



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU  
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Olivia Oksanen

---

# Utaretulehdusta aiheuttavan *Streptococcus agalactiae* -bakteerin kartoitusnäytteiden PCR-analysoinnin optimointi

Valio Oy

Opinnäytetyö

Kevät 2022

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

## Opinnäytetyön tiivistelmä

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Olivia Oksanen

Työn nimi: Utaretulehdusta aiheuttavan *Streptococcus agalactiae* -bakteerin kartoitusnäytteiden PCR-analysoinnin optimointi

Ohjaaja: Merja Kyntäjä

Vuosi: 2022

Sivumäärä: 38

Liitteiden lukumäärä: -

---

Utaretulehdus on yleisin ja taloudellisesti merkittävin sairaus lypsylehmillä. On tärkeää, että lypsylehmien utaretulehdus ja sen aiheuttaja tunnistetaan nopeasti, jotta sairastuneet yksilöt saavat nopeasti kohdennettua hoitoa.

*Str. agalactiae* on utaretulehdusta aiheuttava bakteeri, joka tarttuu todella herkästi lypsykarjassa. Bakteeri aiheuttaa yleensä kroonista ja pitkäkestoista tulehdusta. *Str. agalactiae* on ainut utaretulehduksen aiheuttaja, jonka piilevän muodon hoidon on todettu olevan taloudellisesti kannattavaa lypsykauden aikana. *Str. agalactiae* -tartunnan toteaminen on hyvin tärkeää, jotta uudet tartunnat voidaan ennaltaehkäistä mahdollisimman tehokkaasti.

*Str. agalactiae* -bakteerin hävittäminen karjasta perustuu karjan yhtäaikaiseen tutkimukseen PCR-analyysillä. Menetelmä on käytössä Valio Oy:n utaretulehduslaboratoriossa, jonne tutkimus tehdään. Kartoituksissa karjan lehmien näytteet yhdistetään kymmenen näytteen koonneiksi, jotka tutkitaan. Jos koonnista löytyy kyseistä bakteeria, jokainen näyte tutkitaan yksittäin.

Työn tarkoituksena oli selvittää, tunnistetaanko jokainen *Str. agalactiae* -tapaus käytössä olevalla kymmenen koonnin menettelyllä vai jääkö osa tapauksista tunnistamatta. Samalla suoritettiin käyttöönottestaus Major-4.2 kitille, jota voidaan mahdollisesti tulevaisuudessa käyttää *Str. agalactiae* kartoitusten analysoinnissa.

Tutkimuksessa selvisi, että koontinäytteet jättivät *Str. agalactiae* -bakteeria sisältämiä näytteitä tunnistamatta. Näytteiden yksittäin analysointi parantaa heikkojen positiivisten näytteiden tunnistamista. Major-4.2 kitistä todettiin olevan hyötyä, se on ajankäytöllisesti tehokkaampi ratkaisu, kun halutaan selvittää ainoastaan *Str. agalactiae* -bakteerin esiintyvyyttä näytteissä.

Opinnäytetyössä ei mainita tutkimusaineistoon kerättyjen maitonäytteiden tuottaja- tai lehmäkohtaisia tietoja.

<sup>1</sup> Asiasanat: PCR, utaretulehdus

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## Thesis abstract

Degree programme: Bachelor of Engineering (UAS), Biotechnology and Food Processing

Specialisation: Food Technology

Author: Olivia Oksanen

Title of thesis: Optimization of PCR analysis of survey samples for mastitis-causing bacterium *Streptococcus agalactiae*

Supervisor: Merja Kyntäjä

Year: 2022

Number of pages: 38

Number of appendices: -

---

Mastitis is the most common and economically significant disease in dairy cows. It is important that mastitis in dairy cows and its cause can be quickly identified so that infected individuals can receive targeted treatment quickly. In Finland, the identification of the cause of mastitis is based on PCR analysis.

*Str. agalactiae* is a highly susceptible bacterium, especially during milking, which generally causes chronic and long-lasting infection. The bacterium is the only cause of latent mastitis where the treatment has shown to be economically viable during the lactation period.

The detection of *Str. agalactiae* infection is very important in order to prevent new infections as effectively as possible. The eradication of *Str. agalactiae* from the herd is based on a simultaneous examination of the herd by PCR analysis. The method is used by Valio Oy dairy, for whom the research was performed.

The purpose of the study was to determine whether each case of *Str. agalactiae* is identified by Valio's 10 pooling method or whether some cases remain unidentified. At the same time, commissioning testing of the Major 4.2 kit was performed, which may be used in the analysis of *Str. agalactiae* surveys in the future.

The study revealed that the pooled samples did not identify samples contaminated with *Str. agalactiae*. According to the study, samples should be examined individually to ensure that all samples would be identified. The Major 4.2 kit was found to be beneficial as it is less expensive than the Complete-16 kit currently in use. In addition, the Major 4.2 kit is a more time-efficient solution when it is only necessary to determine the presence of *Str. agalactiae* in the samples.

The thesis does not mention the producer- or cow- specific data of the milk samples collected in the research material.

<sup>1</sup> Keywords: PCR, mastitis

## SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä .....	2
Thesis abstract .....	3
SISÄLTÖ .....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo .....	6
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	8
1 JOHDANTO .....	9
1.1 Työn tausta .....	9
1.2 Työn tavoite.....	9
2 UTARETULEHDUS .....	11
2.1 Yleistä .....	11
2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> -bakteerin aiheuttama utaretulehdus .....	12
2.2.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> -bakteerin leviäminen karjassa.....	12
2.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> -kartoitusnäytteet.....	13
3 PCR UTARETULEHDUSDIAGNOSTIIKASSA .....	15
3.1 PCR.....	15
3.2 PCR utaretulehdustutkimuksessa .....	15
4 MATERIAALIT .....	17
4.1 PathoProof™ Mastitis Assay PCR .....	17
4.1.1 Testin kulku.....	17
4.1.2 Testipaneelit.....	18
4.1.1 Tulosten tulkinta.....	20
5 TYÖN KULKU .....	24
5.1 Major-4.2 kitin käyttöönotto .....	24
5.2 Yksittäisten näytteiden analysointi.....	25
5.3 Laimennossarjat.....	25
5.4 Raportointi.....	27
6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO .....	28
6.1 Major 4.2 kitin käyttöönotto .....	28
6.2 Koontinäytteet analysoituna yksittäin .....	29

6.3 Laimennossarjat.....	30
7 TULOSTEN TARKASTELU.....	32
7.1 Kartoitusnäytteiden optimointi.....	32
7.2 Tulosten hyödyntäminen.....	33
8 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	34
LÄHTEET.....	37

## Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Koontinäyte 21 (vas.) ja koontiin yhdistettyjen kymmenen lehmän yksittäiset näytteet.....	14
Kuva 2. Bakteerin DNA:n eristys automatisoidulla King Fisher Flex -laitteella.....	17
Kuva 3. Näytteistä eristetty DNA blokilla.....	18
Kuva 4. Complete-16 kitin kuoppalevy, jossa yksi näyte tarvitsee neljä kuoppaa jokaiselle PCR-luokselle (soveltaen Thermo Scientific, 2015a, s. 16).....	20
Kuva 5. Major-4.2 kitin kuoppalevy, jossa yksi näyte tarvitsee vain yhden kuopan (soveltaen Thermo Scientific, 2015b, s. 16).....	20
Kuva 6. Applied Biosystems™ QuantStudio™.....	21
Kuva 8. Kontaminoitu Näyte 1. ....	26
Kuva 9. Laimennossarja näytteelle 1N.....	27
Kuvio 1. PCR-käyrä ja Ct-arvon määräytyminen (soveltaen Pasma, 2016).....	22
Taulukko 1. Thermo Scientific PathoProof kittin tunnistuskohteet (Thermo Scientific, 2015a, s. 1; 2015b, s. 1).....	19
Taulukko 2. Ct-arvojen tulkinta (Movet, 2022; Thermo Scientific, 2016).....	23
Taulukko 3. Laimennossarjoihin valmistettujen kontaminoitujen näytteiden Ct-arvot <i>Str. agalactiae</i> -bakteerin osalta.....	26
Taulukko 4. Käyttöönoton tulokset.....	28
Taulukko 5. Eriävät tulokset jaettuna epävarmoin ja varmoihin tuloksiin.....	29
Taulukko 6. Koontinäytteet, joista löytyi yksittäin tutkittuna <i>Str. agalactiae</i> -bakteeria.....	29

Taulukko 7. Laimennossarja Näyte 1 Ct-arvot ..... 30

Taulukko 8. Laimennossarja Näyte 2 Ct-arvot ..... 31

## Käytetyt termit ja lyhenteet

<b>Blokki</b>	Alusta, jolle mikrobin DNA eristetään.
<b>Ct-arvo</b>	Ct-arvo kertoo PCR-sykliden monistuskertojen määrän, joka on tarvittu ylittämään kynnysyklarvo. Korkea Ct-arvo tarkoittaa, että näytteessä on vähäisiä määriä mikrobin DNA:ta.
<b>DNA</b>	DNA eli deoksiribonukleiinihappo sisältää eliöiden geneettisen aineksen.
<b>PCR</b>	Polymeraasiketjureaktio
<b><i>Str. agalactiae</i></b>	<i>Streptococcus</i> -bakteerisukuun kuuluva bakteeri.

