

Matti Kotiranta

Listeria monocytogenes -bakteerin eristäminen maito- ja tilanäytteistä ja tunnistaminen PCR-menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

25.11.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Matti Kotiranta <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin eristäminen maito- ja tilanäytteistä ja niiden tunnistaminen PCR-menetelmällä 34 sivua + 2 liitettä 25.11.2015
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Kemiallinen ala
Ohjaaja(t)	FT Katri Juuti Tohtorikoulutettava Hanna Castro
<p>Tässä opinnäytetyössä eristettiin ja tunnistettiin <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteeria kolmelta eri näytetilalta saapuvista maito- ja suodatinnäytteistä sekä niiden ympäristönäytteistä. Kaikki näytteet esikäsiteltiin samalla tavalla, eristetyt kannat analysoitiin Multiplex PCR -menetelmällä, jossa käytettävä reaktioseos sisälsi sekä <i>Listeria</i>- että <i>L. monocytogenes</i> -spesifiset alukkeet. Monistetut näytteet tunnistettiin sitten agarosigeelielektroforeesi-menetelmällä.</p> <p>Näytteiden esikäsitely onnistui hyvin ja <i>Listeriaa</i> ja <i>L. monocytogenes</i> -lajia oli helppo eristää positiivisista näytteistä. <i>Listeria</i>-kantojen analyysi käytetyllä Multiplex PCR -menetelmällä onnistui hyvin. Agarosigeelielektroforeesi-ajossa näytteet erottuivat hyvin toisistaan, saadut tulokset näkyivät hyvin UV-valossa. Ympäristönäytteissä esikäsitelyssä oli pieniä ongelmia, kuten ulostenäytteiden liukeneminen Fraser-liemeen, mikä vaikeutti pipetointia, mutta muuten ympäristönäytteiden esikäsitelyssä ja DNA:n tutkimisessa PCR-menetelmällä ei ollut ongelmia.</p> <p>Ympäristönäytteistä saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että pääsääntöisesti <i>Listeriaa</i> ja <i>L. monocytogenes</i> -lajia esiintyy eläinten ulosteissa, mikä voidaan liittää eläimille tarjoihtuun huonolaatuiseen säilörehuun. Huono säilörehu voidaan myös yhdistää navettojen ruoka- ja juomakupeista kerättyihin positiivisiin näytteisiin. Tarkasteltaessa maito- ja suodatinnäytteiden <i>Listeria</i>-positiivisia tuloksia on helppo havaita kuinka, paljon suurempi määrä positiivisia tuloksia saatiin suodattimissa, mikä voi johtua suodattimiin kohdistuvasta maitomäärästä, koska kaikki maito kulkee niiden läpi tankkeihin.</p> <p>Myös utareissa mahdollisesti olevasta liika, jonka eläin on saanut ollessaan ulkona laitumella, saattaa vaikuttaa tuloksiin.</p>	
Avainsanat	<i>Listeria</i> -eristys, <i>L. monocytogenes</i> , Maito, Multiplex PCR

Author(s) Title	Matti Kotiranta Isolation of <i>Listeria monocytogenes</i> from milk and filter samples and identification with a PCR method
Number of Pages Date	34 pages + 2 appendices 25 November 2015
Degree	Bachelor of Laboratory sciences
Degree Programme	Laboratory sciences
Specialisation option	Advanced Chemical Analysis
Instructor(s)	Katri Juuti, PhD Hanna Castro, Doctoral student
<p>In this thesis, we extracted and identified <i>Listeria monocytogenes</i> –bacteria from milk and filter samples, along with environmental samples that arrived from three different farms. All samples were pretreated the same way and all isolated strains were analyzed with Multiplex PCR-method, in which the used reaction mixture included specified primers for both <i>Listeria</i> and <i>L. monocytogenes</i>. Multiplied samples were then identified with agarose gel electrophoresis method.</p> <p>Pretreatment of the samples succeeded well, and <i>Listeria</i> and <i>L. monocytogenes</i> were easily extracted from positive samples. Analysis of the <i>Listeria</i> -strains with used Multiplex PCR-method was successfully done. Samples separated well in agarose gel electrophoresis and results showed up well in UV-light. In the pretreatment of the environmental samples there were small problems, like dissolving of the fecal samples in Fraser broth that made pipetting the sample somewhat difficult, but otherwise there weren't any problems in pretreating environmental samples or in analyzing their DNA with PCR.</p> <p>From the results that were collected from environmental samples, it can be said that <i>Listeria</i> and <i>L. monocytogenes</i> can be mainly found in fecal samples. This points to poor quality of silage. Poor silage can be also linked to positive samples that were collected from barns' feeding tables and drinking cups. When studying the <i>Listeria</i> positive milk and filter samples, it was easy to notice that filters gave much bigger amount of positive samples. That can be easily explained with the amount of the milk that goes through the filters. It is also possible that the soil has stained the teat when the animal has been in the pasture, and that will then show up in the results.</p>	
Keywords	<i>Listeria</i> -isolation, <i>L. monocytogenes</i> , Milk, Multiplex PCR

Sisällys

1	Työn tarkoitus	1
2	Teoria	1
2.1	<i>Listeria</i>	1
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i> – morfologia ja biokemialliset ominaisuudet	3
2.3	Listerioosi	4
2.4	PCR	5
2.5	Agarosigeelielektroforeesi	9
3	Työn suoritus	11
3.1	Perehdytys	11
3.2	Elatusaineiden valmistaminen ja supplementin lisääminen	11
3.3	Näytteet ja niiden esikäsittely	11
3.4	Maitonäytteiden esirikastaminen, suoraviljely ja pakastus	13
3.5	Tilojen vesi-, ympäristö-, uloste-, rehu- ja turvenäytteiden esirikastaminen	13
3.6	Näytteiden rikastaminen	14
3.7	Näytteiden viljeleminen agar-maljoille	14
3.8	Pesäkkeiden tarkistaminen maljoilta	15
3.9	Puhdasviljely verimaljoille	16
3.10	Puhdasviljelmien siirto helmiputkiin ja pikatestit	16
3.11	Solulysaatio	18
3.12	PCR- ja elektroforeesigeelijaio	18
4	Tulokset ja tulosten tarkastelu	21
4.1	Tilojen <i>Listeria</i> -tulokset kaikista maito- ja suodatinnäytteistä	22
4.2	Näytetilojen ympäristönäytteet	25
4.3	Tilojen näytteiden tulokset erillisinä	27
5	Johtopäätökset	31
	Lähteet	33

Liitteet

Liite 1. AGARIT, SUPPLEMENTIT, AGAROOSIGEELI SEKÄ FICOLL-LIUOS

Liite 2. KAAVIO NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELYSTÄ

1 Työn tarkoitus

Opinnäytetyössä oli tarkoituksena eristää *L. monocytogenes* -lajin bakteeria maito- ja tilanäytteistä, sekä tunnistaa ja tutkia eristettyjä kantoja PCR- ja agaroosigeelielektroforeesi-menetelmillä. Lisäksi selvitettiin, missä päin maitotiloja *Listeriaa* esiintyy yleisesti ja vertailtiin maito- ja suodatinnäytteitä selvittäen, kummasta pystyttiin paremmin eristämään *L. monocytogenes*. Työ suoritettiin Multiplexing PCR -menetelmällä, jossa *Listeria*-suvulle ja *Listeria monocytogenes* -lajille spesifisiä alukkeita käytettiin kantojen tunnistamiseen.

Työ suoritettiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan, Elintarvikehygienian ja Ympäristöterveyden osaston toimipisteen tiloissa. Osastolla tehtävä tutkimus on arvioitu kansainvälisesti korkeatasoiseksi. Vuosina 2008 - 2013 osastolla toimi yhdessä eläinlääketieteellisten biotieteiden osaston kanssa Suomen Akatemian nimittämä mikrobiologisen elintarviketurvallisuuden tutkimuksen huippuyksikkö.

Osasto tutkii ja opettaa elintarvikehygieniaa, ympäristöhygieniaa, lihantarkastusta ja teurastamohygieniaa, toksilogiaa, elintarvike- ja ympäristövirologiaa sekä ympäristöterveydenhuollon valvontaa.

Työ suoritettiin opinnäytetyön lisäksi osana Hanna Castron väitöskirjaa, johon kuului 2 vuoden tilatutkimus, mihin tämän työn PCR:n antamat tulokset tulivat osana mukaan. Työ suoritettiin Multiplexing PCR-menetelmällä, jota käytettiin *Listeria* ja *L. monocytogenes* -lajin DNA:n monistamiseen ja tunnistamiseen.

2 Työn teoria

2.1 *Listeria*

Listeria on bakteerien suku, johon tällä hetkellä kuuluu 10 eri lajia, joista kahden, *Listeria monocytogenes* ja *Listeria ivanoviin*, tiedetään olevan ihmisille ja eläimille tauteja aiheuttavia patogeenejä. *L. ivanovii* -laji tavataan pääsääntöisesti märehitijöissä, se tartuttaa ihmisen hyvin harvoin ja yleensä vasta sopivan tilaisuuden sattuessa. Useimmissa

sairastumistapauksissa tartuttava bakteeri on *L. monocytogenes* -laji, jota tämä raportti käsittelee.

Ensimmäinen dokumentoitu *Listeria*-tapaus todettiin vuonna 1924. Myöhään 1920-luvun keskivaiheilla, kaksi tutkijaa itsenäisesti tunnistivat *L. monocytogenes* -lajin eläinten sairastumistapauksista. He ehdottivat lajille nimeksi *Listerella* englantilaisen kirurgin ja varhaisen aseptisen työskentelyn puolestapuhujan, Joseph Listerin mukaan, mutta nimi oli jo käytössä koskien limasieniä ja alkueläimiä. Lopulta suvun nimeksi ehdotettiin *Listeria* ja se hyväksyttiin suvun nykyiseksi viralliseksi nimeksi vuonna 1940. [1.]

Kaikki *Listeria*-suvun bakteerit ovat pieniä grampositiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia, ei-itiöitä muodostavia, sauvanmuotoisia, joskus lyhyitä ketjuja muodostavia bakteereja. Näyttemateriaalista suoraan levitettyssä mikroskooppinäytteessä ne voivat näkyä kokkeina, joten ne voidaan näin sekoittaa streptokokkeihin. Vuonna 2004 *Listeria*-suku sijoitettiin juuri luotuun Listeriaceae-heimoon, jonka ainoa toinen suku on *Brochothrix*. Ne muodostavat flagelloja huoneenlämmössä, mutta eivät +37°C.

Listeriaa voidaan löytää maaperästä, mikä voi aiheuttaa vihannesten kontaminoitumista, ja myös eläimet voivat olla niiden kantajia. *Listeriaa* on löydetty raa'asta lihasta, keittämättömistä vihanneksista, hedelmistä, kuten verkkomeloneista ja omenoista, pastöroidusta ja pastöroimattomasta maidosta, sekä maidosta valmistetuista tuotteista, kuten juustoista ja myös valmisruoista. *Listeriaa* on myös löydetty meijerien ympäristöstä monista eri paikoista, bakteeri voi myös selviytyä meijereillä pitkään. H. Unnerstand esimerkiksi havaitsi tietyn *L. monocytogenes* -tyypin selviytyvän samassa meijerissä seitsemän vuoden ajan. [1; 5.]

Pastöroiminen ja tarpeeksi hyvä ruoan kypsentyminen tuhoavat *Listerian*, mutta kontaminaatio voi tapahtua ruoan kypsennyksen ja pakkaamisen välillä. Esimerkiksi lihanjalostustehtaat, jotka valmistavat valmisruokia, kuten esimerkiksi, makkaraa tai Hot Dogeja, on noudatettavaa laajaa ja kansainvälistä puhtaanapitosuosituksia ja menettelyjä *Listeria*-kontaminaatioiden estämiseksi. *Listeria* on vastuussa listerioosista, harvinaisesta, mutta potentiaalisesti tappavasta ruokamyrkytyksestä (Katso 2.3). [1.]

2.2 *Listeria monocytogenes* – morfologia ja biokemialliset ominaisuudet

L. monocytogenes -bakteeri on pieni, kokin tai sauvanmuotoinen, fakultatiivisesti anaerobinen, katalaasi-negatiivinen ja oksidaasi-positiivinen organismi, joka pystyy liikkumaan ”pyörimällä” huoneenlämmössä, mutta ei +37 °C:ssa (ihmiskehon sisälämpötila). Se fermentoi glukoosia tuottaen pääasiassa L(+)-maitohappoa ja muista sokereista se muodostaa pääasiassa happoja, mutta ei kaasuja. Se hydrolysoi eskuliineja ja suoloja, mutta ei gelatiinia, kaseiinia tai maitoa.

