellisessä diagnostiikassa. Lääketieteellisessä diagnostiikassa menetelmällä ei kuitenkaan saavuteta suoraan sellaista tulosta, josta olisi mahdollista diagnosoida tauti, vaan tulosten tulkintaan tarvitaan lääketieteeseen perehtynyt henkilö. Funktionaalisten elintarvikkeiden valmistajat tarvitsevat luotettavan ja nopean sekabakteerinäytteiden analyysimenetelmän, jotta elintarvikkeiden mahdollinen vaikutus esimerkiksi suoliston bakteerikasvuston bakteerilajeihin ja niiden määräsuhteisiin voidaan todeta. Rehuteollisuus pyrkii torjumaan mm. siipikarjan salmonellainfektioita kehittämällä sellaisia rehuja, jotka suosisivat hyvänlaatuisten bakteerien kasvua eläinten suolistossa. Tämä vähentäisi antibioottien käytön tarvetta eläinten

- kasvatuksessa ja vähentäisi antibioottiresistenttien bakteerilajien syntyä. Lääketieteellisessä tutkimuksessa ja kliinisessä diagnostiikassa uusille sekabakteerinäytteiden lajispesifisille analyysi- ja laskentamenetelmille on kasvavaa kysyntää. Ihmisen suolistoflooran tiedetään sisältävän enemmän bakteerisoluja kuin
- 5 mitä ihmisessä on omia eukaryoottisoluja, joten mikrobien ja isäntäelimestön välinen kanssakäyminen on laajaa ja suurelta osin tuntematonta (Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians; W. E. C. Moore and L. V. Holdeman, Applied Microbiology, 1974, vol. 27, p. 961-979). Elimistön mikrobikolonisaatioiden on arveltu olevan useiden etiologialtaan vielä
- 10 tuntemattomien tautien syynä. Esimerkkejä tällaisista sairauksista ovat allergiat ja nivelreuma (Studies on faecal microecology with reference to diet, medication and rheumatoid arthritis; R. Peltonen, väitöskirja, 1994, Turun yliopisto, ja The role of gut microflora in the hygiene hypothesis of allergy; M. Kalliomäki, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).
- 15 Keksintöä on seuraavassa selitetty tarkemmin oheisen piirustuksen avulla.

PIIRUSTUKSEN SELITYS

Piirustus koostuu seuraavista kuviosta:

Kuvio 1 esittää kaavamaisesti keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyä virtaussytometriä.

- 20 Kuvio 2 esittää kaavamaisesti poikkileikkauksen kuviossa 1 esitetystä virtaussytometrissä.

Kuviot 3a, 3b ja 3c esittävät kaavamaisesti signaalin muodostumisen periaatetta virtaussytometriassa.

Kuvio 4 esittää kaavamaisesti signaalinviivästyslaitteiston toimintaperiaatetta.

- 25 Kuvio 5 esittää esimerkin tuloksia.

- 30 Kuvio 1 esittää kaavamaisesti keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyä virtaussytometriä. Kuviossa 1 on esitetty laser 1 ja siitä lähtevä lasersäde 2. Kuviossa on lisäksi esitetty laser 3, josta lähtevän lasersäteen 4 aallonpituus on lyhyempi kuin lasersäteen 2 aallonpituus. Edelleen kuviossa on esitetty virtauskammio 5, jossa näyteliuos 6 ja sitä ympäröivä vaippaliuos 7 virtaavat nuolien 8 osoittamaan suuntaan. Näyteliuos 6 syötetään vaippaliuokseen 7 näytteesyöttöneulan 9 avulla. Näyteliuoksessa 6 on analysoitavia partikkeleita 10,

joka voi olla hybridisoitunut ja DNA-värjäytynyt bakteeri, hybridisoitumaton DNA-värjäytynyt bakteeri, DNA-värjäytymätön DNA:ta sisältämätön partikkeli tai bakteerien lukumäärän laskemisessa apuna käytetty mikropartikkeli. Näyteliuos 6 virtaa lasersäteiden 2 ja 4 poikki niin kapeana, että sen sisältämät partikkelit muodostavat partikkelijonon 11. Partikkelijonon 11 ja lasersäteiden 2 ja 4 leikkauskohdat on merkitty viitenumeroin 12 ja 13, vastaavasti.