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Työn tausta

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii Valio Oy, joka on suomalaisten maidontuottajien omistama elintarvikealan yritys. Valion Seinäjoen yksikön yhteydessä toimii Valion utaretulehduslaboratorio, jossa kaikki Valion tuottajien lähettämät utaretulehdusnäytteet analysoidaan.

*Streptococcus agalactiae* on herkästi tarttuva utaretulehdusta aiheuttava bakteeri, jonka esiintyminen maitotiloilla voi aiheuttaa laajoja ja kalliita toimenpiteitä. *Str. agalactiae* -bakteeri pyritään saamaan karjasta pois karjan utaremaidonäytteiden yhtäaikaista PCR-analysoinnilla. Suurten näytemäärien vuoksi kartoituksen näytteitä on Valion protokollan mukaan yhdistetty kymmenen näytteen koonneiksi, joista tutkitaan *Str. agalactiae* -bakteerin esiintyvyyttä. Koonnit ovat maitotiloille edullisempi vaihtoehto ja ne vähentävät huomattavasti utaretulehduslaboratorion työmäärää, kun vaihtoehtona on karjan jokaisen lehmän maidonäytteen yksittäinen analysointi.

PCR-analyysi on tarkka menetelmä, sillä menetelmä perustuu DNA:n monistamiseen (Ulmanen ym., 2014, s. 45). Koontimenettelyn herkkyyttä ei kuitenkaan ole tutkittu. On epävarmaa, kuinka monta näytettä voidaan yhdistää, jotta kaikki utaretulehdusta aiheuttavaa *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät näytteet pystytään havaitsemaan koonneista. Nykyiseen PCR-tutkimusmenetelmään kuuluu PathoProof™ Mastitis Complete-16 kit (Thermo Scientific), jonka sijaan opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritetaan PathoProof™ Major-4.2 kitillä (Thermo Scientific).

Sekä Valiota että tuottajia ajatellen olisi taloudellisesti kannattavaa selvittää, mikä on optimaalinen määrä näytteitä koontinäytteeseen. Optimaalisen näytemäärän löytäminen on tärkeää uusien tartuntojen ennaltaehkäisyyn ja eläinten hyvinvoinnin kannalta.

## 1.2 Työn tavoite

Työssä pyrittiin tarkastelemaan, onko nykyinen *Streptococcus agalactiae* -kartoitusten kymmenen näytteen koontimenettely tarpeeksi herkkä vai jääkö menettelyllä osa utaretulehdusta-

pauksista tunnistamatta. Menettelyn tarkoituksena on löytää *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät utaretulehdustapaukset karjasta. Tavoitteena on saada koontinäytteistä mahdollisimman suuret kustannusten minimoimiseksi kuitenkin niin, että jokainen *Str. agalactiae* -tapaus saadaan tunnistettua. Kartoitusten koontinäytemenettelyä käytetään siinä tilanteessa, jossa utaretulehdustapauksia epäillään karjassa olevan ainoastaan yksittäistapauksina.

Tarkoituksena oli tutkia nykyisen menetelmän herkkyys ja optimoida *Streptococcus agalactiae* -bakteerin kartoitusmenetelmä sellaiseksi, että sen avulla tunnistetaan kaikki tartunnan saaneet yksilöt. Opinnäytetyön tuloksena voi olla myös se, että kaikki yksittäiset näytteet kannattaa analysoida erikseen. Tällainen tilanne voisi olla esimerkiksi sellainen, jossa pieniä määriä *Str. agalactiae* -bakteeria sisältäviä näytteitä ei saadaan havaittua koonneista lainkaan tai niiden löytyminen on epävarmaa.

Opinnäytetyössä suoritetaan PathoProof™ Major-4.2 kitin käyttöönottotestaus. Kyseistä kittiä ei ole käytetty aikaisemmin Valion utaretulehduslaboratoriossa. Tarkoituksena oli selvittää, onko kitistä hyötyä jatkossa *Str. agalactiae* -bakteerin kartoitusnäytteiden tutkimisessa. Oletettavasti kitistä olisi hyötyä kartoituksissa etenkin siinä tapauksessa, jos koontinäytteistä luovuttaisiin ja kaikki näytteet analysoitaisiin erikseen tai tapauksissa, joissa oletetaan, että kartoitusnäytteissä on runsaasti *Str. agalactiae* -bakteerilöydöksiä.

## 2 UTARETULEHDUS

### 2.1 Yleistä

Hiitiö (2018) toteaa utaretulehduksen olevan yleisin ja myös kallein lypsylehmien sairaus. Hänen mukaansa on tärkeä, että utaretulehdusmikrobit tunnistetaan mahdollisimman nopeasti luotettavalla menetelmällä, jotta tulehduksen hoito tai muut tarvittavat toimenpiteet saadaan aloitettua mahdollisimman nopeasti. Hiitiö (2018) painottaa, että nopealla toiminnalla tulehduksen eteneminen saadaan pysäytettyä ja turha lääkehoito vältettyä. Aiempia tulehduksia ja niiden tuloksia voidaan taas hyödyntää tilakohtaisesti hallinta- ja ennaltaehkäisy-suunnitelmassa.

Heikkilän ym. (2010) mukaan lehmien utaretulehduksen hoitamisen on tutkittu olevan taloudellisesti kannattavampaa kuin nautojen korvaaminen uusilla yksilöillä. Utaretulehdukset aiheuttavat huomattavia kustannuksia maitotiloille enneaikaisten poistojen, sekä hoitoon liittyvien kustannusten vuoksi. Myös maidosta saatavia tuottoja menetetään maidon laadun heikkenemisen sekä tulehduksen aiheuttaman maidontuotosmenetyksen vuoksi. Utaretulehduksen tyypit voidaan jakaa sekä kliiniseen että piilevään utaretulehdustyyppeihin (Bloweyn ja Edmondson, 2010, s. 34). Kliininen tulehdustyyppi voidaan havaita esimerkiksi kuumeena tai maidon koostumuksen muutoksina, kun taas piilevä utaretulehdus ei aiheuta ulkoisesti havaittavia muutoksia. Piilevän utaretulehdus huomataan usein maidon kohonneesta solupitoisuudesta (Movet, 2022).

Hakala (2004, s. 29) toteaa lehmällä olevan neljä utareneljännestä, joiden toiminta on useilta osin toisistaan riippumatonta. Tästä syystä voi olla usein tilanne, jossa lehmän kaikki neljännekset eivät tulehdu yhtäaikaisesti ja maidon tuottamista muilla neljänneksillä pystytään jatkamaan normaalia maidon tuotantoa. Utaretulehdusta aiheuttavat erilaiset mikrobit, jotka pääsevät lehmän utareen vedinkanavaan (Blowey & Edmondson, 2010, s. 34). Useimmiten utaretulehduksen aiheuttajana ovat bakteerit. Taudinaiheuttajamikrobit jaetaan tarttuviin sekä ympäristöperäisiin mikrobeihin niiden tartuntatavan mukaisesti (Pasma, 2016). Raja jaloittelussa on kuitenkin häilyvä, sillä monilla bakteereilla erilaisia bakteerikantoja, joista toiset voidaan katsoa kuuluvaksi tarttuviin ja toiset ympäristöperäisiin.

Torpan (2014) mukaan lehmän hoidontarpeen arvioinnissa noudatetaan käytäntöä, jonka mukaan kliiniset tulehdukset hoidetaan lypsykauden aikana, kun taas piilevät tulehdukset hoidetaan lehmän umpeenpanon yhteydessä. Hokkasen (2017) mukaan myös lievä tulehdus voi aiheuttaa lehmälle kipua ja siitä seuraavaa oireilua. Sen vuoksi myös lievissä tulehduksissa kivun hoito kannattaa aloittaa pikimmiten. Utaretulehduksen hoitotoimenpiteet riippuvat siitä, mikä taudinaiheuttaja on kyseessä ja missä vaiheessa lypsykautta lehmä on.

## 2.2 *Streptococcus agalactiae* -bakteerin aiheuttama utaretulehdus

*Streptococcus agalactiae* on utaretulehdusta aiheuttava bakteeri, jota hoidetaan hyvin herkillä kynnyksellä (Kulkas, 2016). Se aiheuttaa pääsääntöisesti pinnallista tulehdusta utareen vedinkanavassa ja siksi se pystytään hoitamaan hyvällä todennäköisyydellä antibioottilhoidolla (Hakala, 2004, s. 36). *Str. agalactiae*en aikaansaama tulehdus on usein krooninen ja piilevä. Bakteeri ei välttämättä siis aiheuta selkeää oireilua lehmälle.

*Str. agalactiae* -bakteerin esiintyminen karjassa aiheuttaa lypsytiloille tuntuja taloudellisia tappioita (Torppa, 2014, s.15). Sen on havaittu piilevän tulehduksen myötä nostavan huomattavasti solumääriä, heikentävän maidon laatua sekä lehmien maidon tuottoa. Bakteeri onkin ainoa utaretulehduksen aiheuttaja, jonka aiheuttaman piilevän tulehduksen hoitamisen on tutkitusti todettu olevan taloudellisesti kannattavaa myös lypsykauden aikana (mts. 16). Siksi sen saamiseksi pois karjasta tehdään huomattavia toimenpiteitä verrattuna muihin utaretulehdusta aiheuttaviin bakteereihin. Koska *Str. agalactiae* -bakteerin aiheuttaman tulehduksen paranemisennuste on useimmissa tapauksissa hyvä, bakteeri on mahdollista hävittää karjasta kokonaisuudessaan (mts. 15–16).