Se luetaan usein koryneformisiin bakteereihin solumuotonsa takia. Se muodostaa hopeanharmaita, kiiltäviä pesäkkeitä selektiiviselle LMBA-agarille. Se on ainoa *Listeria* -suvun bakteeri joka, muodostaa β -hemolyysin hevosen- tai lehmänveri-agareille, mitä pidetään yleisesti sen tuntomerkinä ja mikä helpottaa sen erottamista muista mahdollisista lajeista. [2.]

2.2.1 Yleistä tietoa ja esiintyminen tiloilla

Listeria monocytogenes on toinen tunnetuista *Listeria*-suvun patogeeneista ja suvun yleisin taudinaiheuttaja ihmisissä ja tasalämpöisissä eläimissä. Bakteeri on ongelmallinen, koska se pystyy lisääntymään myös jääkaappilämpötilassa ja koska se on erityisen vaarallinen raskaana oleville naisille (varsinkin sikiölle) ja muille, joiden puolustuskyky on heikentynyt. Usein *L. monocytogenes* kontaminoi maito- ja meijerituotteita ja sen esiintyvyys raaka-maidossa on vaihdellut 1 - 45 %:n välillä.

Monia *Listeria*-lajeja on löydetty ja tunnistettu raakamaidosta, mutta lajien esiintyvyys vaihtelee kausittain ja konsentraatio raaka-maidossa on usein <1 pmy/ml. Tämän lisäksi lämpökäsittely vähentää merkittävästi *L. monocytogenes* -lajin konsentraatiota, joten pastöroitu maito ei aiheuta merkittävää terveysriskiä. Tästä voidaan todeta, että *L. monocytogenes* -lajin esiintyvyys meijerituotteissa on pääsääntöisesti lähtöisin raakamaidon epäsuorasta kontaminoitumisesta. Lisäksi raakamaitoa pidetään mahdollisena lähteenä laitospollutumiselle, joka voi vaikuttaa koko tuotekehittämiseen ja tuottoon. [2; 3.]

Meijeritiloilla raaka-maito voi kontaminoitua ulosteista johtuen, ja tämä on todettu kahdessa eri tutkimuksessa vuosina 1986 (Fenlon, D. R.) ja 1988 (Skovaard, N., ja C. A. Morgen), joissa tutkittiin *L. monocytogenes* -lajin läsnäoloa ja yhteyttä huonon säilörehun

ja ulosteiden välillä. Maito voi myös kontaminoitua epäpuhtaista utareista, nänneistä, käsistä ja välineistä. [3.]

2.3 Listerioosi

Listerioosi on *L. monocytogenes* -bakteerin, mutta myös harvinaisemmin *L. ivanoviin* -bakteerin, aiheuttama tulehdussairaus, joka voi aiheuttaa verenmyrkytyksen tai aivokalvontulehduksen, mutta pääsääntöisesti *L. monocytogenes* aiheuttaa normaalin vatsataudin pilaantuneen ruoan syömisestä. Bakteeria on kuitenkin syötävä suuri määrä ennen kuin se aiheuttaa tauteja ja silloinkin terve ihminen kokee taudin influenssa oireina.

Tartunnan saa yleensä elintarvikkeista, mutta tauti voi myös olla zoonoosi, eli tauti voi tarttua myös ihmiseen suoraan eläimestä, mutta tämän tapahtuminen on erittäin harvinaista. *Listeria*-bakteeri on yleinen ympäristössä, erityisesti kasvukunnassa. Sitä esiintyy myös maaperässä ja myös ihmisten ja eläinten (5 %) suolistossa. Bakteeri on yleinen elintarvikkeissa, mutta listerioosi on tautina harvinaisen. [2; 3; 4; 7.]

Listeria tarttuu suun kautta ruosta tai juomasta, mutta taudin puhkeamiseen tarvitaan suuri määrä bakteeria. *Listeria* on yleisesti löydetty pieniä määriä pastöroimattomissa meijerituotteissa, sekä esimerkiksi kypsentämättömästä tyhjiöpakatusta kalasta. Bakteeri voi lisääntyä jääkappilämpötiloissa ja säilyä vuosia kontaminoituneessa elintarvikkeessa, kuten hillossa. [4; 7; 10.]

Yleisesti paljon *Listeria*-bakteeria sisältävän ruoan syöminen aiheuttaa normaalin ruokamyrkytyksen, mitä ei yleensä havaita *Listeria*n aiheuttamaksi, ellei kyseessä ole suuremman ihmisryhmän sairastuminen, epidemia, eikä ruoista oteta viljelynäytteitä. Keskimäärin taudin oireet alkavat vuorokauden saastuneen ruoan tai juoman nauttimisesta. Tällöin tauti yleensä kestää terveellä ihmisellä vain vähän aikaa, ja oireet väistyvät yleensä muutamassa päivässä ilman antibioottihoitoakin. [7; 8; 10.]

Riskiryhminä listerioosille ovat raskaana olevat naiset, vastasyntyneet lapset, jotka voivat saada taudin äidiltään istukan kautta, vanhukset, sekä ihmiset joiden, vastustuskyky on heikentynyt pitkäaikaisen sairastamisen tai hoidon johdosta, kuten AIDS-potilaat. Lisäksi pitkäaikaiset alkoholistit ovat vaarassa. Riskiryhmillä listeriaverenmyrkytyksen saaneiden kuolemisprosentti vaihtelee 20 - 60 % välillä. Tauti voi välillä tuoda mukanaan

muita tauteja, kuten keuhkokuumeen, endokardiitin (sydämen sisäkalvon tulehdus) virtsaputkentulehduksen ja aiheuttaa abortteja, mikä nostaa näin taudin tappavuutta riskiryhmillä. Terveellä aikuisella ja lapsella tauti ei yleensä ole kovin vaarallinen vaan aiheuttaa yleensä influenssan kaltaisia oireita tai sitten oireita ei ole ollenkaan. [2; 3; 7; 8; 10.]

Kaikki tasalämpöiset eläimet voivat sairastua listerioosiin, märehtijöillä yleisin tartuntalähde on huonolaatuinen säilöntärehu, eli tauti on yleensä oireeton. Tavallisin tautimuoto on aivomuotoinen listerioosi, eli aivotulehdus, jonka oireina ovat väsymys, kehän kiertäminen ja pään kääntyily toiselle sivulle. Tavallisesti siinä esiintyy hermohalvauksesta johtuvaa kuolaamista ja korvien tai silmäluomen roikkumista. Tauti yleensä tappaa eläimen kahdessa tai kolmessa päivässä. Toisinaan *Listeria* voi aiheuttaa myös silmän sarveiskalvon ja värikalvon tulehduksen, lehmille utaretulehduksen sekä kohtutulehduksen, mikä on pääsääntöisesti vastuussa listerioosin aiheuttamista eläinaborteista ja vasikoiden verenmyrkytyksistä. [3; 4; 6: 9.]

2.4 PCR

PCR-menetelmä on DNA:n monistusmenetelmä ja laboratorioden geenimonistuksen perusmenetelmä. Sen on kehittänyt ja kuvannut Kary Mullis työryhmineen vuonna 1986 (Mullis ym.1986). Sen kehittämistä hän sai Nobelin kemian palkinnon vuonna 1993. [11.]

Se, miten DNA monistuu näyteputkessa/kuopassa PCR-menetelmällä, tapahtuu samalla periaatteella, jonka avulla DNA kahdentuu solussa. PCR-reaktiossa kaksijuosteisen DNA:n rakenne suoristetaan, ja täten avataan, lämmön avulla, eli denaturoidaan. Solun sisällä tämä tapahtuu helikaasientsyymien avulla ja avautuneen DNA:n mallijuosteen rinnalle kootaan toinen juoste käyttäen polymeeraasia käyttäen rakennuspalikkoina vapaita nukleotidejä. Menetelmässä käytetään siis samoja peruselementtejä kuin elävässä solussa. [11; 12.]

Ei ole olemassa yleispätevää PCR-reaktio-ohjetta, vaan yleensä jokaisen PCR-reaktion olot pitää optimoida erikseen, riippuen reaktiossa käytettävästä entsyymistä, jotta sille

saadaan optimaaliset olosuhteet. Nykyään PCR-reaktiossa käytettäviä entsyymejä on useita, joten optimointi on tärkeää.

PCR -reaktiossa käytettävät komponentit ovat DNA-polymeraasi, templaatti-DNA, alukkeet eli primerit, nukleotidit sekä työssä käytettävä puskuri. DNA-polymeraasi on lämmönkestävä, eli termostabiili entsyymi, joka on eristetty kuumissa lähteissä elävistä bakteereista.

Niistä tunnetuin on *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty Taq DNA -polymeraasi, mutta sen virhefrekvenssi on korkea. Vähemmän virheitä tekevillä DNA -polymeraaseilla on niin sanotut oikolukuaktiivisuudet, n esimerkiksi Pfu- ja Vent-polymeraasit.

Polymeraasit ovat herkkiä Mg^{2+} -konsentraation vaihteluille ja niiden optimilämpötila on $+72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ne liittävät reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukseen $3'$ -päästä lähtien templaattiin. Templaatti-DNA on 2 -juosteinen DNA, joka on monistusreaktion kohde.

Tyypillinen monistuskerroin sille on 10^6 , eli yhtä templaattimolekyyliä kohti syntyy miljoona tuotemolekyyliä. Alukkeet eli primerit ovat 1-juosteisia nukleotidiketjuja, pituudeltaan noin 10 - 40 nukleotidin välillä.

Yhteen PCR-reaktioon tarvitaan 2 aluketta, jotka sitoutuvat 2-juosteisen DNA:n eri juosteisiin ja hybridisoituvat niille komplementaariseen kohtaan, niin sanotun annealing-reaktion aikana. Alukkeiden suunnittelussa on otettava huomioon, että niiden pitää olla mahdollisimman komplementaarisia templaatille eikä niiden sisällä saa olla niille itselleen komplementaarisia kohtia, jotka muodostaisivat hiusneularakenteita, eivätkä ne saa sitoutua keskenään.

Alukkeiden sulamislämpötilan eli lämpötilan, jossa puolet alukkeesta on kiinnittynyt templaattiin ja puolet on irrallaan liuoksessa, laskeminen tehdään Wallacen ”nyrkkisäänön” mukaan, molemmilla alukkeilla mieluiten samantapainen sulamislämpötila ja annealing-lämpötila on karkeasti ottaen $T_m - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

PCR-reaktiossa tarvitaan kaikkia 4 nukleotidia: dATP, dTTP, dCTP ja dGTP ja niitä on yleensä aineellisesti yhtä paljon reaktiossa. Työssä käytettävä puskuri on optimoitu

työssä käytettävälle DNA-polymeraasille, se on yleensä 10 x konsentroidu varastoliuos, joka käytettäessä laimennetaan 1/10.

Tärkeimpiä tekijöitä oikeanlaiselle puskurille ovat oikeanlainen pH ja suolapitoisuus sekä oikeanlainen MgCl₂-pitoisuus.

PCR-reaktio koostuu neljästä eri vaiheesta: Ensimmäinen vaihe on DNA-juosteiden erottus, eli denaturaatio, jossa DNA menettää kaksijuosteisen rakenteensa ja suoristuu. Tämä tehdään +94 °C - +96 °C: välillä 30 - 60 sekunnin ajan. Toinen vaihe on Annealing-reaktio, eli alukkeiden sitoutuminen, joka tehdään 45 °C - 65 °C:een välillä 30 - 60 sekunnin ajan. Kolmas vaihe on pidennysreaktio, eli DNA-synteesi, jossa DNA-polymeraasi valmistaa uutta DNA:ta mallijuosteen mukaan, +72 asteessa ja siihen käytettävä aika vaihtelee riippuen monistettavan alueen pituudesta ja käytetystä entsyymistä. Näitä vaiheita toistetaan sykleissä niin kauan, kunnes DNA on varmasti monistunut. Sykliin määrä vaihtelee 15 - 40 syklin välillä.

Tämän jälkeen suoritetaan niin sanottu "varmistava" pidennysreaktio, jolla varmistetaan että muodostuneet juosteet ovat niin pitkiä kuin halutaan. Se tehdään +72 asteessa 10 minuutin ajan. Sykliin jälkeen monistuneet DNA:t voidaan jättää laitteeseen +4 °C:een säilymään, kunnes niitä tarvitaan jatkotutkimuksia varten.

PCR on erittäin altis kontaminaatioille, joka tässä tapauksessa tarkoittaa pientä määrää DNA:ta, joka ei ole peräisin itse monistettavasta näytteestä. Tämä on erittäin tärkeää ottaa huomioon, jos templaattia on vähän ja sitä voi estää varaamalla oman puhdistilan PCR-reaktioiden valmistukseen.