Laitteessa on edelleen FSC-detektorina toimiva fotodiode 14, FL4-detektorina toimiva valomonistinputki 15, FL2-detektorina toimiva valomonistinputki 16 ja SSC-detektorina toimiva valomonistinputki 17. Laitteessa on lisäksi virtaussytometrin optiseen järjestelmään kuuluvia optisia suodattimia ja peilejä 18, joilla partikkeleista sironnut ja fluoresoiva tietyn aallonpituusalueen valo suodatetaan ja ohjataan detektoreille 14, 15, 16, 17. Laitteessa voi olla myös jäteastia 19, johon näyte analyysin jälkeen johdetaan. Kuvien yksinkertaistamiseksi niistä on jätetty pois FL1- ja FL3-detektorit. Tällainen toimintaperiaate on esimerkiksi yrityksen Becton Dickinson valmistamassa virtaussytometrissä mallia FACSCalibur™.

Kuviossa 2 on esitetty poikkileikkauskuva samasta laitteistosta kuin kuviossa 1. Kuviossa esitetään viitenumerolla 20 lasersäteen ja näyteliuoksen leikkauspisteessä oleva partikkeli, joka sirottaa ja fluoresoi valoa. Sironnut ja fluoresoitunut valo on esitetty kaaviomaisesti viivoilla 21.

Kuvioissa 3a, 3b ja 3c esitetään signaalin muodostumisen periaate. Kuviossa 3a on esitetty vaihe 1, jossa partikkeli 22 saapuu alhaalta ylöspäin kulkevan nestevirran mukana lasersäteeseen 23. Lasersäde 23 siroaa partikkelista 22 ja fluorokromit virittyvät ja emittoivat emissiospektrinsä mukaista valoa. Virtaussytometrin fotodiode ja valomonistinputket sekä virtaussytometrin muu elektroniikka muuttaa optiset signaalit analogisiksi jännitepulsseiksi, kuten on kuvattu koordinaatistossa, jossa x-akselilla on esitetty aika ja y-akselilla jännite. Jännitepulslien huippujännite saavutetaan vaiheessa 2, joka on esitetty kuviossa 3b, kun partikkeli 22 on kokonaan lasersäteessä 23. Lasersäteen 23 sironna ja emittoivien fluorokromien määrä on tällöin suurimmillaan. Kuviossa 3c esitetyssä vaiheessa 3 partikkelin 22 poistuessa lasersäteestä 23 jännite alkaa vastaavasti laskea. Jännitepulslien muodostumiseen kulunut aika riippuu partikkelin 22 koosta ja virtausnopeudesta ja on käytännössä joitakin mikrosekunteja.

Kuviossa 4 esitetään esimerkinomaisesti signaalin viivästämisen periaate kahta laseria käyttävässä virtaussytometrissä. Kuviossa on esitetty partikkeleita 10 jotka

muodostavat näyteliuoksen partikkelijonon sekä ensimmäisen lasersäteen ja partikkelijonon leikkauskohta 12 ja toisen lasersäteen ja partikkelijonon leikkauskohta 13, kuten kuviossa 1. Edelleen x-akselilla on kuvattu jännitepulssit. Ensimmäinen jännitepulssi, joka syntyy partikkelin 10 kohdatessa ensimmäisen eli pidempiaallonpituuksisen laserin säteen leikkauskohdassa 12, on kuvattu viitenumerolla 24. Esimerkissä pidempiaallonpituaisen laserin partikkelissa 10 aiheuttama fluoresenssi detektoidaan FL4-detektorilla, eli jännitepulssi 24 syntyy FL4-valomonistinputkella.