### 2.2.1 *Streptococcus agalactiae* -bakteerin leviäminen karjassa

*Streptococcus agalactiae* oli vielä 1950-luvulla yleisin utaretulehduksen aiheuttaja suomalaisilla maitotiloilla (Kulkas, 2016). Sen esiintyvyys on sittemmin saatu kuriin sekä lakisääteisten tartuntatautivastustusohjelman että antibioottilhoitojen, tarkemmin sanottuna penisilliinihoitojen avulla. Kulkkaan (2016) mukaan nykyisin Valion aluelaboratorion utaretulehdusnäytteistä noin 0,9 %:sta tehdään *Str. agalactiae* -löydös. Tämä koskettaa vuositasona 3–4 % Valion maitotiloista. *Str. agalactiae* -bakteeri kulkeutuu tiloille useimmiten uuden bakteeria kantavan yksilön saapuessa karjaan (Kulkas, 2016).

Mustosen ym. (2010, s. 16–17) mukaan *Str. agalactiae* on tartunnallinen bakteeri ja se onkin utaretulehduksen aiheuttajista tarttuvien. Sen hoitoon riittää usein paikallishoito antibiootein ja tarvittaessa neljänneksen umpeuttaminen. Umpeuttaminen suoritetaan, jotta yksilö ei enää levittäisi bakteeria maidon välityksellä. Torppa (2010, s. 14) toteaaakin, että yleisin *Str. agalactiae*en tartuntatapa on lypsyt yhteydessä. Bakteerin on havaittu tarttuvan lypsyt lisäksi ympäristöstä kuten likaiselta parrelta sekä vasikoihin ternimaidosta (Kulkas, 2016). On ollut myös tutkimusdataa siitä, että bakteeri voi tarttua jopa suu- tai ulosteperäisesti (Jørgensen ym., 2016). Kuitenkin myös ihminen voi kantaa bakteeria oireettomana ja levittää sitä näin karjaan esimerkiksi huonon käsihygienian seurauksena. Kertakäyttöisten hansikkaiden käyttö onkin suositeltavaa, kun ollaan tekemisissä *Str. agalactiae* -bakteeria kantavien yksilöiden kanssa (Blowey & Edmondson, 2010, s. 97).

Kulksaan (2016) mukaan *Str. agalactiae* -bakteeri hävitetään karjasta erottelemalla yksilöt, joiden on PCR-analytiikan avulla todettu kantavan bakteeria. Positiiviset lehmät erotellaan tämän jälkeen poistettaviin ja penisilliinihoidettaviin tapauksiin. Prosessi joudutaan uusimaan usein 3–4 kertaa ja lisätoimenpiteenä vastapoikineet testataan vuoden ajan bakteerin hävittämiseksi aloitettujen toimenpiteiden aloittamisesta. Jos *Str. agalactiae* -bakteeria on näytteessä vähäinen määrä, se ei välttämättä aiheuta suuria toimenpiteitä, vaan lehmä siirryt tarkkailuun ja siltä otetaan uusi näyte tartunnan varmistamiseksi (Hiitiö ym., 2013, s. 41).

### **2.2.2 *Streptococcus agalactiae* -kartoitusnäytteet**

Koska *Str. agalactiae* -bakteerin on katsottu olevan ainoita utaretulehduksen taudinaiheuttajia, jonka myös piilevät muodot kannattaa hoitaa, *Str. agalactiae* -bakteeri pyritään saamaan koko karjasta pois kartoittamalla koko karjan tartuntatilanne. Valiolla on suunniteltu käytäntö kyseisen bakteerin kartoitusnäytteiden analysointiin.

Tällä hetkellä Valiolla on käytäntönä yhdistää kartoitusnäytteet kymmenen näytteen koonneiksi (sisäinen tiedonlähde, 31.12.2018). Tätä menetelmää käytetään resurssien ja kokonaiskustannusten pienentämiseksi. Eläinlääkäri johtaa *Str. agalactiae* -kartoituksia tiloilla ja voi antaa myös perusohjeistuksesta poikkeavia ohjeistuksia tapauskohtaisesti. PCR-analyysi on hyvin herkkä tunnistamaan pieniäkin määriä tutkittavaa bakteeria (Pasma, 2016, s.12). On ollut epäselvää, tunnistetaanko koontimenetelmän avulla myös ne näytteet, jotka sisältävät pieniä määriä *Str. agalactiae* -bakteeria.

Tutkimus suoritetaan Valio Oy:n tämänhetkisellä menetelmällä niin, että noin kymmenen kappaletta erillisiä näytteitä yhdistetään koontinäytteeksi. Koontiin yhdistetään 1000 µl jokaista yksittäisen lehmän näytettä. Kuvassa 1. on esimerkki koonnista, johon on yhdistetty 10 yksittäisen lehmän näytteet.



Kuva 1. Koontinäyte 21 (vas.) ja koontiin yhdistettyjen kymmenen lehmän yksittäiset näytteet.

Koontinäyte analysoidaan PCR-menetelmän avulla (sisäinen tiedonlähde, 31.12.2018).

Koontinäytteestä tutkitaan, esiintyykö siinä *Streptococcus agalactiae* -bakteeria. Jos näytteestä löytyy kyseistä bakteeria, jokaisen yksittäisen lehmän näyte analysoidaan erikseen. Näin bakteeria kantavat yksilöt pystytään löytämään karjasta ilman että kaikkia näytteitä tarvitsee analysoida erikseen. Koontimenettelyä kannattaa käyttää tapauksissa, jossa bakteeria kantavia lehmiä on ainoastaan yksittäistapauksina karjassa. Vaihtoehtona on myös koko karjan yksittäin analysointi. Koontien voidaan katsoa olevan järkevä vaihtoehto, jotta PCR-analyysistä aiheutuvat kustannukset eivät nousisi turhan korkeiksi.

### 3 PCR UTARETULEHDUSDIAGNOSTIIKASSA

#### 3.1 PCR

PCR eli polymeerasiketjureaktio perustuu DNA:n monistamiseen entsyymien avulla (Ulmanen ym., 2014, s. 45–48). Menetelmää käytetään monipuolisesti bio- ja geenitekniikassa muun muassa mikrobien tunnistukseen. PCR-menetelmällä saadaan tunnistettua ennalta määritettyä DNA-jaksoa hyvin pienestä määrästä DNA:ta. Menetelmä onkin hyvin herkkä ja varma tunnistustapa.

Pärssisen ym. (2012, s.179) mukaan PCR-tekniikka perustuu ennalta määritellyn DNA-jakson monistamiseen. Ennen monistamista DNA:sta on puhdistettava proteiinit sekä lipidit eli DNA on eristettävä ennen PCR-reaktion aloittamista (Happonen ym., 2012, s. 91–92). Tämän jälkeen eristettyä DNA-jaksoa voidaan alkaa monistamaan. Koeputkessa olevaa DNA:n monistamiseen tarvitaan korkeaa lämpötilaa kestäviä DNA-polymeerasientsyymejä, alukkeita sekä suuri määrä neljää eri nukleotidia, joita tarvitaan DNA-juosteiden rakentamiseen.

Happonen ym. (2012, s. 92) mukaan polymeerasiketjureaktio alkaa, kun näyteputkessa oleva DNA avautuu lämpötilan noustessa 95 °C:seen. Tämän jälkeen lämpötila lasketaan noin 55 °C:seen, jolloin alukkeet kiinnittyvät avautuneeseen juosteeseen. Alukkeet ovat tiettyyn DNA-jaksoon suunniteltuja nukleotidiketjuja, jotka eivät voi kiinnittyä muihin kuin määritellyn DNA-jakson monistuskohtaan (Pärssisen ym., 2012, s.179). Happonen ym. (2012, s. 92) kertovat, että alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan noin 72 °C:seen, jolloin DNA-polymeerasientsyymi alkaa rakentaa uutta juostetta käyttäen nukleotideja. Aiemmin kuvattua tapahtumasarjaa kutsutaan yhdeksi sykliksi, jota toistetaan tarvittava määrä, jolloin DNA-juosteet monistuvat koeputkessa eksponentiaalisesti.

#### 3.2 PCR utaretulehdustutkimuksessa

Hiitiön (2018) mukaan PCR on ollut Suomessa rutiinimenetelmä utaretulehdustutkimuksessa vuodesta 2010. Tätä ennen analysointi suoritettiin bakteeriviljelyllä, joka korvautui PCR-tutkimuksella sen nopeuden sekä erittäin tarkan lajitunnistuksen vuoksi. PCR perustuu kullekin mikrobille ominaisen DNA-jakson eli geenin puhdistukseen maitonäytteestä sekä jakson monistamiseen. Utaretulehdusnäytteet ovat maitonäytteitä, jotka analysoidaan reaaliaikaisella

PCR:lla (Hiitiö, 2018). Kun maitonäytteessä on kohdemikrobin DNA:ta, tätä monistamalla voidaan tietyllä aallonpituudella havaita reaaliaikaisesti mikrobin DNA-jaksojen monistuminen fluoresenssin ansiosta. DNA:n monistamiseen tarvittavat liuokset ovat PCR-analyysiin kuuluvilla testipaneeleilla, joilla pystytään havaitsemaan kohdennettuja mikrobeja (Pasma, 2016, s.17). Testipaneeleja utaretulehdustutkimukseen löytyy markkinoilta useampi eri kappale ja niitä voidaan hyödyntää tapauskohtaisesti utaretulehdusbakteerien tunnistamiseen maitonäytteestä. Eri testipaneelit sisältävät eri PCR-liuokset, joissa on kullekin mikrobille yksilölliset alukkeet, joiden avulla voidaan kopioida vain tiettyä kohdemikrobia.