Muita varotoimia ovat, että tarvittavat pipetoinnit tehdään laminaarikaapissa, käytetään steriilejä pipetinkärkiä, varaamalla PCR:ää varten omat automaattipipetit sekä reagenssit ja käyttämällä hanskoja. [12.]

2.4.1 Multiplex-PCR-menetelmä

Multiplex PCR on laajalle levinnyt molekulaarisen biologian tekniikka, jota käytetään usean DNA:n monistamiseen yhden PCR-ajon aikana. Menetelmässä monistumisreaktio kohdistuu useampaan kuin yhteen DNA-sekvenssiin, mikä johtuu ajoliuokseen lisä-

tyistä useamman alukeparin seoksesta. Kun se on normaali PCR-menetelmän laajennos, tällä menetelmällä on hyvät mahdollisuudet säästää aikaa laboratoriotyöskentelyssä, vaikuttamatta PCR:n yleiseen käyttökelpoisuuteen.

Menetelmässä on hyödyllisiä kohtia verrattuna normaaliin PCR:ään:

- Sisäiset ongelmat: Paljastavat usein mahdolliset väärät negatiiviset tulokset ajosta, koska jokainen monistettu DNA toimii sisäisenä kontrollina muille monistetuille fragmenteille menetelmässä.
- Tehokkuus: Säästää aikaa ja käytettyjä reagensseja verrattuna systeemeihin, joissa käytetään useita putkia reaktioluosta. Säästää kalliin polymeraasin ja templaattien kulumista.
- Templaattien laadun tunnistaminen: Käytetyn templaatin laatu saadaan paremmin tunnistettua verrattuna normaaliin PCR-menetelmään.
- Templaatin määrän laskemiseen: Multiplex PCR -menetelmän sisäisiä standardeja, sekä sen eksponentiaalista DNA:n monistamista voidaan käyttää päättelemään tietyn templaatin määrä näytteestä.

Alla on merkitty esimerkkejä siitä minkälaisiin töihin ja analyysihin multiplex PCR:aa voi käyttää:

- patogeenien tunnistaminen
- mutaatioiden tutkiminen
- RNA detektointi
- sidokset tutkimukset.



Kuva 1. PCR-laite suorittamassa ajoa *Listeria*-ohjelmalla.

2.5 Agarosigeelielektroforeesi

Agaroosi on polysakkaridi, mitä saadaan merilevästä, joka liukenee kiehuvaan veteen ja jähmettyy, kun sen lämpötila laskee alle +50 °C. Geelin valmistaminen tapahtuu sekoittamalla tunnettu määrä agarosijauhetta veteen, lisäämällä siihen tunnettu määrä käytettävää geelipuskuria ja kiehauttamalla seosta mikrossa, kunnes agarooosi on kokonaan sulanut. Saatu agarosigeeli on huokoista, verkkoimaista materiaalia, jossa nukleiinihapot ja saatu lineaarinen DNA pystyvät ja pääsevät liikkumaan. [11; 12.]

Se on siis siivilä, jonka avulla DNA pystyy liikkumaan kokonsa perusteella. Kuvassa 2 kerrotaan sopivasta agarosin määrästä koskien DNA:n kokoa:

0,5	1 - 30 kb
0,7	0,8 - 12
1,0	0,5 - 10
1,2	0,4 - 7
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

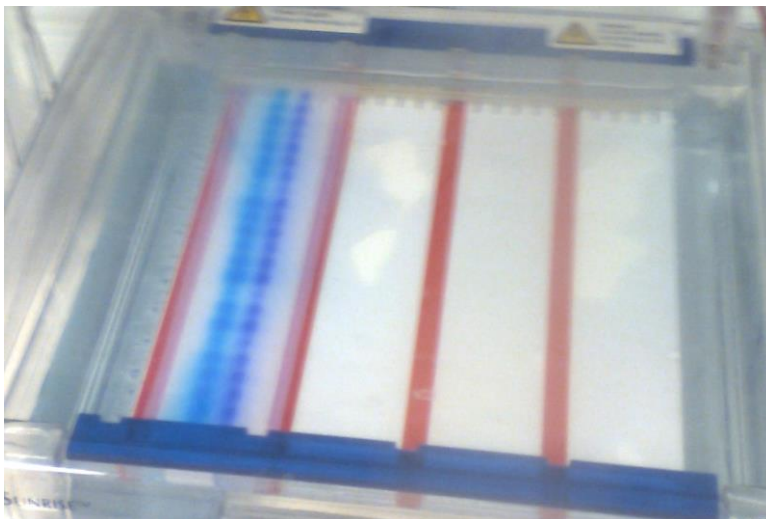
Kuva 2. Agarosin (paino%) suhde lineaarisen DNA-jakson kokoon (kb)

DNA:n liikkuminen geelillä perustuu siihen, että nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneita, jolloin ne kulkeutuvat sähkökentässä positiivista napaa kohti. DNA:n kulkeutuminen geelissä on sitä hitaampaa, mitä suurempi kyseinen molekyyli on. Lisäksi geelin vahvuus, eli se kuinka huokoista geeli on, vaikuttaa myös ajautumisen nopeuteen. Jos geelille laitetaan ajoon kaksi samanmuotoista ja kokoista näytettä, se jolla on suurempi kokonaisvaraus, liikkuu geelillä nopeammin. Näin saadaan erotettua erikokoiset DNA:t ja niille ominainen vyöhyke eli bändi, joita työssä tarkasteltiin. [11.]

Ajettavaa DNA-näytettä verrataan tunnettuun DNA-kokostandardiin ja saadut tulokset arvioidaan yleensä silmämääräisesti, mutta tarkempaa kokoanalyysia varten tehdään standardisuora log (kb) versus kuljettu matka (mm) tai nykyaikana käytetään tietokonetta tarkan analyysin tekemiseen. [12.]

Agarosegeeliin lisätään valmistumisvaiheessa etidiumbromidia (EtBr), joka sitoutuu DNA:han ja tekee sen näkyväksi geelillä, kun sitä tarkastellaan ultraviolettivalolla (UV). Etidiumbromidi on karsinogeeni, joka voi aiheuttaa syöpää, ja sitä pitää käsitellä erittäin varovasti, käyttäen suojahansikkaita ja vetokaappia, kun etidiumbromidi pipetoidaan ja sekoitetaan lämpimään agarosegeeliin juuri ennen valamista.

EtBr:ää sisältävät jätteet kerätään omiin astioihinsa ja hävitetään asianmukaisesti. Etidiumbromidilla värjätty DNA näkyy UV-valossa siitä syystä, että se absorboi ultraviolettivaloa. Tämä näkyy parhaiten aallonpituuksilla 254 - 260 nm. [11.]



Kuva 3. Agarosegeeli ja siinä olevien näytteiden liikkuminen sähkövirrassa.

3 Työn suoritus

3.1 Perehdytys

Työ tehtiin tohtorikoulutettava Hanna Castron ohjauksessa. Hän oli jo ennalta käsin testannut näytteiden esikäsitteilyn, reaktiivilavuuden ja elektroforeesiajon ajan ja löytänyt niille optimaaliset asetukset.

3.2 Elatusaineiden valmistaminen ja supplementin lisääminen

Näytteiden esirikastamista varten valmistettiin $\frac{1}{2}$ Fraser -lientä punnitsemalla 55 g Fraser-agaria (katso liite 1, kohta 1) ja liuotettiin se 900 ml puhdasta vettä ja autoklavoitiin 250 ml näytepulloissa.. Elatusainetta valmistettiin tarvittavat määrät sen mukaan, kuinka paljon näytteitä saapui viikon aikana. Autoklaavissa olleisiin liuoksiin lisättiin sitten 0,5 ml X564 suplemettia (katso liite 1 kohta 4), suosiaksemme *Listerian* sekä *L. monocytogenes* -lajin mikrobikasvua esirikastuksen aikana. Supplementti lisättiin vasta juuri ennen esirikastamisen suorittamista.

3.3 Näytteet ja niiden esikäsitteily

Työssä tutkittavia näytteitä ei pääsääntöisesti esikäsitelty, kuin siirtämällä ne välittömästi niille tarkoitettu kylmäsäilöön, jos niiden tutkimusta ei aloitettu heti niiden saapuessa. Ensisijainen esikäsitteily ei ollut tarpeen, koska näytteet käsiteltiin sellaisinaan, kun ne saapuivat tiloilta ja seuraavissa työvaiheissa on kuvailtu, kuinka ne esikäsiteltiin solulysaatiota ja PCR-ajoa varten.

Näytteinä työssä oli kolmelta eri tilalta tulleet maito- ja suodatinnäytteet sekä tilakäyntien aikana kerätyt ympäristönäytteet. Maito- ja suodatin-näytteet saapuivat tilalta 1 ja 3 pääsääntöisesti kerran viikossa kahden kuukauden työskentelyn aikana. Tilalta 2 maito- ja suodatinnäytteet pyrittiin hakemaan säännöllisesti kahden viikon välein.

Tilakäynti ja sieltä saatavien näytteiden noutaminen suoritettiin pääsääntöisesti kahden kuukauden välein, mutta kesäaikana käynnit tapahtuivat yhden kuukauden välein. Tiloilta tuli pääsääntöisesti sieni-, uloste, rehu-, turve- ja topsynäytteitä. Näytteet saapuivat seuraavissa muodoissa:

- ❖ Liukoinen keräystankista otettu raakamaito, joka saattoi sisältää siihen kuuluvaa rasvaa.
- ❖ Maitosuodatin, joka sijaitsee keräystankin ja pumppu-laitteiston välissä. Suodatinpaperia, joka saattoi olla märän lisäksi likainen, johtuen lehmien utareista mahdollisesti olevista liasta, rehusta ja oljista, jotka jäivät paperiin putkiston suodattimessa.
- ❖ Topsynäytteet, keltakorkkinen koeputki, joka sisälsi 10 ml BPW:tä (Buffered Peptone Water) ja siinä olevaan, vanupuikkoon, kerätyt näytteet. Näytteet olivat yleisesti kerätty nännikupeista ja maidon suodatinputkiston sisäpinnalta, mistä on sienellä vaikea kerätä näytteitä.
- ❖ Sieninäytteet, laboratoriotutkimukseen tarkoitettuja näytteenkeräys-sieniä, jotka oli kostutettu 5 ml BPW. Sienillä kerättiin lypsutilojen eri huoneiden, kuten maituhuoneiden, navettojen ja lypsyasemojen, pinnoilta näytteitä niin, että ne tarttuivat kunnolla kosteisiin sieniin.
- ❖ Rehu- ja turvenäytteet saapuivat kiinteinä, kuivina ja siinä muodossa, miten ne lehmien ruokintapöydällä ja makuupaikoissa olivat.
- ❖ Ulostenäytteet saapuivat yleensä siinä muodossa kuin ne kerättiin, pääsääntöisesti kiinteänä tavarana. Toisinaan näyte saattoi olla liukenevampaa.
- ❖ Vesinäytteet, jotka oli kerätty mahdollisimman puhtaasti, olivat näytteestä riippuen joko huuhteluvetenä käytettävää vettä tai sitten kerätty eläinten vesikupeista.

3.4 Maitonäytteiden esirikastaminen, suoraviljely ja pakastus

Litteenä 2 on taulukko näytteiden esikäsitelystä solulysaatioon.

Näytetiloilta tulleet maitonäytteet sekoitettiin aluksi hyvin, ja sitten ne esirikastettiin pipetoimalla 25 ml näytettä 25 ml:aan suplemtoitua ½ Fraser -lientä ja inkuboimalla ne sitten 24 tuntia +30 °C:ssa. Samoin tehtiin myös tiloilta tulleille suodatin-näytteille. Suodattimet siirrettiin ½ Fraser -liemiin mahdollisimman aseptisesti steriileillä pinseteillä ja inkuboitiin, kuten esirikastetut maitonäytteet. Pipetoitiin sitten 1 ml maitonäytteitä eppendorf-putkiin ja siirrettiin putket pakastimeen mahdollisia jatkotutkimuksia varten.

Näytetiloilta tulleet maitonäytteet suoraviljeltiin sitten neljälle ALOA-agarmaljalle niin, että maidon yhteistilavuudeksi tuli noin 1 ml. Kolmelle maljalle pipetoitiin steriileillä kärjillä 330 µl maitoa ja viimeiselle maljalle 100 µl maitoa. Pipetoidut määrät levitettiin sitten taiseksi agarin päälle steriileillä kolmiosauvoilla ja viljellyt maljat siirrettiin sitten inkuboitumaan +37 °C 48 tunniksi, koska bakteerit eivät muodosta flagelloja +37 °C:ssa ja näin niiden liikkuvuus vaikeutuu. Lisäksi pesäkkeet muodostuvat helpommin, kun inkubointilämpötila on ihmiskehon sisäisen lämpötilan mukainen.