Viitenumerolla 25 esitetään jännitepulssia, joka syntyy partikkelin 10 myöhemmin kohdatessa toisen eli lyhyempiaallonpituuksisen laserin leikkauspisteessä 13. Esimerkissä lyhyempiaallonpituuksisen laserin partikkelissa 10 aiheuttama fluoresenssi detektoidaan FL2-detektorilla, lasersäteen sironta matalissa kulmissa FSC-detektorilla ja lasersäteen sironta suuremmissa kulmissa SSC-detektorilla. X-akselilla esitetty ensimmäisen ja toisen jännitepulssin syntymisen välinen aika t on se aika, joka partikkelilta 10 kuluu ensimmäisen ja toisen laserin välisen matkan kulkemiseen. Jotta partikkelin 10 eri ajassa ja tilassa synnyttämät signaalit tunnistetaan samasta partikkelista peräisin oleviksi, on ensimmäistä jännitepulssia viivästettävä aika t virtapiirissä 26. Viivästetty jännitepulssi on esitetty viitenumerolla 27. Signaalinviivästyksellä laserien samassa partikkelissa 10 eri ajanhetkinä synnyttämät fluoresenssi- ja sirontasignaalit synkronoidaan samaan ajanhetkeen, jotta eri lasereilla samasta partikkelista 10 saadut parametrit kuvautuvat samasta partikkelista 10 peräisin oleviksi.

Kuviossa 5 esitetään 16S rRNA-tekniikalla hybridisoidun, DNA-värjätyn ja mikropartikkeleja sisältävään koeputkeen homogenisoidun ulostenäytteen virtaussytometria-analyysillä saatu pistekuvaaja. Jokainen kuvaajassa oleva piste vastaa yhtä mitattua partikkelia. X-akselin logaritmisella asteikolla mitataan koettimeen liitettyjen fluorokromien fluoresenssin suhteellista intensiteettiä (kanavalla FL4) ja y-akselilla DNA-väri fluoresenssin suhteellista intensiteettiä (kanavalla FL2). Kuvaajan x-akselilla on esitetty jännitepulssin korkeutta (FL4 H, jossa H tarkoittaa korkeutta) ja samoin y-akselilla on esitetty jännitepulssin korkeutta. Kuvaajilla olisi mahdollista esittää myös jännitepulssin leveyttä tai pinta-alaa. Pistekuvaajassa voidaan erottaa neljä eri populaatiota:

1. vain DNA-väri sisältävät partikkelit eli näytteen muut bakteerit kuin kohdebakteerit, esitetty viitenumerolla 28,
2. kummallakin fluoresenssiparametrillä heikosti fluoresoivat partikkelit eli taustapopulaatio, esitetty viitenumerolla 29,

3. sekä koettimen että DNA-väriin sisältävät partikkelit eli kohdepopulaatio, esitetty viitenumerolla 30 ja
 4. voimakkaasti kummallakin fluoresenssikanavalla kuvautuvat mikropartikkelit, esitetty viitenumerolla 31.
- 5 Populaatiot 1. ja 3. muodostavat yhdessä näytteen kokonaisbakteeripopulaation. Ulostenäytteessä taustapopulaatio muodostuu suurimmaksi osaksi ruoansulatuskanavassa sulamattomista kuituisista materiaaleista. Esimerkissä selostetaan tarkemmin miten kuvio on saatu aikaan.

KOKEELLINEN OSA

10 Esimerkki

Keksinnön mukaisella menetelmällä tutkittiin ihmisen ulostenäytteitä hybridisoimalla niitä 16S rRNA-tekniikalla ja DNA-värjäyksellä (kuten on esitetty julkaisussa Quantative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples; P. S. Langendijk et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, p. 3069-3075). Koettimena käytettiin bifidobakteerispesifistä koetinta, joka oli leimattu punaisen aallonpituusalueen Cy5-leimalla (valmistaja yritys Eurogentec), jonka absorptiomaksimi on noin 643 nm ja emissiomaksimi noin 667 nm ja joka on täten tunnistettavissa FL4-detektorilla. DNA-väriä käytettiin oranssin aallonpituusalueen SYTOX™ Orange -väriä (valmistaja yritys Molecular Probes), jonka absorptiomaksimi on noin 547 nm ja emissiomaksimi noin 570 nm ja joka tunnistettiin FL2-detektorilla. SYTOX™ Orangen absorptiospektri on riittävän laaja virittyäkseen 488 nm:n laservalolla. Hybridisoitu ulostenäyte oli homogenisoitu TruCount™-mikropartikkeleita sisältävään koeputkeen (valmistaja yritys Becton Dickinson). Näytteessä oleva hybridisoitunut bifidobakteeri saapui nestevirtauksen tuomana 635 nm:n aallonpituuksisen punaisen diodilaserin optisesti fokusoidun säteen ja hydrodynaamisesti fokusoidun partikkelijonon leikkauspisteeseen. Bakteeriin hybridisoiduissa koettimissa olevat Cy5-fluorokromit absorboivat energiaa lasersäteestä ja fluoresoivat eli emittoivat absorboimaansa energiaa viritysaallonpituuttaan pidempiaallonpituusena valona joka tunnistettiin FL4-valomonistinputkella ja jännitepulssi alkoi syntyä, kuten on esitetty kuviossa 3a. Bakteerin ollessa vasta osittain ensimmäisen laserin säteessä vain pieni osa bakteerissa olevista koettimien fluorokromeista absorboi energiaa ja emittoi valoa, joten FL4-valomonistinputkella jännitepulssi ei ollut vielä huipussaan. Lasersäteen fluorokromeja virittävä vaikutus oli maksimissaan partikkelin ollessa säteen