PCR on herkkä menetelmä ja siksi aseptiseen näytteenottoon on panostettava (Hiitiö, 2018). Hiitiön ym. (2013, s. 41) mukaan etenkin hyvin pieniä määriä kohdebakteeria sisältävien näytteiden arvioinnissa tulee ottaa huomioon kontaminaation mahdollisuus. Tämä on otettava erityisesti huomioon, mikäli lehmän oireet eivät vastaa PCR-analyysin tuloksia. Utaretulehdusta aiheuttaa useimmiten ainoastaan yksi mikrobi. Mikäli näytteessä havaitaan useampaa bakteeria, voi kyseessä olla näytteenoton aikana syntynyt kontaminaatio. Eläinlääkäri käyttää analyysissä saatuja tuloksia oman hoitoarvionsa perustana (Pasma, 2016, s.21).

Koska PCR perustuu DNA:n monistamiseen, menetelmällä saadaan havaittua sekä kuolleet että elävät mikrobit (Hiitiö ym., 2013, s. 40). Tämän seurauksena PCR-tuloksien on havaittu olevan positiivisia myös silloin kun perinteisellä viljelymenetelmällä tulehduksen on todettu parantuneen.

## 4 MATERIAALIT

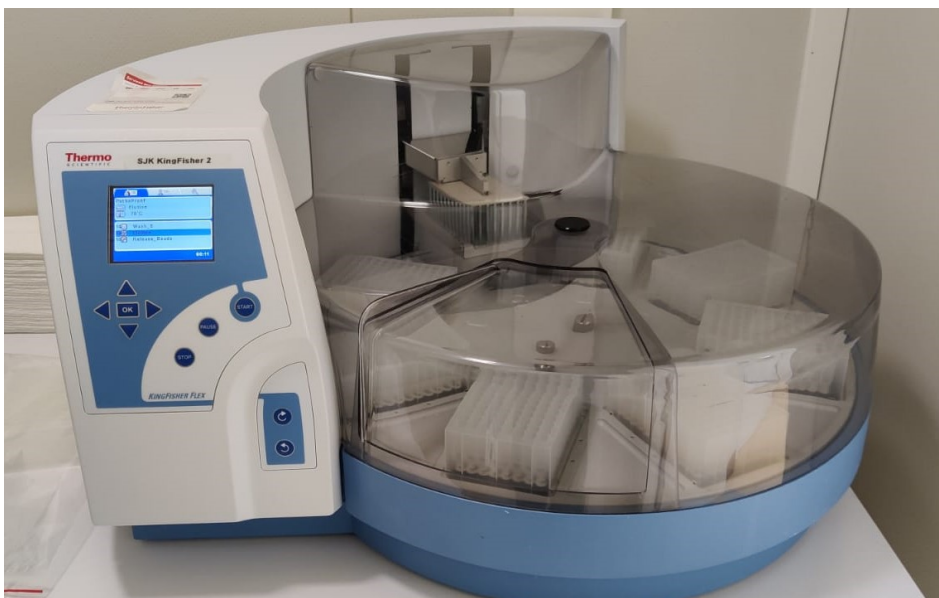
### 4.1 PathoProof™ Mastitis Assay PCR

#### 4.1.1 Testin kulku

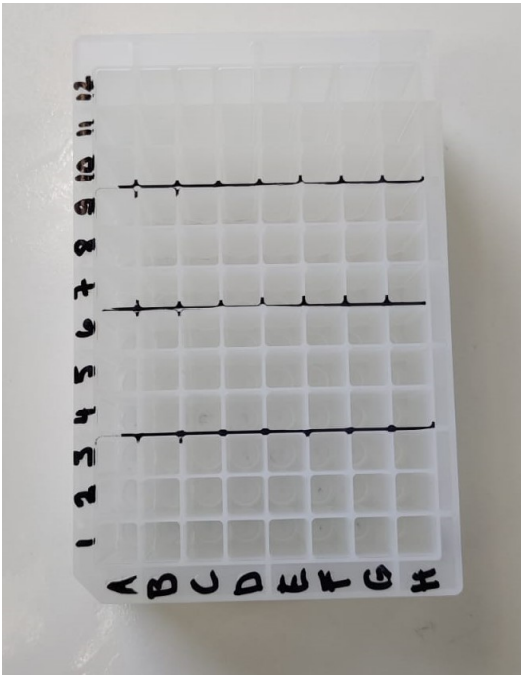
PathoProof™ Mastitis Assay (Thermo Scientific) on Valio Oy:lla käytössä oleva kaupallinen tunnistusmenetelmä, jolla pystytään tunnistamaan useita utaretulehdusta aiheuttavia mikro-  
beja samanaikaisesti (Pasma, 2016, s. 18). Menetelmä perustuu reaaliaikaiseen PCR-analyysiin (mts. 10).

PathoProof™ Mastitis Assay:n ensimmäinen työvaihe alkaa maidon somaattisten solujen harjoittamisella maidonäytteestä (Pasma, 2016, s. 18). Valion (sisäinen tiedonlähde, 29.05.2020) utaretulehduslaboratoriossa käytetään DNA:n eristämiseen puoliautomaattista King Fisher Flex -laitetta (kuva 2). Yhteen eristykseen mahtuu yhteensä 96 näytettä. Eristykseen tulee aina sisällyttää vähintään yksi negatiivinen kontrollinäyte.

Kuvassa 2 näkyvään King Fisher Flex -laitteeseen asetetaan erilaisia puhdistusliuoksia. King Fisher Flex -laite puhdistaa magneettipartikkeleja sisältävien puhdistusliuosten sekä magneettisauvojen avulla mikrobien DNA:n maidonäytteen muista partikkeleista. Näytteistä eristetty mikrobien DNA siirtyy eristyksen lopuksi Elution-liuokselle blokille (kuva 3).



Kuva 2. Bakteerin DNA:n eristys automatisoidulla King Fisher Flex -laitteella.



Kuva 3. Näytteistä eristetty DNA blokilla.

#### 4.1.2 Testipaneelit

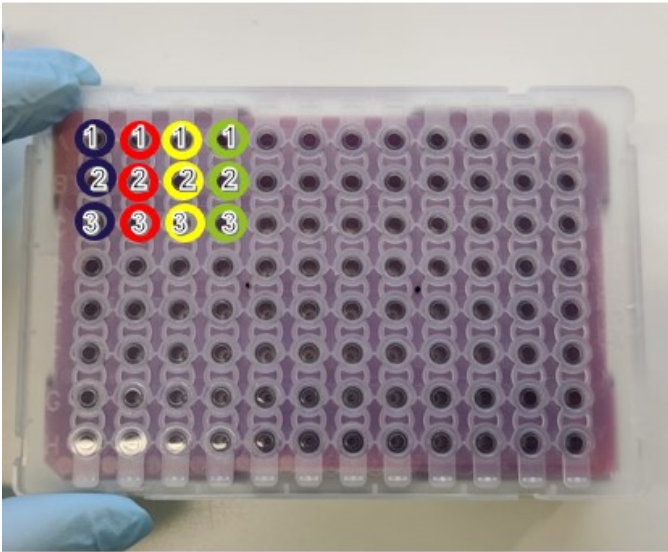
Valiolla (sisäinen tiedonlähde, 29.5.2020) on utaretulehduksen tunnistukseen käytössä tällä hetkellä PathoProof™ Complete-16 kitti, jolla pystytään tunnistamaan 15 taudinaiheuttajaa sekä stafylokokkien beetalaktamaasi penisiliiniresistenssigeeni (taulukko 1). Tässä työssä käytössä oleva PathoProof™ Major-4.2 kitti tunnistaa neljä utaretulehdusta aiheuttavaa bakteeria, joista yksi on opinnäytetyön tutkimuksen kohteena oleva *Str. agalactiae* (taulukko 1).

Taulukko 1. Thermo Scientific PathoProof kittin tunnistuskohteet (Thermo Scientific, 2015a, s. 1; 2015b, s. 1).