3.5 Tilojen vesi-, ympäristö-, uloste-, rehu- ja turvenäytteiden esirikastaminen

Punnittiin 25 g tiloilta tulleita rehu-, uloste- ja turvenäytteitä Stomacher-pussiin ja lisättiin niihin hieman supplimoitua ½ Fraser -lientä näytepulloista ja tiivistettiin pussi hyvin. Homogenoitiin pusseissa olevat näytteet sitten Stomacher-laitteella 30 sekunnin ajan niin, että näytteet ja liemi sekoittuivat varmasti hyvin keskenään. Siirrettiin pusseissa oleva sekoittunut liemi sitten mahdollisimman hyvin takaisin loppuun ½ Fraser -liemeen niin, että mahdollisimman vähän kiinteää ainetta tuli liemen mukana näytepulloihin. Näytepullot vietiin sitten inkuboitumaan 24 tunniksi +30 °C:een.

Pipetoitiin koeputkiin 10 ml ½ Fraser -lientä ja supplimoitiin se lisäämällä niihin 44 µl supplementtia (katso liite 1, kohta 2). Siirrettiin sitten koeputkiin tiloilta otetut Topsy-näytteet, siirtämällä steriileillä pinseteillä vanupuikot, joihin näytteet oli kerätty, koeputkiin ja kaadettiin vielä puikkojen mukana ollut neste koeputkiin. Koeputket suut liekitettiin, mikä tehtiin myös isommille näytepulloille, ja ne vietiin sitten inkuboitumaan 24 tunniksi +30 °C.

Tiloilta otetuille vesinäytteille tehtiin samat asiat kuin tiloilta tulleille maitonäytteille eli ne sekoitettiin hyvin ja pipetoitiin niistä sitten 25 ml vesinäytettä 225 ml supplimoitua ½ Fraser -lientä, 250 ml näytepulloissa. Liekitettiin pullojen suut ja korkit Bunsen-liekillä, epäpuhtauksien minimoimiseksi, ja vietiin näytteet inkuboitumaan 24 tunniksi +30 °C.

Tiloilta otetut ympäristönäytteet kerättiin sienillä, jotka oli kostutettu BPW-liuoksella. Nämä sienet siirrettiin sitten, steriileillä pinseteillä kokonaisina näytepulloihin, joissa oli 225 ml supplimoitua ½ Fraser -lientä, jotka vietiin sitten liekityksen jälkeen inkuboitumaan 24 tunniksi +30 °C.

3.6 Näytteiden rikastaminen

Esirikastamisen jälkeen aloitettiin näytteiden rikastaminen. Työ aloitettiin pipetoimalla aluksi 10 ml koko-Fraser-lientä koeputkiin ja suplimoitiin ne lisäämällä niihin 40 µl supplementtia (katso liite 1, kohta 3). Tämän jälkeen lisättiin niihin 100 µl hyvin sekoitetussa ½ Fraser -liemessä olleita näytteitä, vorteksoitiin ja liekitettiin putkien suut ja korkit ja vietiin näytteet inkuboitumaan 48 tunniksi +37 °C.

3.7 Näytteiden viljeleminen agar-maljoille

(Linkit selektiivisten alustoiden kuvauksiin on esitetty liitteessä 1.)

Näytteet viljeltiin *Listeria*-selektiivisille agar-maljoille 2 kertaa. Selektiivisten alustoiden ensimmäinen viljely tehtiin esirikasteesta samalla, kun näytteet siirrettiin rikastumaan koko Fraser-liemiin. Sekoitettiin aluksi esirikaste (½ Fraser) hyvin ja viljeltiin siitä sitten 10 µl:n silmukalla näytteet hajoitusviljelyinä selektiivisille kasvuagareille seuraavasti:

1) Elintarvike-, topsy-, vesi- ja ympäristönäytteet ALOA- ja LMBA-agarmaljoille.

2) Uloste-, turve- ja rehunäytteet LMBA- ja PALCAM - agarmaljoille

Maljat merkittiin asianmukaisesti, jonka jälkeen ne vietiin inkuboitumaan 48 tunniksi +37 °C. Seuraava maljaviljely tehtiin varsinaisesta rikasteesta, eli koko-Fraser -liemestä. Rikaste sekoitettiin hyvin ja sitten siitä viljeltiin näytteet hajoitusviljelynä *Listeria*-selektiivisille-agarmaljoille, aivan kuten tehtiin esirikasteesta otetuille näytteille.

1) Elintarvike-, topsy-, vesi- ja ympäristönäytteet ALOA- ja LMBA-agarmaljoille.

2) Uloste-, turve- ja rehunäytteet LMBA- ja PALCAM - agarmaljoille.

Maljoille tehtiin samanlainen inkubointi, kuin esirikasteesta otetuille maljanäytteille, eli maljat inkuboituihin 48 tuntia +37 °C.

3.8 Pesäkkeiden tarkistaminen maljoilta

Maljat voitiin tarkastaa jo 24 tunnin inkuboinnin jälkeen, jolloin osa kannoista oli jo tunnistettavissa, varsinkin LMBA-agareilla, mutta parhaimmat tulokset saatiin 48 tunnin inkuboinnilla.

ALOA (katso liite 1, kohta 5)

ALOA-agarilla *Listeria monocytogenes* -kanta muodostaa 48 tunnin inkuboinnin jälkeen suurehkoja, 3 mm kokoisia sinivihreitä pesäkkeitä, joiden ympärille muodostui, toisinaan melko laaja, vaalea sameutumisyöhyke (kehä), mikä ei vielä näkynyt 24 tunnin inkuboinnin jälkeen tai sitten se oli hyvin heikko. Muilta listerialajeilta, paitsi *L. ivanovii* -lajilta, vaalea sameutumiskehä puuttui.

LMBA (katso liite 1, kohta 8)

LMBA-agarille *L. monocytogenes* muodostaa pieniä, vaaleita pesäkkeitä, joiden ympärille kehittyi kirkas ja kapea β -hemolyysivyöhyke, mikä saattoi olla toisinaan rajoittunut pesäkkeen alle. Pesäkkeet olivat toisinaan jo tunnistettavissa 24 tunnin inkuboinnin jälkeen, mutta parempi tulos saatiin, kun pesäkkeiden ja hemolyysivyöhykkeen annettiin kasvaa inkuboinnissa toiset 24 tuntia. Muut lajit, paitsi *L. ivanovii*, eivät muodosta hemolyysia ja *ivanovii*-lajin kohdalla pesäkkeitä ympäröi erittäin laaja vyöhyke.

PALCAM (katso liite 1, kohta 11)

Listeria-selektiiviselle PALCAM-agarille *Listeria* muodostaa pieniä, halkaisijoiltaan 1,5 - 2,0 mm:n kokoisia, vihreänharmaita pesäkkeitä, joiden ympärille kehittyi musta vyöhyke. Toisinaan joillekin pesäkkeille, kuten esimerkiksi halutulle *L. monocytogenes* -lajille, pesäkkeiden keskusta kehittyi mustaksi alueeksi.

3.9 Puhdasviljely verimaljoille

Selektiivisen maljaviljelyn perusteella selvistä *L. monocytogenes* -lajin kannoista tehtiin kaksi puhdasviljelyä steriileille (lehmän)verimaljoille hajoitusviljelyinä, jotka inkuboitiin sitten 24 tuntia +37 °C:ssa. Puhdasviljely tehtiin myös selektiivisillä maljoilla oleville kannoille, jotka olomuodoiltaan vaikuttivat olevan listeriaa, vaikka eivät mahdollisesti olleetkaan etsittyä *L. monocytogenes* -lajia. Tämä tehtiin, koska haluttiin myös vertaillun vuoksi muita *Listeria*-lajeja mukaan tutkimuksiin ja pyrittiin myös selvittämään, kuinka paljon tiloilla on kokonaisuudessaan *Listeriaa*.

Ne selektiiviset agar-maljat, joiden kannoista puhdasviljelystä tehtiin, pussitettiin ja merkittiin joko saapumisviikkonsa mukaan (maito- ja suodatinnäytteet) tai sitten tilakäyntinumeronsa mukaan (ympäristö-, turve-, rehu-, uloste-, topsy-, ja vesinäytteet) ja ne siirrettiin näytekyelmiöön säilöön, puhdasviljelyn kontaminoitumisen sekä mahdollisten virheiden varalta.

3.10 Puhdasviljelmien siirto helmiputkiin ja pikatestit

Toinen selvistä *L. monocytogenes* -kannan puhdasviljelmistä, jotka tehtiin aikaisemmin selektiivisen maljaviljelyn perusteella, siirrettiin mahdollisimman aseptisesti silmukalla helmiputkiin, jotta puhdas kanta olisi helppo viljellä veriagareille jatkotutkimuksia varten. Helmiputkien korkit ja suut liekitettiin kontaminaation minimoimiseksi ja sekoitettiin hyvin, jotta kanta varmasti tarttuisi putkissa oleviin helmiin.

Tämän jälkeen poistettiin laminaarikaapissa helmiputkissa oleva neste pipetoimalla se mahdollisimman aseptisesti ja hyvin pois putkista, minkä jälkeen putkien suut liekitettiin. Putket säilytettiin jäähauteissa työsuuksien välillä ja ne merkittiin lopuksi asianmukaisin merkinnöin ja vietiin pakastimeen säilöön, odottamaan jatkotutkimuksia.



Kuva 4. Puhdas *L. monocytogenes* -kanta verimaljalla.

Ne epäselvät, mutta mahdolliset *Listeria*-kannat, joista tehtiin puhtasviljelmät, tarkastettiin ensiksi ulkonäön perusteella: näyttikö mikään niistä mahdollisesti selvältä *L. monocytogenes* -lajin edustajalta. Niistä kannoista, jotka osoittivat selviä merkkejä, eli β -hemolyysin muodostamista, tehtiin uusi yhden pesäkkeen puhtasviljely verimaljalle hajotusviljelynä helmiputkisiirtoa varten. Loppuviljelämä näistä maljoista vietiin solulysaatioon.

Niille kannoille, joista ei ulkonäön perusteella pystytty sanomaan, olivatko ne *Listeriaa* tai etsittyä *L. monocytogenes* -lajia, tehtiin pikatestit. Pikatesteistä saatujen tulosten perusteella oikeanlaiset kannat siirrettiin jatkokäsiteltäväksi solulysaatioon ja loput vietiin autoklaaviin hävitettäväksi.

Katalaasi-pikatesti

Katalaasitesti suoritettiin tiputtamalla objektilasille 1 tippa 3 %:sta vetyperoksi-vesiliuosta ja siirrettiin tarkastettavasta kannasta 10 μ l silmukalla 1 pesäke liuokseen. Tämän jälkeen tarkasteltiin, vapautuiko reaktion seurauksena happea eli muodostuiko lasille ja käytettyyn silmukkaan kuplia. Jos kuplia muodostui, se oli merkki siitä, että katalaasia oli läsnä bakteerikannassa, eli tulos oli silloin positiivinen.

Oksidaasi-pikatesti

Oksidaasitesti suoritettiin niin sanotun Kovacsin menetelmän mukaisesti käyttäen kaupallista reagenssiliuosta. Tiputettiin testipaperille pisara reagenssiliuosta ja siirrettiin siihen silmukalla hieman tutkittavan kannan bakteerimassaa. Positiivisessa oksidaasireaktiossa massa värjäytyi 30 sekunnin kuluttua tumman sinipunaiseksi (näytti tumman liialta).

L. monocytogenes -lajin ja muiden *Listeria*-lajien bakteerit ovat katalaasiposiitivisia ja oksidaasinegatiivisia. Eli ne epävarmat kannat, jotka eivät olleet selviä *L. monocytogenes* -lajin edustajia ja olivat pikatestien perusteella katalaasiposiitivisia ja oksidaasinegatiivisia säilytettiin ja vietiin solulysaatioon PCR-tutkimuksia varten.

3.11 Solulysaatio

Kerättiin bakteerimassa solulysaatiota varten tehdyiltä puhtasviljelmiltä sekä tarkastetuilta maljoilta ja suspensoitiin ne 100 µl:aan steriillää vettä eppendorf-putkissa.

Eppendorf-putket siirrettiin sitten lämpöhauteelle, joka oli esilämmitetty +97 °C:een ja inkubointiin 10 minuutin ajan, solujen hajottamiseksi. Tämän jälkeen siirrettiin lämpimät putket sentrifugiin ja annettiin niiden pyöriä 13 200 rpm vauhdilla 2 minuutin ajan. Putket siirrettiin tämän jälkeen sellaisenaan pakkaseen odottamaan PCR-ajoa, jolloin saatua solulysaattia pipetoidaan reaktioon putken pintaosasta.