fokuskohdan leikkauspisteen keskellä, jolloin jännitepulssi saavutti huippuarvonsa (kuten esitetään kuviossa 3b). Bakteerin poistuessa laserin säteestä energiaa absorboivien ja valoa emittoivien koettimiin liitettyjen fluorokromien määrä väheni, joten jännitepulssi laski (kuvio 3c). Syntyneitä jännitepulssia viivästettiin virtapiirissä 22 ± 1 mikrosekuntia. Viivästyksen aikana bakteeri saapui 488 nm:n aallonpituuksisen argon-ionilaserin säteen ja partikkelijonon leikkauspisteeseen. Laserin 488 nm:n aallonpituisen valo viritti bakteerin DNA:han sitoutunutta DNA-väriä, jonka fluoresoima viritysaallonpituuttaan pidempiaallonpituisen valo tunnistettiin FL2-valomonistinputkella. Näin syntyi toinen jännitepulssi.

10 Menetelmässä käytettiin kahta kynnsarvoa, jotta voitiin varmistua siitä, että bakteereiksi laskettavat partikkelit todella olivat bakteereja. SSC-parametrin kynnsarvo oli otoksen kattavuuden varmistamiseksi asetettu niin matalalle, että kaikki bakteerit tulevat tunnistetuksi. Näytteessä oli kuitenkin muitakin partikkeleita kuin bakteereja, joiden SSC-signaali ylitti kynnsarvon. Tämän

15 ongelman ratkaisemiseksi käytettiin toista kynnsarvoa, joka oli asetettu FL2-kanavalle, eli DNA-värin tunnistavalle kanavalle. SSC-kynnsarvon ylittävien partikkelien oli ennen mitatuksi tuloaan ylitettävä myös FL2-kynnsarvo, joten kahta kynnsarvoa käyttämällä voitiin bakteerit erottaa luotettavasti näytteen muista partikkeleista. Jännitepulssit vahvistettiin logaritmisella vahvistimella, digitoitiin ja

20 analysoitiin virtausytometriin liitettyllä tietokoneella. Jännitepulssin maksimikorkeus on verrannollinen bakteerissa olevien fluorokromien fluoresenssin intensiteettiin. Bakteerin FL2- ja FL4-kanavilla aiheuttamat signaalit käsiteltiin tietokoneella ja kuvattiin pistekuvaajassa (kuvio 5). Bakteerin ollessa yllä kuvatulla tavalla hybridisoitunut bifidobakteeri, se kuvautui kohdebakteeripopulaatioon

25 (viitenumero 30 kuviossa 5) kuuluvana. Mikäli bakteeri oli jokin hybridisoitumaton bakteeri, se kuvautui näytteen muiden bakteerien populaatioon kuuluvana (viitenumero 28 kuviossa 5). DNA-värjäytymättömät partikkelit kuvautuivat taustapopulaatioon (viitenumero 29 kuviossa 5) ja bakteerisolujen tarkan lukumäärän laskemiseen käytetyt fluoresoivat mikropartikkelit muodostivat oman populaationsa (viitenumero 31 kuviossa 5).

30

Taulukossa 1 esitetään viideltä vapaaehtoiselta koehenkilöltä viikon välein kerättyjen kolmen ulostenäytteen analyysien tulokset. Ulostenäytteet oli käsitelty yleisesti tunnetun kiinnitysmenetelmän mukaisesti ja hybridisoitu bifidobakteerispesifisellä koettimella sekä DNA-värjätty (kuten on esitetty julkaisussa Quantative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples; P. S. Langendijk et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, p.