Mikrobi	Major-4.2 kit	Complete-16 kit
<i>Streptococcus uberis</i>	x	x
<i>Mycoplasma bovis</i>	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	x	x
<b><i>Streptococcus agalactiae</i></b>	<b>x</b>	<b>x</b>
<i>Corynebacterium bovis</i>		x
<i>Enterococcus spp.</i>		x
<i>Escherichia coli</i>		x
<i>Klebsiella oxytoca ja/tai pneumoniae</i>		x
<i>Mycoplasma spp.</i>		x
<i>Prototheca spp.</i>		x
<i>Serratia marcescens</i>		x
Stafylokokkien $\beta$ -laktamaasigeeni		x
<i>Staphylococcus spp.</i>		x
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>		x
<i>Trueperella pyogenes ja/tai Peptoniphilus indolicus</i>		x
Hiiva		x

Kumpaankin PCR-tutkimuskitin näytteenä käytetään PathoProof™ Mastitis Assay -menetelmällä eristettyä DNA:ta (Thermo Scientific, 2015a, 2015b). Complete-16 kitti sisältää neljä eri PCR-liuosta, joissa kaikissa on eri kohdemikrobille tarkoitettua DNA:n monistukseen tarvittavat alukkeet. Major-4.2 kitissä on vain yksi PCR-liuos. Tämän vuoksi Major-4.2 kitillä tehtyyn analyysiin mahtuu enemmän näytteitä. Kutakin PCR-liuosta lisätään yhteen kuoppalevyn kuoppaan. Kuten kuva 4 havainnollistaa Complete-16 kitillä tehtävään PCR-analyysiin eristettyä DNA:ta pipetoidaan neljään kuoppaan yhtä PCR-liuosta kohden. Kuvassa 5 havainnollistetaan Major-4.2 kitin analyysiin yhdestä maitonäytteestä DNA:ta pipetoidaan vain yhteen kuoppaan. Yhden Complete-16 kitillä näytteen analysointi vie kuoppalevyltä neljä paikkaa eli levylle mahtuu yhteensä 24 näytettä (kuva 4). Major-4.2 kitillä tehty näyte tarvitsee yhden

kuopan. eli levyille mahtuu 96 näytettä (kuva 5). Koska yksi PCR-laitteella tehty analyysi kestää noin 1,5 tuntia, suuren näytemäärän analysointi on nopeampaa Major-4.2 kittiä käyttäen. Major-4.2 kitillä pystytään kuitenkin analysoimaan ainoastaan neljän eri bakteerin esiintyvyyttä näytteessä (taulukko 1), siksi sitä kannattaa käyttää Valion utaretulehduslaboratoriossa ainoastaan kartoitusnäytteiden analysoinnissa.



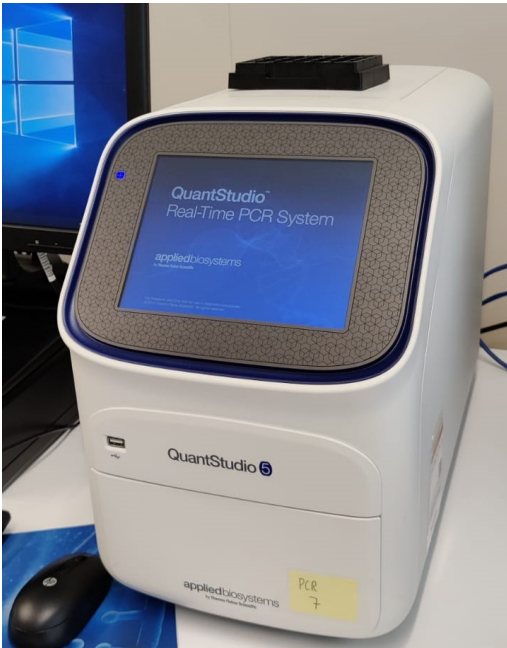
Kuva 5. Complete-16 kitin kuoppalevy, jossa yksi näyte tarvitsee neljä kuoppaa. Näytettä pipetoidaan jokaisen PCR-liuoksen joukkoon (soveltaen Thermo Scientific, 2015a, s. 16).



Kuva 4. Major-4.2 kitin kuoppalevy, jossa yksi näyte tarvitsee vain yhden kuopan (soveltaen Thermo Scientific, 2015b, s. 16).

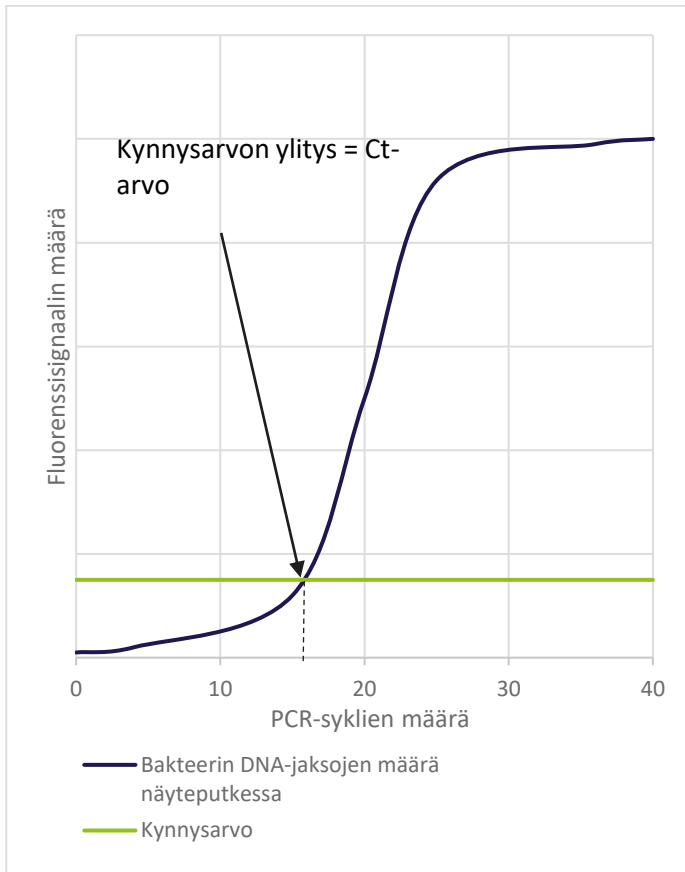
#### 4.1.1 Tulosten tulkinta

PCR-tuloksia analysoidaan PathoProof Norden Lab Studio -tietokoneohjelmalla. PathoProof Norden Lab Studio on ohjelma, joka on kehitetty PathoProof™ Mastitis Assay -menetelmän tulosten tulkintaan (Thermo Scientific, 2016, s. 2). Kalibrointi PathoProof Norden Lab Studio -ohjelmistolle on suoritettava aina, kun uutta kittiä käytetään ensimmäistä kertaa (Thermo Scientific, 2015b, s. 9). Reaaliaikainen PCR-analyysi tehdään PCR-laitteella ja opinnäytetyöhön analyysi suoritettiin Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 -laitteella (kuva 6).



Kuva 6. Applied Biosystems™ QuantStudio™.

PathoProof PCR -määrityksen tulokset perustuvat kynnyssyklarivoihin (Cycle threshold, Ct) (Thermo Scientific, 2016, s. 8–9). Ct-arvo kertoo monistusjaksojen määrän, joka vaaditaan kynnyfluoresenssisignaalin saavuttamiseksi. Kun bakteerin DNA-jakso alkaa monistumaan näyteputkessa sen määrä havaitaan reaaliaikaisen PCR-reaktion aikana fluoresenssisignaalin avulla. Kun mikrobin monistetun DNA:n määrä ylittää kynnyssyklarivon saadaan Ct-arvo, joka kertoo mikrobin DNA:n määrän näytteessä (kuvio 1). Mitä suurempi määrä DNA:ta on maitonäytteessä ollut, sitä vähemmän syklejä tarvitaan kynnyssyklarivon ylittämiseksi. Pieni Ct-arvo kertoo siis suuresta määrästä havaittua mikrobia.



Kuvio 1. PCR-käyrä ja Ct-arvon määräytyminen (soveltaen Pasma, 2016).

Tulokset PathoProof Norden Lab Studio -ohjelmasta tulokset saadaan Ct-arvoina. Pasma (2016) kuitenkin toteaa Ct-arvojen tulkinnan olevan kaikille bakteereille yksilöllisiä, joten niitä ei voi suoraan vertailla toisiinsa. Löydetyt DNA:n määrä löydöksessä ilmoitetaan +/-, +, ++ tai +++ tuloksina. Tulos +++ kertoo havaitun bakteerin DNA:n suuresta määrästä näytteessä, kun taas +/- tulkitaan raja-arvot ylittäväksi, mutta näytteessä on niin vähän bakteerin DNA:ta, että usein tulos tulkitaan negatiiviseksi. Pasma (2016) kertoo, että näin vähäinen mikrobin määrä näytteessä voi viitata mahdolliseen kontaminaatioon. Kuitenkin viime kädessä eläinlääkäri arvioi tulosten sekä eläimen hyvinvoinnin perusteella hoidon tarpeen (Pasma, 2016). Tulos voi olla myös negatiivinen, jolloin kuviossa 1 havainnollistettua kynnyksiarvoa ei ole ylitetty.

Vaikka bakteerin vähäinen määrä näytteessä voi viitata kontaminaatioon esimerkiksi näytteenoton aikana, *Streptococcus agalactiae* on poikkeus, jonka positiivinen tulos bakteerin määrästä riippumatta pitää ottaa huomioon (Movet, 2022). Taulukossa 2 havainnollistetaan *Str. agalactiae* -bakteerin Ct-arvoja ja niiden tulkintaa.

Taulukko 2. Ct-arvojen tulkinta (Movet, 2022; Thermo Scientific, 2016).