3.12 PCR- ja elektroforeesigeelijaio

PCR-ajo solulysoiduille näytteille tehtiin useimmissa ajoissa 20 näytteelle. Otettiin 20 kpl näytteitä sekä 1 kappale selvää *L. monocytogenes* -kantaa, joka oli solulysoitu positiiviseksi kontrollinäytteeksi, pakkasesta ja vietiin ne kylmäsäilytykseen odottamaan ajoa.

Siirryttiin sitten ns. puhtaaseen tilaan, missä valmistettiin PCR:n "Master-Mix" reaktioseos. Puhtaassa tilassa työskenneltiin, jotta ajoliuokseen käytettävät nukleotidit, alukkeet ja polymeeraasit eivät olisi kontaminoituneet.

Reaktioseos valmistettiin pipetoimalla laminaarikaapissa 2 ml eppendorf-putkeen ensiksi steriiliä, PCR-ajoon tarkoitettua vettä (920 µl), sitten pakkasesta otetut, sulatetut ja nopeasti sentrifugoidut, 10_x-puskuri (115 µl), 4dNTP 10mM nukleotidi (23 µl), *Listeria*-spesifiset L- (2kpl) ja LM (2 kpl) alukkeet (molempia 23 µl) jotta näytteet, joissa oli *Listeria* ja *L. monocytogenes* -lajia, näkyisivät PCR:n ja elektroforeesiajon jälkeen UV-valossa. Lisäksi lisättiin Thermo Scientific Oy:n DyNAzyme II DNA polymeraasi 2 U/µl (23 µl). DNA-polymeraasi on entsyymi, joka monistaa reaktiossa olevaa DNA:ta.

L-alukkeet olivat spesifiset kaikille *Listeria*-lajeille, ja niiden sekvenssit olivat: L11 (5'-CTC CAT AAA GGT GAC CCT -3') ja U1 (5'- GAC CMG CCG CGG TAA TWC - 3')

L. monocytogenes -spesifisten LM -alukkeiden sekvenssit olivat: LR (5'- TCC AGA GTG ATC GAT GTT AA -3') ja LF (5'- CAA ACG TTA ACA ACG CAG TA -3')

Yhteen reaktioon (50 µl) tarvittava PCR-seos on esitetty alla olevassa kuvassa:

40 µl	Vesi
5 µl	10X Puskuri
1,0 µl	L-alukeseos
1,0 µl	LM-alukeseos
1,0 µl	dNTP 10mM
1,0 µl	DyNAzyme II DNA polymeraasi (entsyymi) 2 U/µl
Yhteensä yhteen reaktioon (50 µl) tarvitaan:	
49 µl PCR-seosta/kuoppa + 1 µl DNA	

Kuva 5. Yhteen reaktioon tarvittava määrä PCR-seosta, 49 µl

Reagenssit sekoitettiin keskenään Vortex-sekoittajalla ja pipetoitiin sitten 49 µl:n erissä kylmätelineessä olevassa näytelevyssä oleviin ajokuoppiin, jotka oli numeroitu juoksevin numeroin 1-22, ja lisättiin ajoliuoksen päälle sitten tippa öljyä. Siirrettiin näytelevy pois ”puhtaasta” tilasta ja pidettiin ajoliuos kylmätelineessä, jotta polymeraasin aktiivisuus ei alenisi, ja lisättiin sitten 1 µl solulysaattia ajoliuoksiin öljyn alle mahdollisimman aseptisesti pipetoimalla. Kiinnitettiin muovikalvo levyn päälle ja vietiin näytteet PCR-laitteeseen ajoon siihen tehdyn *Listeria*-ohjelman mukaisesti.

Ohjelman kaava on esitetty kuvassa 6:

Vaihe	Aste (°C)	Aika (sek)	Muut
1) Blokin lämmitys	95	∞	
2) Alkudenaturaatio	95	1	
3) Denaturaatio	94	30	
4) Annealing	51	20	
5) Extensio	72	30	
6) Syklit	-	-	30
7) Loppuextensio	72	8	
8) Jäähdytys	4	∞	
9) Lopetus	-	-	

Kuva 6. Listeria-detektio ohjelma MULTIPLEX PCR

PCR-ajojen suorittamisen aikana piti varoa näytteiden kontaminoitumista, mutta tämä tapahtui onneksi harvoin ja näyteajot pystyttiin helposti uusimaan, jos kyseistä kontaminaatiota tapahtui.

Ajogeelin valmistus

PCR-ajon aikana valmistettiin 1,5 % agarosigeeli elektroforeesiajoa varten. Punnittiin 500 ml erlenmeyeriin 4,5 g Lonzan I.D.NA -agarosia (katso liite 13) ja lisättiin siihen 12 ml 25 X TAE-puskuria ja noin 288 ml steriiliä vettä. Otettiin ylös liuksen ja astian yhteispaino ja lämmitettiin liuos mikroaaltouunissa, kunnes kaikki agarosio oli varmasti liuennut, jonka jälkeen lisättiin steriiliä vettä, jotta paino oli taas yhtä paljon kuin ennen lämmitystä, jotta lämmityksessä haihtunut vesimäärä palautui.

Ennen valamista jäähdytettyyn geeliseokseen lisättiin 15 µl etidiumbromidia (EtBr).

3.12.1 Agarosigeelielektroforeesi

Otettiin PCR-ajossa olleet näytteet ja lisättiin niihin 10 µl Ficoll-liuosta (katso liite 1, kohta 10) monistusreaktion pysäyttämiseksi. 16 µl molekyylipainomarkkeria (DNA Molecular Weight Marker VII 0.37-8.0 kbp) pipetoitiin geelin kuoppiin 1 ja 23. Ajokuoppiin 2-22 pipetoitiin sitten varovasti 16 µl PCR-ajosta tulleita näytteitä (kuopat 2-20) sekä positiiviset että negatiiviset kontrollinäytteet (kuopat 21 ja 22)

Ajo-ohjelman asetukset on esitetty alla olevassa kuvassa:

Voltit (V)	100
Milliampeerit (mA)	330
Ajo-aika (H, min)	1,20

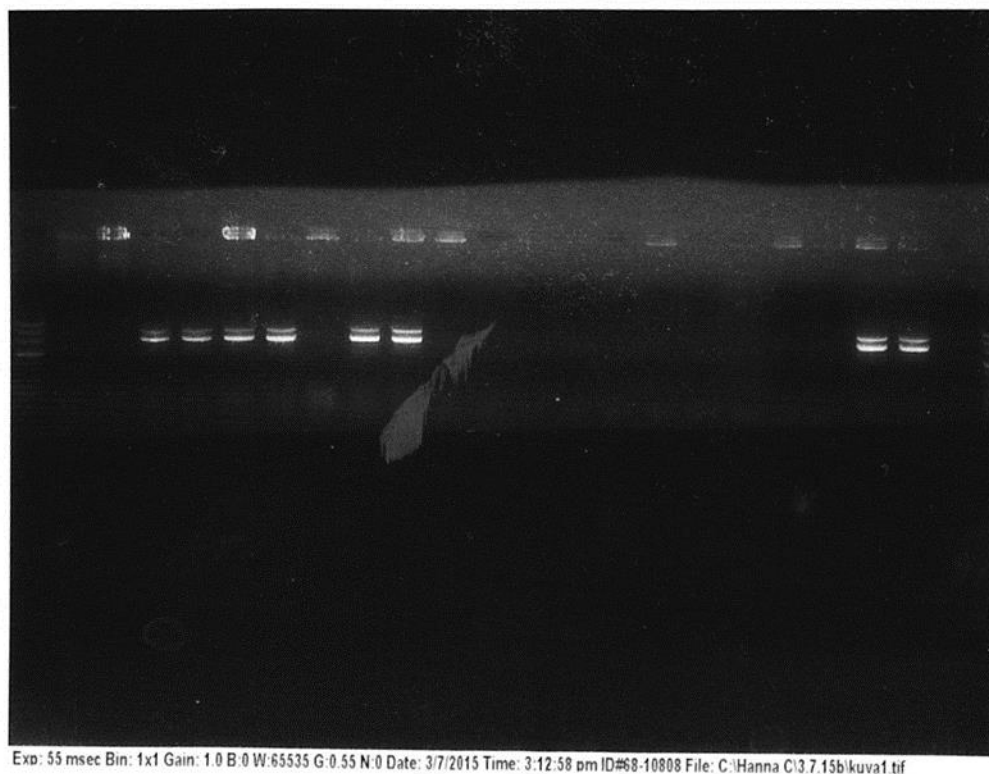
Kuva 7. Agarosigeelielektroforeesi ajo-ohjelma

Ajon jälkeen geeli kuvattiin UV-valossa, jotta saatiin selville, mitkä näytteistä olivat mahdollisesti joko *Listeria*- tai etsittyä *L. monocytogenes* -lajia.

4 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Näytteistä pystyttiin usein jo silmämääräisesti arvioimaan, niiden ollessa selektiiviagareilla, mitkä näytteet olivat etsittyä *L. monocytogenes* -kanta. Tämä oli helpompaa maito- ja suodatinnäytteillä, mutta jotkin tilanäytteet myös antoivat selviä tuloksia. Näytteitä oli helppo käsitellä, eikä niille pääsääntöisesti tarvinnut tehdä muita esikäsittelyjä.

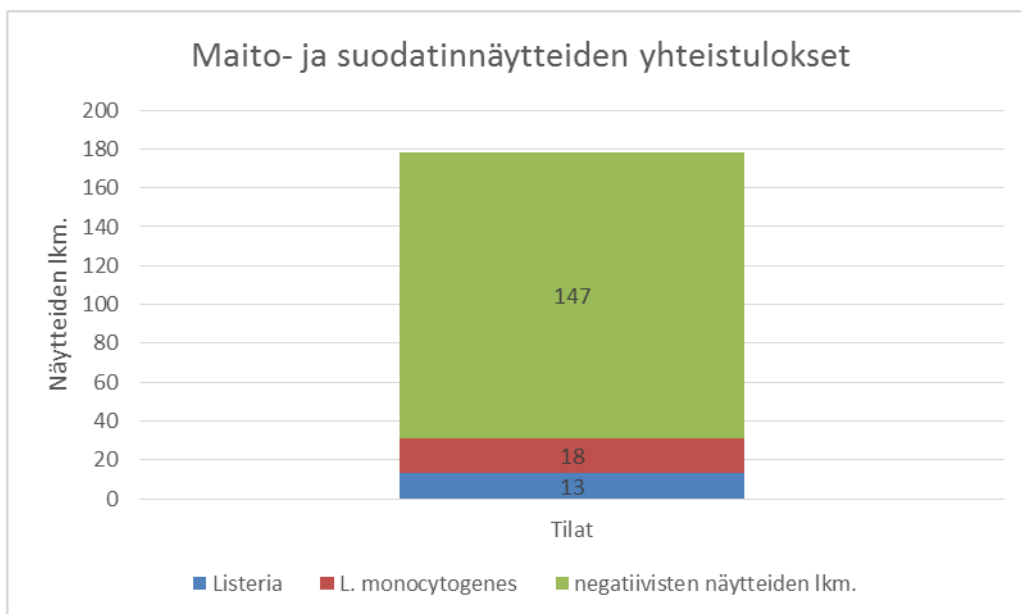
Näytteiden kontaminoitumisen minimoimiseksi, PCR-ajoliuos tehtiin valmiiksi puhdastilassa, käyttäen siihen varattuja välineitä ja siihen lisättävät näytteet pipetoitiin laminaari-kaapissa liuokseen. Lisäksi huolellisella laboratoriotyöskentelyllä kontaminaation mahdollisuus väheni huomattavasti.