35

3069-3075). Näytteen sisältämä kokonaisbakteerimäärä ja hybridisoituneiden bifidobakteerien määrä ja prosenttiosuus kaikista näytteen bakteereista on laskettu sekä virtaussytometrialla että fluoresenssimikroskopiolla. Virtaussytometrinen analyysi tehtiin keksinnön mukaisella menetelmällä ja fluoresenssimikroskooppinen analyysi Langendijkin julkaisun mukaisesti. Kuten Taulukosta 1 nähdään, menetelmät antavat hyvin samansuuntaiset tulokset niin bifidobakteerien osuuden kuin kokonaisbakteerien määrän suhteen. Virtaussytometrillä suoritettussa laskennassa on laskettu noin 20000 bakteeria jokaisesta näytteestä ja yhden näytteen analyysiaika on noin puoli minuuttia. Fluoresenssimikroskopiolla suoritettussa laskennassa on laskettu noin 2000 bakteeria per näyte ja aikaa yhden näytteen analysoimiseen on kulunut noin yksi tunti.

Koehenkilö	Aika (viikkoa)	Bakteerit ($10^{10}/g$)		Bifidobakteerien osuus	
		Mikroskopia	Virtaussytometria	Mikroskopia	Virtaussytometria
I	0	2.3	2.1	2.2 %	2.3 %
	1	2.9	2.2	3.7 %	3.5 %
	2	3.0	3.1	1.4 %	0.9 %
II	0	1.0	1.1	6.9 %	7.8 %
	1	1.2	1.5	4.5 %	4.3 %
	2	1.8	1.5	4.5 %	3.9 %
III	0	2.0	2.1	0.31 %	0.0 %
	1	2.8	2.2	0.63 %	0.0 %
	2	2.7	2.5	0.59 %	0.0 %
IV	0	2.8	2.7	1.7 %	1.3 %
	1	2.0	2.6	3.5 %	3.0 %
	2	3.2	2.4	2.9 %	2.3 %
V	0	2.3	3.1	6.1 %	5.9 %
	1	3.3	2.9	7.4 %	8.0 %
	2	2.6	2.8	5.5 %	6.0 %

Taulukko 1

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, joka bakteerinäyte sisältää partikkeleita, **tunnettu** siitä, että

- 5 a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- 10 c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä
- 15 f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja,

20 ja siitä, että fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella

25 asteikolla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut koettimet sitoutetaan ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin jotka on valittu joukosta, jossa on 16S-ribosomaaliset RNA-molekyylit ja 23S- ribosomaaliset RNA-molekyylit.

30 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa d) virtaussytometriin syötettävässä bakteerinäytteessä on lisäksi mikropartikkeleita, joiden sirontaominaisuudet ja/tai fluoresenssiominaisuudet eroavat bakteerinäytteen partikkeleiden sirontaominaisuuksista ja/tai fluoresenssiominaisuuksista.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että siinä käytetään lisäksi vakioidun näytemäärän annostelevaa syöttölaitetta.
5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen aallonpituusalue on 600-650 nm.
- 5 6. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että toinen aallonpituusalue on 350-600 nm.
7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut ensimmäisellä ja toisella aallonpituusalueella olevat monokromaattiset valot tuotetaan yhdellä valonlähteellä.
- 10 8. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut ensimmäisellä ja toisella aallonpituusalueella olevat monokromaattiset valot tuotetaan vähintään kahdella valonlähteellä.
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vähintään kaksi mainituista vähintään kahdesta valonlähteestä ovat etäisyyden päässä toisistaan ja että menetelmässä käytetään signaalinviivästyslaitteistoa ensimmäisellä ja valinnaisesti seuraavilla valonlähteillä syntyneiden jännitepulssien viivästämiseksi.
- 15
10. Jonkin patenttivaatimuksista 1-9 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut valonlähteet on valittu joukosta, jossa on 635 nm:n diodilaser ja 488 nm:n argon-ionilaser.
- 20
11. Jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että bakteerinäyte on nisäkkään elimistönestenäyte.
12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että bakteerinäyte on nisäkkään ruoansulatusjärjestelmästä peräisin oleva näyte.
- 25
13. Jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että bakteerinäyte on jätevesinäyte.
14. Jonkin patenttivaatimuksista 1-13 mukaisen menetelmän käyttö bakteerikantojen tunnistamiseen ja niiden osuuksien mittaamiseen.
15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että bakteerikanta on probioottinen bakteerikanta.
- 30