Bakteerimäärien tulkinta: <i>Str. agalactiae</i>					
<b>Ct-arvo</b>	+++	++	+	+/-	negatiivinen
	<24	24–32	32,1–37	37,1–40	-
<b>Bakteerin DNA:ta havaittu:</b>	suuri määrä	keskitasoinen määrä	pieni määrä	havainto ylittää kynnysarvon	ei löydöstä

Valion laboratoriossa on käytäntönä kehottaa näytteen lähettäjää ottamaan *Streptococcus agalactiae* -bakteerin tuloksen Ct-arvoltaan 37,1–40 (+/-) saaneelta lehmältä uusi utaretulehdusnäyte. Näin voidaan varmistua, ettei karjaan jää bakteeria kantavia yksilöitä ja uudet tartunnat voidaan näin estää. Helsingin yliopiston kliinisen tuotantoeläinlääketieteen professori P. Rajala-Schultz (henkilökohtainen tiedonanto, 14.4.2022) suosittelee myös *Str. agalactiae* -kartoituksissa +/- lehmien tutkimista uudelleen.

## 5 TYÖN KULKU

Aineistoa työhön analysoitiin PCR-analyysin avulla. Yksittäisiä näytteitä kerättiin 441 kappaletta, jotka kaikki ovat olleet käytössä olevan menetelmän mukaisessa *Str. agalactiae* -bakteerin kartoituksessa. Näistä näytteistä on tehty protokollan mukaan 47 koontinäytettä, joista 15:sta koonnissa esiintyi *Str. agalactiae* -bakteeria. Näiden 15:sta koontinäytteen yksittäiset näytteet on aikaisemmin analysoitu erikseen nykyisen menetelmän mukaisesti Complete-16 kittiä käyttäen. Kaikkia näytteitä ei koettu tarpeelliseksi analysoida tutkimusta varten ja tästä syystä kerätyistä näytteistä valittiin vain osa eri tutkimuksen eri vaiheisiin.

*Str. agalactiae* -bakteerin tunnistus näytteistä suoritetaan polymeerasiketjureaktioon perustuvan PathoProof™ Mastitis PCR Assay -menetelmän avulla. Menetelmä tunnistaa sekä elävät että kuolleet bakteerit maitonäytteistä, sillä se perustuu bakteerin DNA:n hajottamiseen ja sen monistamiseen. Näytteet on mahdollista pakastaa (Thermo Scientific, 2015b, s. 1). Pakastamisen lisäksi näytteiden säilyvyyttä edistävät säilöntäainetabletit. Säilöntäainetabletit eivät häiritse utaretulehdusnäytteiden tutkimista ja niitä voidaankin hyödyntää esimerkiksi silloin, kun näytettä ei voida säilyttää kylmässä esimerkiksi kuljetuksen aikana.

### 5.1 Major-4.2 kitin käyttöönotto

Tutkimuksessa suoritettiin aluksi PathoProof Major-4.2 kitin käyttöönottotestaus Valion laboratoriossa. Tutkimuksen jokainen PCR-analyysi suoritettiin kyseistä kittiä käyttäen. Kitin avulla voidaan tunnistaa neljä eri utaretulehdusta aiheuttavaa mikrobia, joista yksi on tutkimuksen kohteena oleva *Streptococcus agalactiae*. Käyttöönotto sisälsi kalibroinnin sekä käyttöönottotestauksen. Kalibrointi suoritettiin Major-4.2 kitin mukana tulleella kalibroitiliuoksella. Kalibroinnissa käytettiin PCR-laitteen omaa kalibrointiin tarkoitettua ajo-ohjelmaa. Käyttöönottotestauksen tuloksissa tarkasteltiin ainoastaan *Str. agalactiae* -bakteeria, sillä kyseistä kittiä on suunniteltu käytettäväksi ainoastaan *Str. agalactiae* -bakteerin tunnistuksessa.

Käyttöönottotutkimus suoritettiin satunnaisesti valituista kartoitusnäytteistä. Käyttöönotossa hyödynnettiin käytössä olevan Complete-16 kitillä saatuja tuloksia ja niitä vertailtiin Major-4.2 kitillä saatuihin tuloksiin. Käyttöönotossa hyödynnettiin sekä koontinäytteiden että yksittäisten näytteiden tuloksia ja kittien vertailussa käytettiin samaa eristettyä DNA:ta. Osa Major-4.2 kitin käyttöönottotestaukseen analysoiduista näytteistä oli pakastettuja paremman säilyvyyden takia. Näytteitä ei eristetty uudelleen.

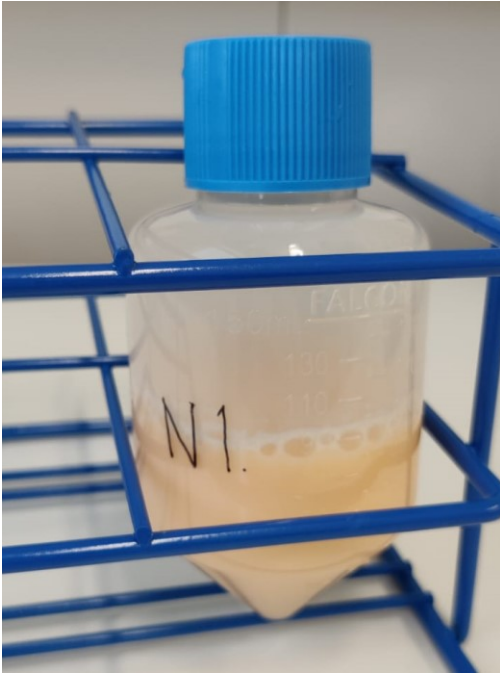
## 5.2 Yksittäisten näytteiden analysointi

Tutkimuksen toisessa vaiheessa tutkittiin koonteja, josta ei ollut Valiolla käytössä olevalla kymmenen koonnin menetelmällä löytynyt *Str. agalactiae* -bakteeria. Tutkimuksen kohteena oli yhteensä 27 koontia eli 255 yksittäistä näytettä. Koontinäytteistä 24:ään oli yhdistetty kymmenen näytettä ja yhdet kappaleet koonteja, joihin oli yhdistetty 9, 4 ja 2 näytettä. Jokainen näistä koonteihin yhdistetyistä näytteistä analysoitiin PCR-menetelmällä yksittäin. Kartoitusten yksittäisiä näytteitä, joissa ei esiintynyt *Str. agalactiae* -bakteeria, käytettiin tutkimuksen seuraavassa vaiheessa laimennossarjojen valmistukseen.

## 5.3 Laimennossarjat

Laimennoksissa vähäisiä määriä *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävää näytettä yhdistettiin koonniksi sellaisten näytteen kanssa, joka ei sisältänyt tutkittavaa *Str. agalactiae* -bakteeria. Laimennosten avulla tutkittiin, kuinka monta näytettä voidaan koontinäytteeseen yhdistää, jotta bakteeri vielä havaitaan PathoProof™ Mastitis PCR Assay -menetelmää käyttäen.

Laimennossarjoja varten tutkimukseen valmistettiin kaksi kontaminoitua näytettä. Kontaminoituihin näytteisiin yhdistettiin viisi vähäisiä määriä sisältävää *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävää näytettä, jotka oli aikaisemmassa tutkimusvaiheessa tutkittu ja bakteerin määrä näytteessä varmistettu. Molemmat kontaminoidut näytteet N1 (kuva 8) ja N2 analysoitiin ennen laimennossarjojen valmistamista. Analyysissa selvisi, että kummatkin kontaminoidut, näytteet sisälsivät verrattain vähäisiä määriä *Str. agalactiae* -bakteeria (taulukko 3). Myös laimennosnäytteisiin käytettiin kartoitusnäytteitä, jotka oli aikaisemmassa tutkimusvaiheessa todettu *Str. agalactiae* -negatiivisiksi. Myös näiden näytteiden Ct-arvot varmistettiin *Str. agalactiae* -bakteerin osalta ennen yhdistämistä sekä yhdistämisen jälkeen ja näistä näytteistä ei löytynyt *Str. agalactiae* -bakteeria.

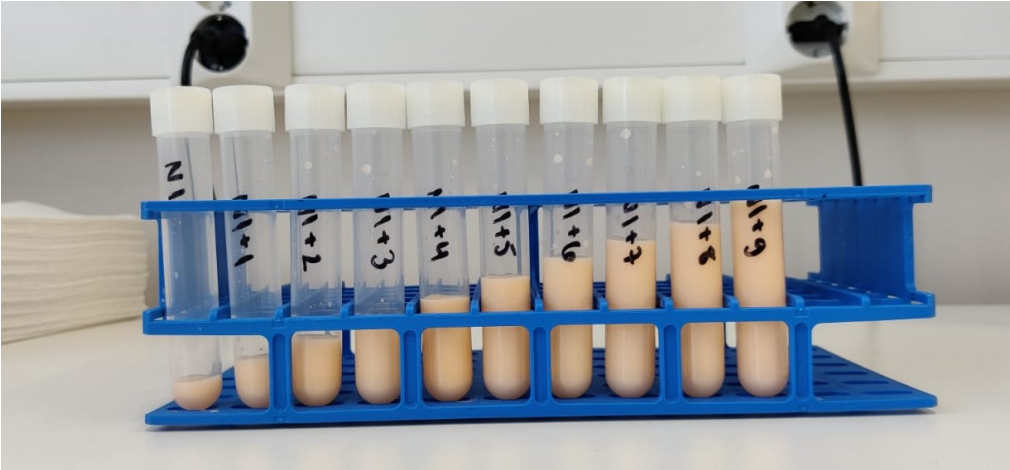


Kuva 7. Kontaminoitu Näyte 1.