Kuva 8. Geeli-ajon tulokset UV-valossa kuvattuna. Vasemmalta reunasta alkaen kuvassa näkyy, molekyylipainomarkkeri, *Listeria* ja *L. monocytogenes* -lajia sisältävät näytteet, sekä *Listeria* sisältämättömät näytteet. Oikean reunan kolmella viimeisellä paikalla on positiivinen kontrollinäyte, negatiivinen kontrolli ja molekyylipainomarkkeri

4.1 Tilojen *Listeria*-tulokset kaikista maito- ja suodatinnäytteistä

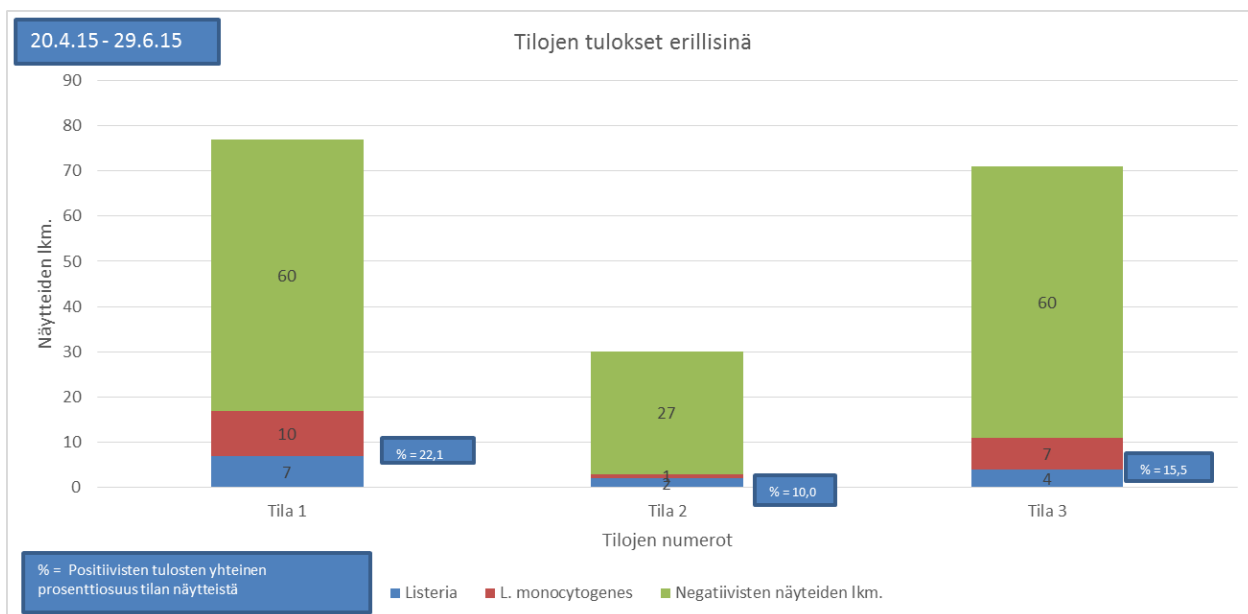
Kaikilta kolmelta tilalta tuli hieman yli kahden kuukauden työskentelyn aikana yhteensä 184 kappaletta maito- ja suodatinnäytteitä. Jokaiselle niistä suoritettiin samanlainen esikäsittely ja jokaiselle eristetylle kannalle tehtiin solulysaatio ja PCR-ajo. Havaittiin, että kaikista maito- ja suodatinnäytteistä saatujen PCR-tulosten perusteella noin 17 % oli positiivisia näytteitä. Näistä näytteistä, 13 kannasta saatiin PCR-tuote *Listeria*-spesifisillä alukkeilla ja 18:sta *L. monocytogenes* -spesifisillä. Kuitenkin on huomioitava, että kaikkia *L. monocytogenes* -kantoja *Listeria*-alukkeet eivät tunnista. (kuva 5).



Kuva 9. Kaikkien tilojen positiiviset *Listeria*- ja *L. monocytogenes* -kantojen tulokset yhteisenä kaaviona

4.1.1 Tilakohtaiset tulokset maito- ja suodatinnäytteistä

Kun tuloksia käsiteltiin tilakohtaisesta näkökulmasta, todettiin, että prosentuaalisesti (22,1 %) eniten positiivisia *Listeria*-näytteitä (17 kpl) saatiin tilalta 1, mutta tuloksista pitää huomioida se, että tilalta tuleva näytemäärä oli myös suurin. Tilalta 2 saatujen tulosten perusteella huomattiin, että sieltä saapuvien *Listeria*-positiivisten näytteiden määrä oli sekä lukumäärältään (3 kpl) että prosentuaaliselta määrältään (10,0 %) pienin. Lisäksi vain yksi näyte oli etsittyä *L. monocytogenes* -lajia. Tilalta 3 saapuvista näytteistä yhteensä 11 kappaletta (15,5 %) saapuvista näytteistä oli *Listeria* ja *L. monocytogenes* -positiivisia. Lisäksi verrattuna tilojen 1 ja 2 lukumääriltään tasaisiin tuloksiin tilan 3 näytteistä suurempi määrä oli *L. monocytogenes* -kantaa kuin muiden *Listeria*-lajien edustajia. (kuva 6).



Kuva 10. Kaikkien 3 näytetilän positiiviset näytetulokset erillisinä kaavioina

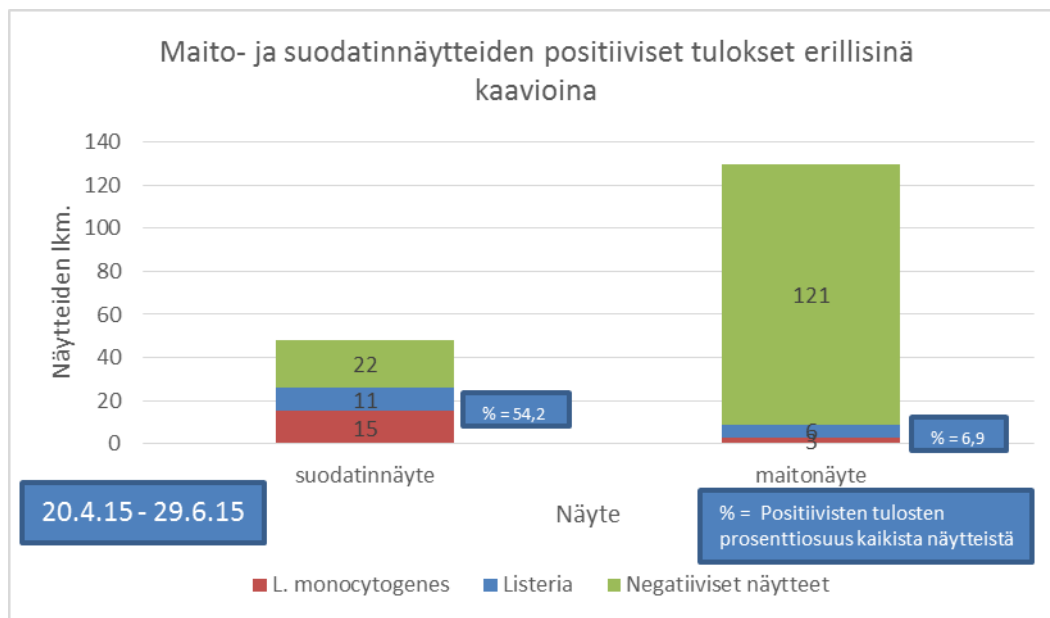
4.1.2 *Listeria*- ja *L. monocytogenes* -kantojen määrä maito- ja suodatinnäytteissä

Tarkasteltaessa pelkkiä maito- ja suodatin-näytteitä havaittiin, että selvästi suodatinnäytteet antavat enemmän positiivisia tuloksia *Listeria*- ja *L. monocytogenes* -kannoista verrattuna maitotankeista otettuihin näytteisiin. (kuva 7). Oli yllättävää, kuinka selvästi prosentuaalisesti yli puolet (54,2 %) 48 tutkitusta suodatinnäytteestä oli *Listeria* -positiivisia. Tämän lisäksi suurempi määrä positiivisista tuloksista sisälsi etsittyä *L. monocytogenes* -lajeja. Kaikista positiivista suodatinnäytteistä 15 kappaletta (31,3 %) oli *L. monocytogenes* -positiivisia ja 11 kappaletta (22,9 %) sisälsi muita *Listeria*-lajeja, joita ei käytetyllä LM-alukkeella tunnistettu.

Tarkasteltaessa samaa kaaviota maitonäytteiden kohdalla huomataan, kuinka suuri ero niiden ja suodatinnäytteiden välillä on. 130 maitonäytteestä vain 9 kappaletta (6,9 %) oli *Listeria*-positiivisia. Näistä 6 kappaletta (4,6 %) oli muita *Listeria*-lajeja ja vain 3 kappaletta (2,3 %) oli etsittyjä *L. monocytogenes* -kantoja.

Ero voi selittyä osittain sillä, että koska kaikki lypsetty raaka-maito kulkee suodattimien läpi, suurin osa bakteereista jää niihin ja vain pieni osa kannoista pääsee suodattimien läpi tankkeihin asti. Suodattimien kontaminaatiomahdollisuus on siis moninkertaisesti suurempi verrattuna maitotankkeihin päätyvään maitoon. Lisäksi maidon mukana lypsyn

aikana mahdollisesti tulevat partikkelit (ruoho, turve, maaperän lika) vaikuttavat mitä todennäköisemmin tuloksiin, koska suodatinnäytteet olivat usein havaittavasti melko likaisia. Lian päätyminen mukaan on varsinkin mahdollista, jos eläin on maannut maassa ollessaan laitumilla.



Kuva 11. *Listeria*- ja *L. monocytogenes* -positiivisten tulosten lukumäärät maito- ja suodatinnäytteissä.

Ero suodattimien ja maitonäytteiden välillä olikin selvästi havaittavissa jo aikaisemminkin, varsinkin *L. monocytogenes* -näytteiden kohdalla. Havaittiin jo selektiivisiä *Listeria*-agareita tarkistaessa, että suodatinnäytteet antoivat lupaavampia tuloksia etsityn *L. monocytogenes* -kannan kohdalla, koska niille muodostuvat pesäkkeet vastasivat usein muodoiltaan ja morfologialtaan etsittyä lajia.

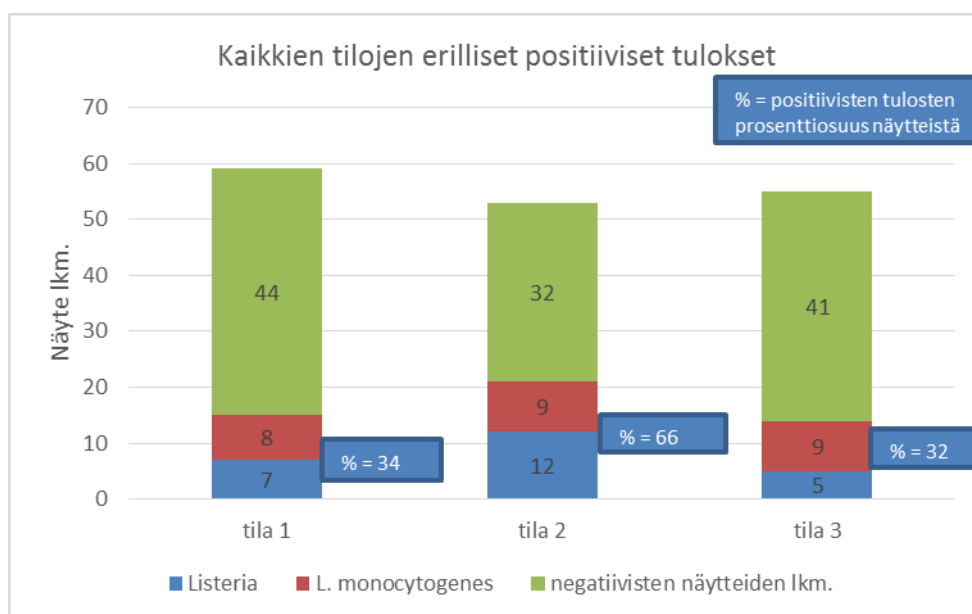
4.2 Näyttilojen ympäristönäytteet

Kaiken kaikkiaan kaikilta kolmelta tilalta tuli yhteensä 167 kappaletta ympäristönäytteitä, jotka sisälsivät sienillä kerätyt näytteet, topsy-näytteet, uloste-, rehu- ja turvenäytteet sekä vesinäytteitä. Topsy-näytteet kerättiin lypsylaitteiston sisäpinnoilta, sieninäytteitä kerättiin näyttilojen eri työhuoneiden pinnoilta, missä kontaminaation tapahtuminen oli mahdollista, kuten maituhuone, lypsyasema ja navetta. Turvenäytteet kerättiin eläinten

makuupaikoilta ja navetan ja pihaton alueelta. Rehunäytteet kerättiin eläinten ruokintapinnoilta, sekä säilytysvarastoista. Vesinäytteet kerättiin eläinten juomapaikoista ja suodatinputkien huuhteluvvedestä.