PATENTKRAV

1. Förfarande för identifiering av en eller flera bakterier och/eller bakteriearter och för mätning av andelen av minst två bakterier och/eller bakteriearter i ett bakterieprov, vilket bakterieprov uppvisar partiklar, **kännetecknat** därav, att

- 5 a) till minst en bakteries ribosomaliska RNA-molekyler binds sonder till vilka förbundits en första fluorokrom, vilken absorberar ljus på ett första våglängdsområde,
- b) till minst en bakteries DNA i bakterieprovet binds en andra fluorokrom, vilken absorberar ljus på ett andra våglängdsområde,
- 10 c) bakterieprovet matas till en flödescytometer,
- d) nämnda första fluorokrom exciteras i nämnda flödescytometer med ett på ett första våglängdsområde befintligt monokromatiskt ljus,
- e) nämnda andra fluorokrom exciteras i nämnda flödescytometer med ett på ett andra våglängdsområde befintligt monokromatiskt ljus,
- 15 f) ljuset, som sprider sig från provets partiklar, och fluorescensen av fluorokromen, som bundit sig till provets partiklar, detekteras, varvid en mängd spänningpulser erhålls, och
- g) nämnda mängd spänningpulser analyseras,

20 och därav att fluorokromerna och det monokromatiska ljusets våglängdsområden är valda, så att skillnaden mellan den genomsnittliga intensiteten av fluorescensen av sondersnas fluorokromer som bundits till bakterieprovets minst en bakteries ribosomaliska RNA-molekyler och av till bakterieprovets minst en bakteries DNA bundna fluorokromer är minst fyrdubbel på en logaritmisk skala.

25

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** därav, att nämnda sonder binds till ribosomaliska RNA-molekyler, vilka är valda ur en mängd med 16S-ribosomaliska RNA-molekyler och 23S-ribosomaliska RNA-molekyler.

30 3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** därav, att i skede d) finns det i bakterieprovet som matas in i flödescytometern ytterligare mikropartiklar vars spridningsegenskaper och/eller fluorescensegenskaper skiljer sig från partiklarnas spridningsegenskaper och/eller fluorescensegenskaper i bakterieprovet.

35 4. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** därav, att i förfarandet används ytterligare en matningsanordning som portionerar en konstant provmängd.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 4, **kännetecknat** därav, att första våglängdsområdet är 600 – 650 nm.
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 4, **kännetecknat** därav, att andra våglängdsområdet är 350 – 600 nm.
- 5 7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 6, **kännetecknat** därav, att nämnda på ett första och ett andra våglängdsområde befintliga monokromatiska ljus åstadkoms med en ljuskälla.
8. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 6, **kännetecknat** därav, att nämnda på ett första och ett andra våglängdsområde befintliga monokromatiska ljus
10 åstadkoms med åtminstone två ljuskällor.
9. Förfarande enligt patentkrav 8, **kännetecknat** därav, att åtminstone två av nämnda åtminstone två ljuskällor är belägna på avstånd från varandra och att i förfarandet används en signalfördröjningsanordning för att fördröja spänningspulserna som åstadkommit med den första och valfritt med följande
15 ljuskällor.
10. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 9, **kännetecknat** därav, att nämnda ljuskällor är valda ur en mängd med 635 nm diodlaser och 488 nm argon-jonlaser.
11. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 10, **kännetecknat** därav, att bakterieprovet är ett däggdjurs organismvätskeprov.
- 20 12. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat** därav, att bakterieprovet är ett prov från ett däggdjurs matsmältningssystem.
13. Förfarande enligt något av patentkraven 1 – 10, **kännetecknat** därav, att bakterieprovet är ett avfallsvattenprov.
14. Användning av förfarandet enligt något av patentkraven 1 – 13 för identifiering
25 av bakteriestammar och för mätande av deras andelar.
15. Användning enligt patentkrav 14, **kännetecknad** därav, att bakteriestammen är en probiotisk bakteriestam.