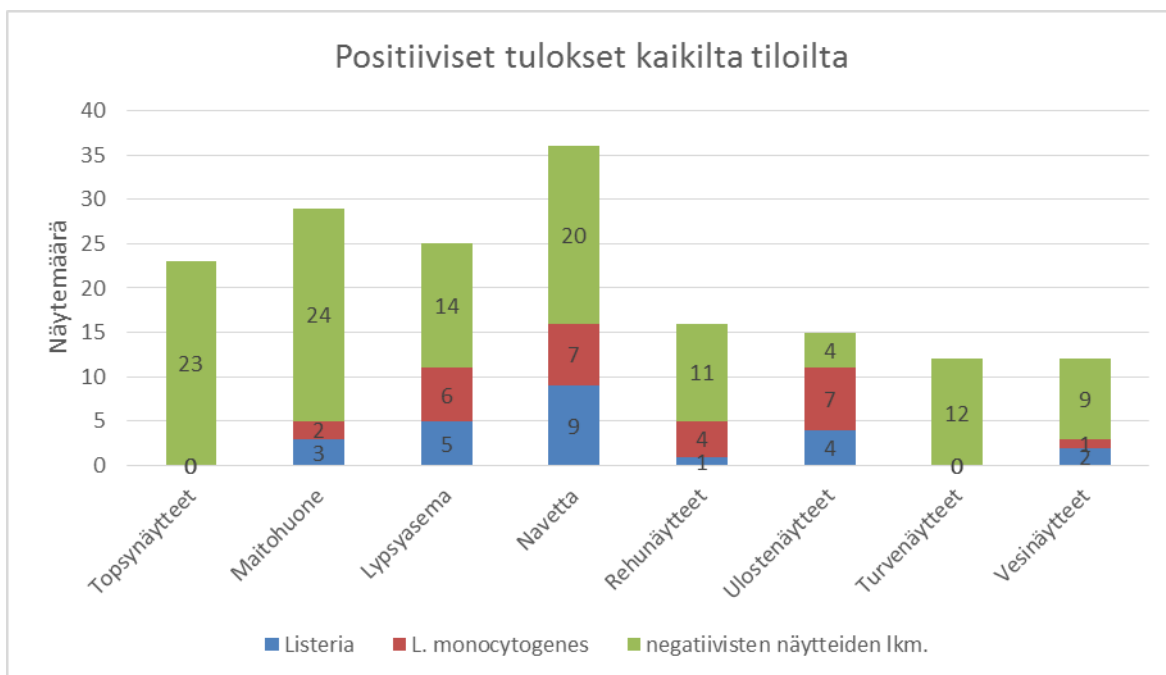
4.2.1 Kaikkien tilojen ympäristönäytteiden positiiviset tulokset

Verrattaessa jokaisen tilan tuloksia keskenään, havaittiin, että tilan 2 näytteissä oli eniten positiivisia näytteitä, mutta tarkasteltaessa niitä havaitaan, että positiiviset tulokset ovat pääsääntöisesti muiden *Listeria*-lajien kuin patogeenisen *L. monocytogenes* -lajin kantoja. Tilan 1 ja 3 näytteiden yhteistuloksissa *Listeria* ja *L. monocytogenes* -positiivisten näytteiden lukumäärä pysyvät melko lähellä toisiaan ja pääsääntöisesti kaikista ympäristönäytteistä noin 32 - 66 % on tilasta riippuen *Listeria*-positiivisia. (kuva 8).



Kuva 12. Tilojen ympäristönäytteiden positiiviset tulokset

Tarkasteltaessa tarkemmin, mistä tutkitut näytteet oli kerätty ja positiivisten näytteiden lukumäärää keräyspistettä kohden, voidaan todeta, että suurin positiivinen näytemäärä saatiin navetoista kerätyistä 36 näytteestä, joista 16 kappaletta (44,4 %) oli *Listeria*-positiivisia. Pääsääntöisesti navetasta kerätyt näytteet olivat eläinten juoma- ja ruoka-astioista., mutta myös navetan lattian näytteistä havaittiin *Listeriaa* ja *L. monocytogenes* -bakteeria. Muista kerätyistä näytteistä havaittiin, että lypsyaseman näytteissä sekä uloste-näytteissä oli yhteistuloksissa myös paljon positiivisia tuloksia verrattuna muihin näytteisiin. (kuva 9).



Kuva 13. Positiivisten tuloksien sijoittuminen tiloilta kerättyihin ympäristönäytteisiin.

4.3 Tilojen näytteiden tulokset erillisinä

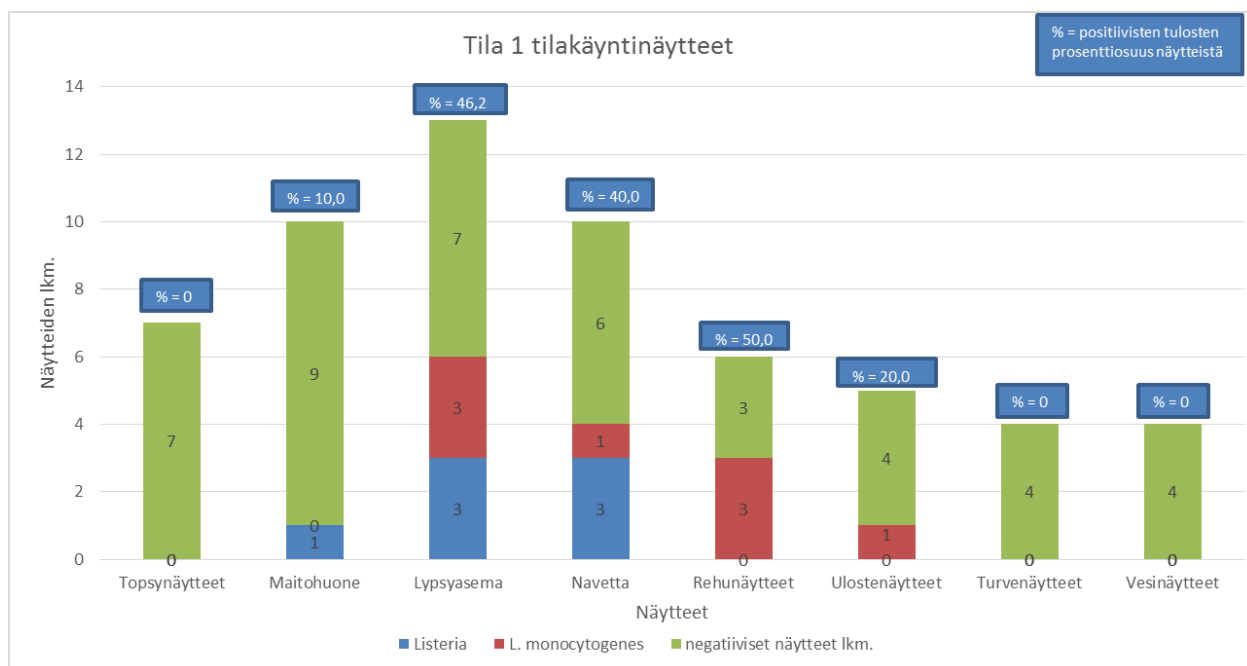
Tarkasteltaessa tiloilta kerättyjä ympäristötuloksia erillisinä kaavioina ja tuloksina (kuvat 10-12) havaittiin, kuinka paljon tulokset vaihtelivat tilasta riippuen.

4.3.1 Näytetilan 1 ympäristönäytteiden tulokset

Tilalla 1 suurin osa positiivisista tuloksista saatiin lypsyasemalta kerättyistä näytteistä ja sieltäkin suurin osa oli *Listeria*a, eivät *L. monocytogenes* -lajeja. Löydetyt kolme *L. monocytogenes* -kanta, oli kerätty lypsyaseman lattialta tai sitten aseman vesikupin alta. Asemalta löydetyt *Listeria* -näytteet saatiin käytetyistä lypsyliinasta, aseman lattialta ja vesikupista. Tästä voidaan todeta, että kannat olivat todennäköisesti tulleet eläinten jalkojen mukana ulkoa, koska maaperässä esiintyy paljon *Listeria*a. Samoin voidaan päätellä myös maitohuoneen lattiakaivosta kerätyn näytteet positiivisesta tuloksesta.

Tilan rehunäytteissä todettiin myös olevan melko paljon *L. monocytogenes* -bakteeria, mistä johtuen yksi positiivinen ulostenäyte, joka tilalta saatiin, johtuu todennäköisimmin huonolaatuisesta kontaminoituneesta säilörehusta ja heinästä, joita positiivisen tuloksen

antanut eläin on syönyt. Tämä myös pääsääntöisesti selittää tilan navetasta saatujen, vesikupista ja ruokintapöydiltä kerätyt positiiviset tulokset. (kuva 10).

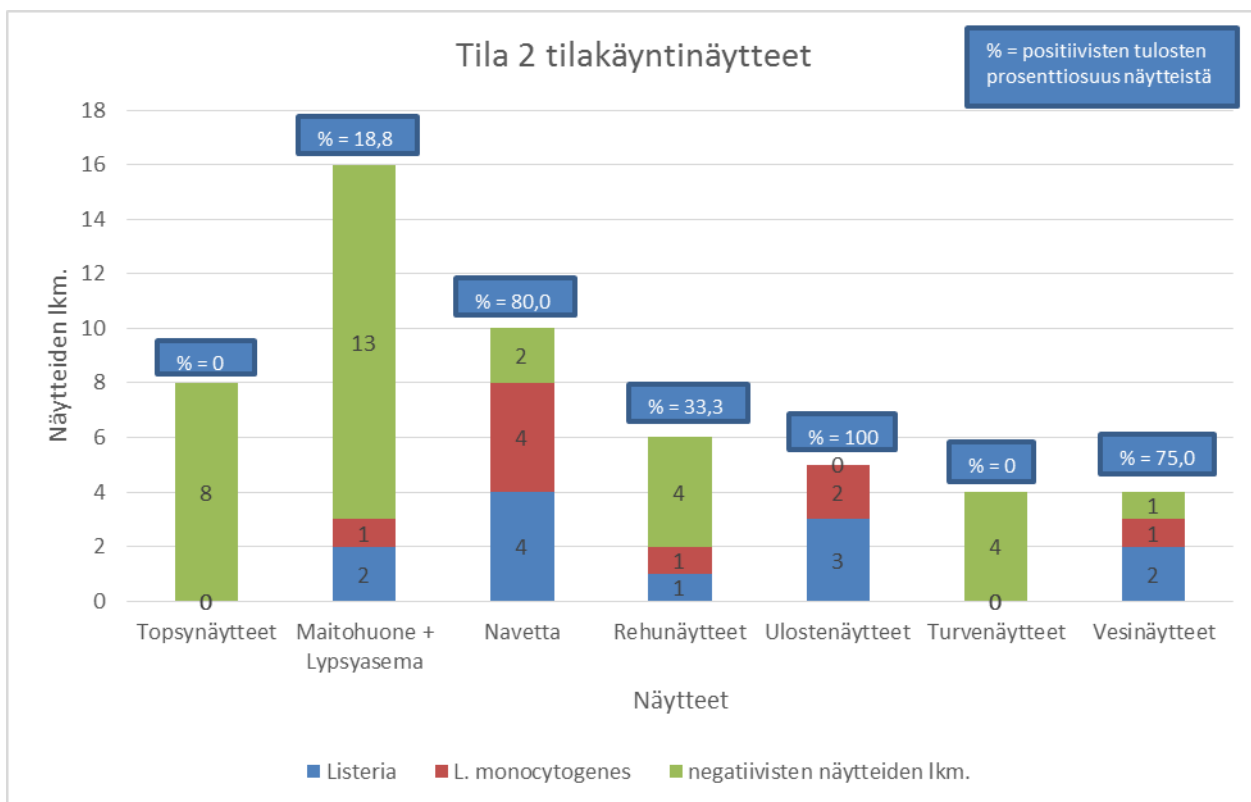


Kuva 14. Näytetilan 1 positiiviset näytetulokset

4.3.2 Näytetilan 2 ympäristönäytteiden tulokset

Tilalta 2 suurin osa positiivisista tuloksista saatiin navetta-, vesi- ja ulostenäytteistä, mutta kun tarkasteltiin lähemmin näytteiden keräyspisteitä, huomattiin, mistä todennäköisimmin saatujen positiivisten tulosten määrä johtui.

Suurin osa navetan positiivisista näytteistä on kerätty eläinten juoma- ja ruokapisteistä, samoin kuin positiiviset vesinäytteet. Kun tämän jälkeen tarkastellaan tilalta kerättyjä rehunäytteitä ja niiden positiivisia tuloksia, voidaan helposti linkittää ne ja suurin osa navetan tuloksista, kuten myös positiiviset uloste- ja vesinäytteet, jotka on pääosin otettu navetan juoma-altaasta, lehmille tarjoiltuun huonolaatuiseen säilörehuun, mitä on myös todettu aikaisemmin tehdyissä *L. monocytogenes* -tutkimuksissa. [3.] 2 kantaa, jotka eristettiin navetan lattialta ja parsimattonäytteestä, ovat todennäköisesti tulleet lehmien jalkojen mukana laitumelta, koska maaperässä on paljon *Listeriaa*. (kuva 11).



Kuva 15. Näytetilan 2 ympäristönäytteiden positiiviset tulokset

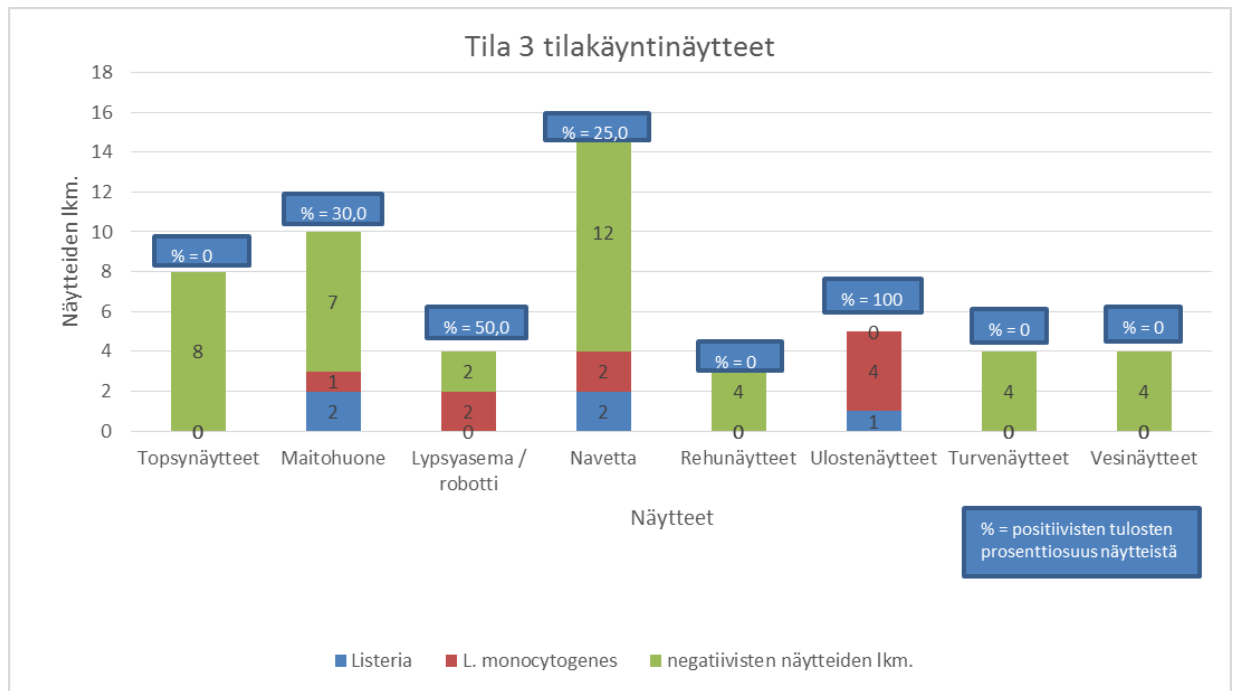
4.3.3 Näytetilan 3 ympäristönäytteiden tulokset

Näytetilan 3 näytteistä kaikista positiivisimmat tulokset saatiin ulostenäytteistä, joiden lähdettä on vaikea selvittää. Tilan rehunäytteet olivat negatiivisia, eikä niistä löytynyt ollenkaan *Listeriaa*, joten se, miten eläimet ovat saaneet bakteeria, muuten kuin niillä oli alun perin bakteereja suolistossaan, on vaikea sanoa, varsinkin kuin tilan vesi- ja turvenäytteet antoivat myös negatiiviset tulokset. Kuitenkin tilan navetan vesikupit ja ruoka-astiat antoivat positiiviset tulokset, joten eläimet ovat voineet syödä aikaisemmin saastunutta rehua, joka on saattanut loppua ennen kuin sitä saatiin otettua näytteitä. Toinen mahdollisuus on, että eläimet ovat laitumella ollessaan syöneet ruohoa ja sitä kautta saaneet bakteereja suolistoonsa, koska kuten on todettu, maaperässä on paljon *Listeriaa*.

Tilan lypsyaseman kumimatosta löydettiin positiivinen tulos *L. monocytogenes* -lajille, kuten myös aseman odotushuoneen lattialta. Koska pihatto-navetassa lehmät tekevät tarpeensa käytäville, on todennäköistä, että bakteeri on levinnyt lehmien jalkojen mukana lypsyaseman odotustilaan ja mahdollisesti kumimattoon, jos lehmä on maannut tai

seissyt sen päällä. Tämä on mahdollista, varsinkin jos lypsyröbotti on sijoitettu eläintiloihin, niin kuin tällaisissa tiloissa on tapana. Toinen vaihtoehto on, että bakteeria on tullut eläinten jalkojen mukana ulkoa.

Karjakeittiön lattiakaivoon bakteeri on todennäköisesti päässyt, kun lehmien lantaa kerätty pois käytäviltä ja se on kulkeutunut ihmisten jalkojen mukana sinne. (kuva 12).



Kuva 16. Näytetilan 3 ympäristönäytteiden positiiviset tulokset.

5 Johtopäätökset

Tässä työssä käytetyt työmenetelmät sopivat hyvin tiloilta tulleille maito- ja suodatinnäytteille. Ne näytteet, joissa oli *Listeria*- tai *L. monocytogenes* -bakteeria, tunnistettiin agarilta hyvin ja ne oli helppo eristää ja tunnistaa työhön tarkoitettulla PCR-menetelmällä ja agarosigeelielektroforeesi-ajolla.

Maito- ja suodatinnäytteiden tuloksista voidaan todeta, että *L. monocytogenes* -bakteeria on helpompi eristää suodatinnäytteistä ja kyseinen näyte on myös herkempi menetelmä löytää kyseinen bakteeri. Tämän näkee vertailukaaviosta (kuva 7) että kahden kuukauden ajalta, näytetilojen suodattimet päästivät hyvin vähän *L. monocytogenes* -kanta läpi maitosäiliöihin. On kuitenkin huomioitava, kuten aikaisemmin mainittiinkin, että suodattimien läpi kulkee huomattavasti suurempi määrä maitoa ja että ympäristövaikutukset, kuten maaperän lika tai ruoho, niiden tuloksiin riippuvat todennäköisesti tilakohtaisesta tilanteesta.

Esimerkiksi, tilan 3 lypsyrobotti on pihattonavetoille tyypillisesti eläintilassa lehmien kanssa, niin lehmien mukana maaperässä oleva *Listeria* voi päätyä näytteisiin. Suodattimet eivät ole kuitenkaan edes suuremmasta maitomäärästä johtuen ole päästäneet paljon *Listeriaa* läpi maitotankkeihin. Tästä voidaan päätellä, että säännöllinen suodattimien vaihto lypsyjen välillä, minimoi ainakin osittain maidon kontaminoitumisen riskiä.

Ympäristönäytteille työmenetelmä sopii joko hyvin tai melko hyvin riippuen näytteistä. Esimerkiksi ulostenäytteet liukenevat ja hajoavat helposti esirikastuksessa käytettyyn ½ Fraser -liemeen ja näytteitä voi olla silloin vaikea pipetoida, koska uloste voi tukkia pipetin kärjen, mutta muuten menetelmä sopii ympäristönäytteille hyvin.

Ympäristönäytteiden tuloksista voidaan sanoa, että yleisesti *Listeriaa* esiintyy tiloilla pääsääntöisesti ulosteissa, mikä voidaan liittää huonolaatuiseen säilörehuun, joita eläimille tarjoillaan. Huono rehu voidaan myös liittää navetoissa, eläinten ruoka- ja juomakuppeista otettuihin näytteisiin, koska jos eläin on syönyt kontaminoitunutta rehua ruokintapöydällä ja sen jälkeen juonut vettä, bakteerit ovat suun kautta siirtyneet eläinten juomakuppeihin.

Huono säilörehu voi myös vaikuttaa *Listeria*-positiivisiin maitonäytteisiin, kun kontaminoitunutta rehua syönyt eläin on lypsetty ja bakteeri on päässyt maidon mukana suodattimien ohi säiliöihin. Onneksi tämän tapahtumiseen on maitonäytteistä saatujen tulosten perusteella vain hyvin pieni mahdollisuus.

Tilan eri tilojen latioista löytyneet positiiviset kannat ovat mitä todennäköisemmin tulleet lehmien ja ihmisten jalkojen mukana, koska maaperä sisältää runsaasti *Listeriaa*. Tämä on erittäin todennäköisesti tapahtunut eläinten ollessa laitumilla.

Lähteet

- 1 Matinaho, Sanna 2008: Mikrobiologian tuntimateriaali, Laboratorioalan perustutkinto, Omnian Ammattiopisto.
- 2 *J Sci Food* 1989: **47**: 133 - 158, Griffith, M. W 1988: *Listeria monocytogenes*: Its Importance in the Dairy Industry. Hannah Research Institute, Ayr KA6 5HL, UK.
- 3 *J Dairy Sci* 1993: 76: 2891 - 2898, Sanaa, M., Poutrelm B., Menard, J. L., Serieys, F. 1993: Risk Factors Associated with contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. Epidemiology and Animal Health Management Laboratory Ecole, Ranska.
- 4 Nightingale, K.K. et al Co. Applied and Environmental Microbiology, Aug: 2004, p. 4458 - 4467. Verkkodokumentti <http://aem.asm.org/content/68/7/3366.full.pdf+html>. Luettu 11.11.2015.
- 5 Waak, Elisabet, Tham, Wilhem, Danielsson-Tham, Marie-Louise. Applied and Environmental Microbiology, July: 2002, p. 3366 - 3370. Verkkodokumentti. <http://aem.asm.org/content/68/7/3366.full.pdf+html>. Luettu 11.11.2015.
- 6 Zoonoosikeskus, listerioosi. Verkkodokumentti. <http://www.zoonoosikeskus.fi/portal/fi/zoonoosit/bakteerien aiheuttamat taudit/listerioosi/> Luettu 12.11.2015.
- 7 Terveyskirjasto, listerioosi. Verkkodokumentti. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00581 Lääkärikirja Duodecim, julkaistu 28.10.2013. Luettu 12.11.2015.
- 8 Terveyden ja Hyvinvoinnin Laitos, Infektiotaudit. Verkkodokumentti. <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/listeria> Luettu 12.11.2015.
- 9 Evira, Eläinten terveys ja eläintaudit, listerioosi. Verkkodokumentti. <http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten+terveys+ja+elaintaudit/elaintaudit/lampaat+ja+vuohet/listerioosi/> Luettu 12.11.2015.
- 10 HUS, listerioosi. Verkkodokumentti. <http://www.hus.fi/sairaanhoito/sairaanhoitopalvelut/teratologinen-tietopalvelu/Infektiot/Sivut/Listerioosi.aspx> Luettu 12.11.2015.
- 11 Metsä-Ketelä, Sanna –Salmela, Laura 2008: Antitrombiini Cambridge I- ja II – mutaatioiden osoittaminen suomalaisessa väestössä. Verkkodokumentti. <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/1206/antitrom.pdf?sequence=1>. Luettu 24.10.2015.

- 12 Hassi, Katja 2013: Geenitekniikan tuntimateriaali. Laboratorioanalyytikon opinnot, Metropolia.

AGARIT, SUPPLEMENTIT, AGAROOSIGEELI SEKÄ FICOLL-LIUOS

- 1) Fraser Broth Listerian rikastusliemi <http://www.labema.fi/tuote-LAB164>
- 2) X164 ½ Fraser supplementti <http://www.labema.fi/tuote-LX164>
- 3) X165 Fraser supplementti <http://www.labema.fi/tuote-LX165>
- 4) X564 ½ Fraser supplementti <http://www.labema.fi/tuote-LX564>
- 5) HAL010-A ALOA agari <http://www.labema.fi/tuote-HAL010-A>
- 6) X10 *Listeria* -selektiivinen supplementti <http://www.labema.fi/tuote-LX010>
- 7) X072 Polymyksiini B & Keftatsidiimi supplementti www.labema.fi/tuote-LX072
- 8) LAB172 L.M.B.A agari <http://www.labema.fi/tuote-LAB172>
- 9) X072N Nalidiksiinihappo 40 mg/l www.labema.fi/tuote-LX072N
- 10) Ficoll - Paque PREMIUM
http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-fi/products/AlternativeProductStructure_16963/17544202
- 11) LAB148 PALCAM agari www.labema.fi/tuote-LAB148
- 12) X144 P.A.C supplementti www.labema.fi/tuote-LX144
- 13) I. D. NA Agarosi
<http://www.lonza.com/products-services/bio-research/electrophoresis-of-nucleic-acids-and-proteins/nucleic-acid-electrophoresis/agarose-for-nucleic-acid-electrophoresis/idna-agarose.aspx>

14) CM0331 COLUMBIA BLOOD BASE AGAR http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0331&org=153&c=uk&lang=en

NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELY