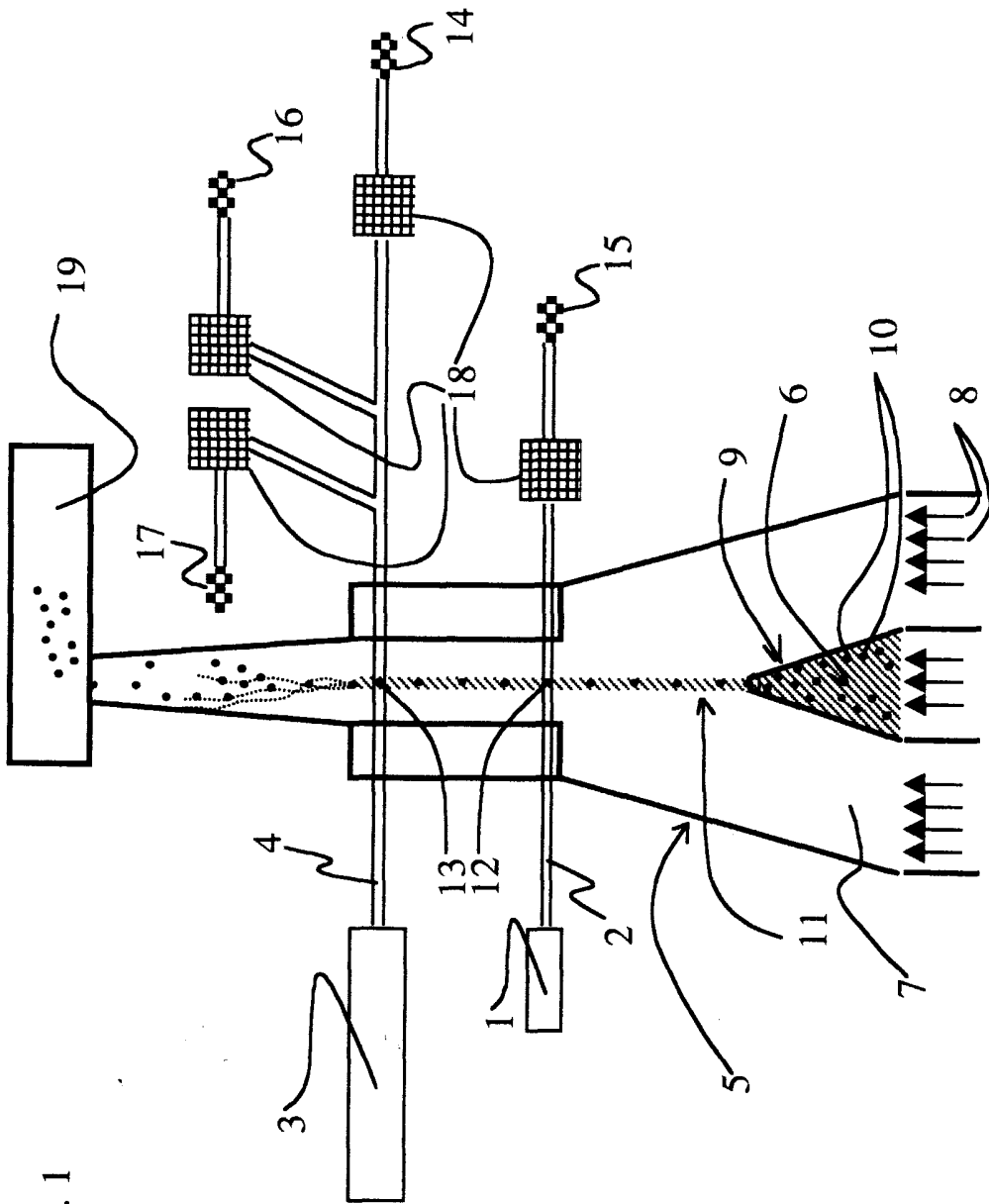
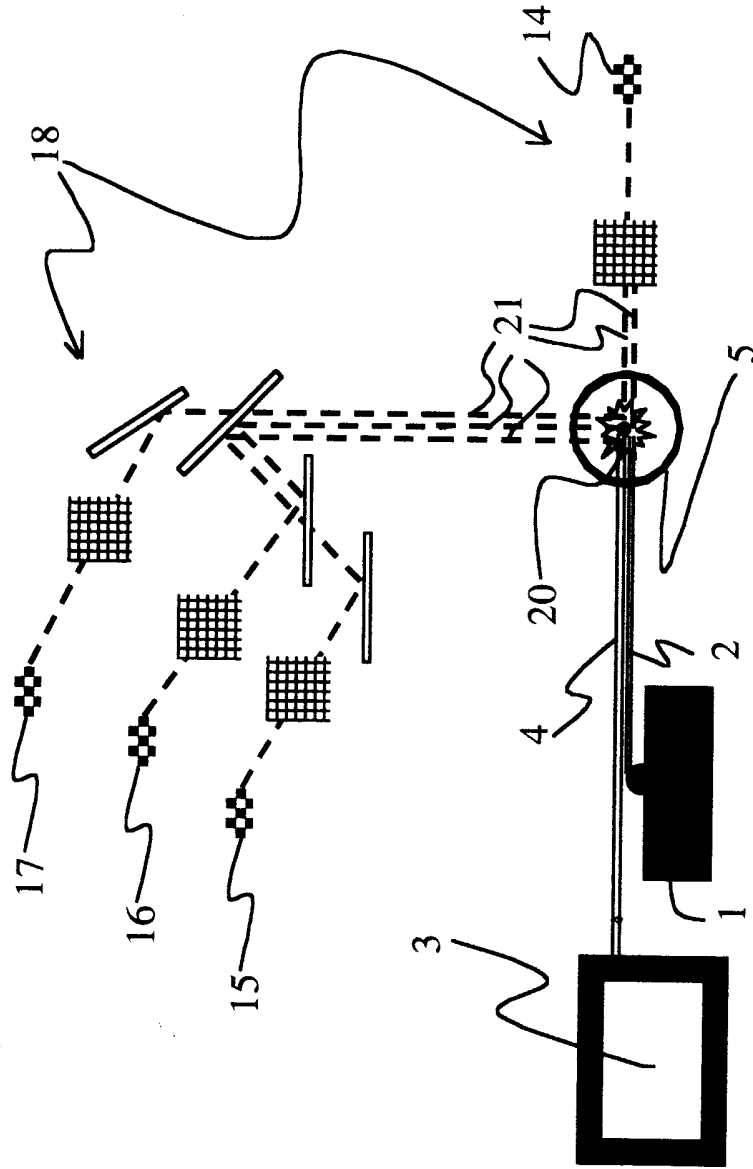


Fig. 1

070808 00144

070003 001433

Fig. 2



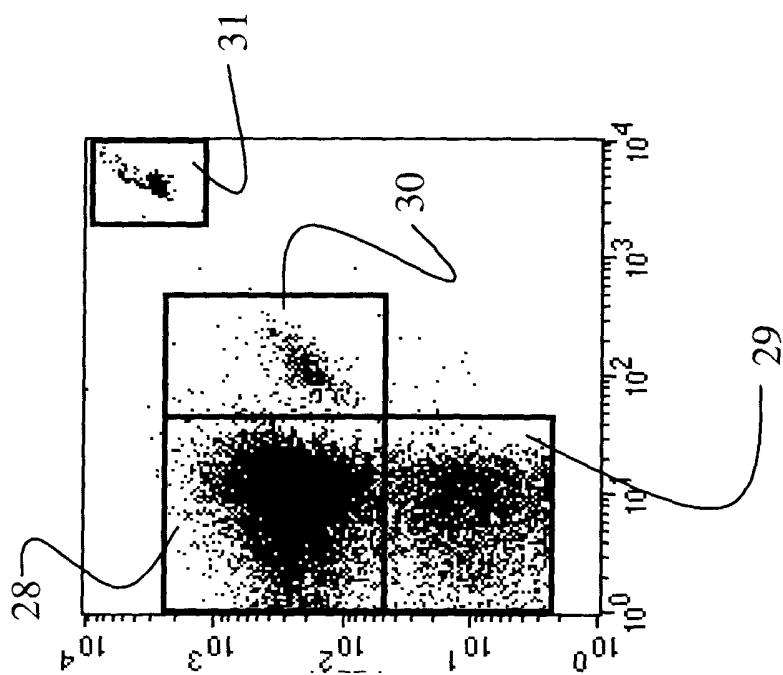


Fig. 5