Taulukko 3. Laimennossarjoihin valmistettujen kontaminoitujen näytteiden Ct-arvot *Str. agalactiae* -bakteerin osalta.

	N1 Kontaminoitu Näyte 1	N2 Kontaminoitu Näyte 2
	34,1	38,4
		35,7
ka.	34,1	37,1

Laimennossarjat valmistettiin Valion nykyistä koontinäytemenetelmää vastaavalla tavalla. Ensimmäinen näyte laimennossarjassa oli kontaminoitu näyte, joka pipetoitiin näyteputkeen. Sarjan toiseen näytteeseen pipetoitiin 1000 µl kontaminoitua ja 1000 µl laimennosnäytettä ja sarjan kolmas näyte valmistettiin niin, että 1000 µl kontaminoitua ja 2000 µl laimennosnäytettä yhdistettiin. Laimennossarjaa jatkettiin, kunnes 1000 µl:aan kontaminoitua näytettä oli yhdistetty 9 x 1000µl:aan laimennosta (kuva 2.).



Kuva 8. Laimennossarja näytteelle 1N.

Laimennossarjalla havainnollistettiin, kuinka monta näytettä voidaan yhdistää, jotta *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävä näyte havaitaan koonneissa. Tämän jälkeen laimennokset tutkittiin PathoProof™ Mastitis PCR Assay -menetelmää käyttäen. PCR-analyysi toteutettiin Major-4.2 kitillä.

#### 5.4 Raportointi

Kaikkien tutkimusvaiheiden PCR-tulokset tulkittiin Pathoproof Norden Lab Studio ohjelmistolla. Studio-ohjelmiston avulla saatiin tuloksista tarkat Ct-arvot. Kaikkien osioiden eli käyttöönoton, aineiston keruun ja kartoitusten tutkimisen sekä laimennossarjojen tulokset kerättiin Excel-taulukoihin.

## 6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

### 6.1 Major 4.2 kitin käyttöönotto

Käyttöönoton ensimmäisessä vaiheessa suoritettiin kalibrointi. Kalibrointi suoritettiin Pat-hoProof Norden Lab Studio -ohjelmistolle ja se sujui onnistuneesti.

Taulukossa 4 havainnollistetaan käyttöönoton tuloksia. Samojen näytteiden tuloksia vertailtiin Complete-16 kitillä ja Major-4.2 kitillä saatuihin tuloksiin. Näytteitä tutkittiin yhteensä 170 joista 90 %:ssa analyysit antoivat saman eli positiivisen tai negatiivisen tuloksen samalle näytteelle (taulukko 4). Eriäviä tuloksia oli 10 % kaikista tuloksista.

Taulukko 4. Käyttöönoton tulokset.

#### *Str. agalactiae* -tulokset

Complete-16 kit pos	Complete-16 kit neg	Complete-16 kit pos	Complete-16 kit neg
Major-4.2 kit pos	Major-4.2 kit neg	Major-4.2 kit neg	Major-4.2 kit pos
32	121	7	10

Yht. 170

Sama tulos % 90,0 %

Eri tulos % 10,0 %

Tuloksista 10 % erosivat toisistaan. Kuitenkin kun otetaan huomioon heikosti positiiviset tulokset, ero kaventuu. Thermo Scientificin (2018, s. 8) mukaan suositellaan, että yli 37 Ct-arvot katsotaan negatiivisiksi maitonäytteitä analysoidessa. Tulosten erot voivat johtua esimerkiksi laitekohtaisista eroista (Mikkola, 2006). Laitteiden väliset monistustehokkuuden erot näkyvät voimakkaammin, mitä enemmän monistuskertoja on. Pieniä määriä mikrobin DNA:ta sisältävillä näytteillä voi mahdollisesti olla suurempia eroja Ct-arvoissa. Käyttöönototestauksessa epävarmaksi tulokseksi luokitellut yli 37,0 Ct-arvon tuloksia oli yhteensä 14 (taulukko 5).

Taulukko 5. Eriävät tulokset jaettuna epävarmoinhin ja varmoinhin tuloksiin.

Ct-arvo $\geq$ 37,0		Ct-arvo $<$ 37,0	
Complete-16 kit pos	Complete-16 kit neg	Complete-16 kit pos	Complete-16 kit neg
Major-4.2 kit neg	Major-4.2 kit pos	Major-4.2 kit neg	Major-4.2 kit pos
4	10	3	0

Tällöin voidaan todeta, että varmasti eriäviä tuloksia on ainoastaan 3. Jos PathoProof-määrittäjiä kuitenkin käytetään seulontatarkoituksiin, joihin *Str. agalactiae* -kartoituksetkin kuuluvat, on suositeltavaa käyttää koko 40 (1–40) syklin aluetta (Thermo Scientific, 2018, s. 7–8). Koska käyttöönotto onnistui, voidaan Major-4.2 kittiä käyttää Valion utaretulehduslaboratoriossa, kun analysoidaan *Str. agalactiae* -bakteeria maidonäytteistä.

## 6.2 Koontinäytteet analysoituna yksittäin

*Str. agalactiae* -kartoitusnäytteet, joiden koontinäytteistä ei löytynyt kyseistä bakteeria analysoitiin yksittäin. Yksittäisiä näytteitä tutkittiin yhteensä 255, joista 30 näytteessä havaittiin *Str. agalactiae* -bakteeria. 15:sta koonnissa ei havaittu yksittäin tutkittunakaan kyseistä bakteeria, mutta 12:sta koonnissa havaittiin yksittäisiä löydöksiä. Taulukkoon 6 on kirjattu ainoastaan ne koonnit, joista yksittäin tutkittuna löytyi *Str. agalactiae* -bakteeria. Koonneista oli jäänyt tunnistamatta viisi + ja 25 +/- tapausta.

Taulukko 6. Koontinäytteet, joista löytyi yksittäin tutkittuna *Str. agalactiae* -bakteeria.

	Koonnissa yhdistettyjen näytteiden määrä	Näytteet, joissa Ct-arvo +	Näytteet, joissa Ct-arvo +/-
Koonti 2	10	-	2
Koonti 3	10	1	-
koonti 11	10	-	4
koonti 13	10	-	3
koonti 15	10	-	1
koonti 21	10	2	5
koonti 22	10	-	1
koonti 23	10	-	1
koonti 24	10	1	-
koonti 25	10	-	5
koonti 26	10	1	1
koonti 27	10	-	2
Yht.		5	25

Kuten taulukosta 6 huomaa, osassa koonneista oli jäänyt tunnistamatta useampi kappale *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävää näytettä. Esimerkiksi koonnissa 21 saatiin havainto kyseisestä bakteerista jopa seitsemässä näytteessä. Koontimenettelyn avulla ei siis ole saatu havainnoitua kaikkia näytteitä, jotka sisälsivät tutkittavaa bakteeria pieniä (+) ja Ct-arvot ylittäviä (+/-) määriä. Tutkimuksen perusteella yhtään ++ ja +++ -tulosta ei jäänyt tunnistamatta.

### 6.3 Laimennossarjat

Ensimmäisen laimennossarjan Näyte 1 eli N1 oli Ct-arvon keskiarvolta 33,0, mikä tarkoittaa tämän näytteen olevan Ct-arvon tulkinnaltaan + (taulukko 7). Tuloksista huomaa, kuinka Ct-arvon keskiarvo pääsääntöisesti nousee, mitä enemmän koontiin lisää näytteitä, joissa ei ole *Str. agalactiae* -bakteeria. Ensimmäisessä laimennossarjasta nähdään, vaikka Ct-arvoltaan (keskiarvo) 33,0 yhdistetään kymmenen näytteen koontiin, *Str. agalactiae* pystyttiin havainnoimaan jokaisesta koonnista.

Taulukko 7. Laimennossarja Näyte 1 Ct-arvot.

Laimennossarja	N1	N1+1	N1+2	N1+3	N1+4	N1+5	N1+6	N1+7	N1+8	N1+9	N1+10
1	33,3	35	36,8	35,5	35,3	35,7	35,9	36,6	36,2	39,1	
2	32,9	36,4	34,7	36,7	35,8	35,2	34,5	37,5	36,7	35,1	36,6
3	33,1	34,1	36,9	36,7	35,7	37,3	36,9	38,8	36,8	36,7	
4	34	34,4	35,4	35,5	36,1	36,2	37,8	39,1	36,1	38,3	
5	31,7	33,2	34,2	36	35,4	37,4	37,6	37,3	37,2	37,2	
6	32,7	34,8	35,2	35,4	36,4	37,3	37,6	37,1	37,1	35,1	
ka.	33,0	34,7	35,5	36,0	35,8	36,5	36,7	37,7	36,7	36,9	36,6

Toisen laimennossarjan kontaminoitu näyte eli N2 oli Ct-arvoltaan keskiarvolta 36,5, mikä tarkoittaa tämän näytteen olevan Ct-arvon tulkinnaltaan + (taulukko 8). Tuloksista näkee, että *Str. agalactiae* näkyy vaan osassa koonneista. Bakteeri ei erotu koonneissa säännöllisesti. Tämän perusteella kyseisen Ct-arvon omaavaa näytettä ei voi yhdistää koonneiksi niin, että *Str. agalactiae* näkyisi varmasti koonnissa.

Taulukko 8. Laimennossarja Näyte 2 Ct-arvot.

Laimen- nossarja	N2	N2+1	N2+2	N2+3	N2+4	N2+5	N2+6	N2+7	N2+8	N2+9	N2+10
1	36,1	-	38,2	-	-	-	-	-	37,6	-	-
2	36,8	-	-	-	-	-	-	-	38,8	39	-
3	34	37,9	36,1	37	39,1	39	-	-	37,8	37,5	-
4	37,4	-	-	38	38,6	39,3	38	-	-	38,9	-
5	37,6	37,9	36,6	37,3	-	-	-	-	-	-	-
6	37,3	36,6	38,4	37,2	37,8	-	-	-	-	-	-
<b>ka.</b>	<b>36,5</b>	<b>37,5</b>	<b>37,3</b>	<b>37,4</b>	<b>38,5</b>	<b>39,2</b>	<b>38,0</b>	<b>-</b>	<b>38,1</b>	<b>38,5</b>	<b>-</b>

## 7 TULOSTEN TARKASTELU

PathoProof Major-4.2 -kitin kalibroinnin ja käyttöönottotestauksen voidaan katsoa onnistuneen ja se on valmis käytettäväksi Valion laboratoriossa *Str. agalactiae* -bakteerin analysointia varten.

Sekä yksittäisten näytteiden tutkimuksessa että koontinäytteissä voitiin huomata, että nykyisellä kartoitusmenetelmällä ei varmuudella pystytä seulomaan karjasta kaikkia *Str. agalactiae* -bakteeria sisältäviä näytteitä. Mitä pienempi määrä bakteeria näytteissä on, sitä huonommalla todennäköisyydellä ne koonneista löytyvät. Tutkimuksissa huomatiin, että kymmenen näytteen koonneilla pystyttiin havaitsemaan kuitenkin kaikki Ct-arvoltaan +++ ja ++ -tapaukset. Ainoastaan +/- ja + -näytteiden löytymisen havaittiin olevan epävarmaa koontimenetellyllä.

Laimennossarjat osoittivat, että koontinäytteet eivät ole täysin varma tapa, kun halutaan löytää karjasta kaikki *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät näytteet. Koontiin yhdistettävien näytteiden määrää ei myöskään voida vähentää, kun halutaan varmuudella löytää kyseinen bakteeri. Tämä osoitettiin kontaminoidun näytteen N2 laimennossarjassa, jossa Ct-arvon keskiarvoltaan 36,5 näytettä ei pystytty havainnoimaan aina, kun näytettä laimennettiin. Vaikka koontinäytteeseen yhdistettäisiin ainoastaan kaksi näytettä, koonnista voi silti jäädä huomauttamatta osa *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät näytteet niissä tapauksissa, jossa bakteerin määrä näytteessä on ollut +/- tai + -tapaus. Toisaalta raja on hyvin häilyvä, sillä N1-näytteen laimennossarjassa jokaisessa koonnissa havaittiin *Str. agalactiae* -bakteeria.

### 7.1 Kartoitusnäytteiden optimointi

Tuloksissa havaittiin, ettei kaikkia +/- ja + -määriä *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät näytteitä pystytty havaitsemaan koontimenettelyn avulla. Jos katsotaan tarpeelliseksi, että kartoituksissa löydetään myös pieniä määriä bakteeria sisältävät näytteet, siinä tapauksessa kaikkien näytteiden analysointi yksittäin olisi järkevä vaihtoehto. Näytteiden yksittäin tutkiminen parantaa mahdollisuutta löytää karjasta myös pieniä määriä *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät näytteet. Kaikkien tulosten löytäminen voisi olla avuksi bakteerin leviämisen estämisen kannalta.

*Str. agalactiae* -kartoitukset kannattaa laboratorion toiminnan kannalta analysoida Major-4.2 kitillä, sillä kitti säästää aikaa, kun analysoitavana on runsaasti näytteitä. Lisäksi Major-4.2 kitti sisältää vähemmän PCR-liuoksia Complete-16 kittiin verrattuna. Major-4.2 kitillä suoritettuun PCR-ajoon mahtuu yhteensä 96 näytettä sisältäen kontrollinäytteen, kun taas Complete-16 kitillä suoritettuun PCR-analyysiin mahtuu 24 sisältäen kontrollinäytteen. Koska Major-4.2 kittiin kuuluu vähemmän PCR-liuoksia, voidaan olettaa, että kitti olisi mahdollisesti halvempi kustannuksiltaan. Kitin kustannuksien eroja yksittäin tehtävissä kartoituksissa ei tässä opinäytetyössä laskettu. Major-4.2 kitillä voidaan säästää aikaa ja sen avulla vältetään turhia analysointituloksia, mikäli halutaan ainoastaan havainnoida *Str. agalactiae* -tapaukset karjasta. Yksittäin tehtäviin näytteisiin kuluu enemmän aikaa, mitä voitaisiin kompensoida Major-4.2 kitin käyttöönotolla. Jos kartoitusten tutkimuksessa siirrytään yksittäin analysoituihin näytteisiin koontien sijasta, voidaan olettaa, että sen käytöstä *Str. agalactiae* -kartoituksissa olisi hyötyä.

## 7.2 Tulosten hyödyntäminen

Valio voi käyttää opinäytetyön tuloksia *Streptococcus agalactiae* -kartoitusnäytteiden analysoinnin pohjana. Opinäytetyön perusteella voidaan optimoida kartoitukset niin, että *Str. agalactiae* -bakteeri havaitaan suuremmalla todennäköisyydellä karjasta, eikä yksittäiset näytteet jää huomaamatta. Tuloksia voidaan myös mahdollisesti hyödyntää suuntaa antavana, mikäli halutaan kartoittaa karjasta jokin muu utaretulehdusta aiheuttava bakteeri.

## 8 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tavoitteet saavutettiin kolmen eri tutkimusvaiheen osalta. Ensimmäisessä osassa eli Major-4.2 kitin käyttöönotossa onnistuttiin saamaan samanlaisia tuloksia kuin Complete-16 kitillä. Eroavaisuudet kittien välillä voivat selittyä esimerkiksi laitekohtaisten erojen ja näytteissä olevien vähäisten DNA-pitoisuuksien aiheuttaman epävarmuuden avulla. Major-4.2 kittiä voidaan käyttää Valion utaretulehduslaboratoriossa *Str. agalactiae* -kartoitusnäytteiden analysoinnissa. Havainnoitiin, että Major-4.2 kitti on järkevää ottaa osaksi kartoitusnäytteiden analysointia etenkin siinä tapauksessa, jossa kartoitusnäytteet mahdollisesti tulevaisuudessa analysoidaan yksittäisinä näytteinä.

Uudet kartoitukset suositellaan tehtävän uudella Major-4.2 kitillä ja etenkin silloin, jos ne päädytään analysoimaan yksittäin. Kitin käytöstä aiheutuvien kokonaiskustannusten voidaan olettaa olevan matalammat kuin nykyisen menetelmän Complete-16 kitin. Kittien välisiä kustannuseroja ei laskettu tarkemmin tässä opinnäytetyössä. Laboratoriossa voitaisiin mahdollisesti arvioida jatkotutkimuksena kittien menekin määrä sekä kustannusten erot Complete-16 sekä Major-4.2 kittien välillä. Major-4.2 kitillä tehtyyn PCR-ajoon mahtuu 96 näytettä (sisältäen kontrollinäytteen), kun taas Complete-16 kitillä suoritettuun ajoon mahtuu 24 näytettä (sisältäen kontrollinäytteen). Yksi PCR-ajo kestää noin 1,5 tuntia ja tämä tarkoittaa sitä, että Major-4.2 kitillä analysoitavat kartoitusnäytteet olisivat nopeammin analysoitavissa varsinkin tapauksessa, jossa kartoitusnäytteitä on suuri määrä.

Tutkimuksen toisessa osassa selvitettiin, jääkö normaalin protokollan mukaisissa kartoitusnäytteissä *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät näytteet tunnistamatta. Tutkimuksessa havaittiin, että osa näytteistä jäi tunnistamatta. Nämä kaikki näytteet sisälsivät kyseistä bakteeria +/- tai + -määriä, mutta yhtään +++ tai ++ -määriä sisältäviä näytteitä ei havaittu jääneen huomaamatta kartoitusmenettelyllä. Toisessa vaiheessa kerättiin myös näytteitä laimennossarjoja varten. Tutkimuksen kolmannessa osassa analysoitiin laimennossarjojen avulla, kuinka monta näytettä voitaisiin koontiin yhdistää, jotta myös suuren Ct-arvon omaavat *Str. agalactiae* -tapaukset saadaan tunnistettua koonnista. Alkuoletuksena oli, että kymmenen näytteen koonneista ei välttämättä tunnisteta jokaista suuren Ct-arvon omaavaa näytettä. Tuloksista kävi ilmi, että koontien avulla ei saada täysin varmasti tunnistettua + tai +/- Ct-arvon näytteitä, kun tällaista näytettä laimentaa. Suuren Ct-arvon omaavat näytteet on analysoitava erikseen, jos ne halutaan tunnistaa suuremmalla varmuudella.

Koska Ct-arvon kasvaessa PCR-analyysin tuloksesta tulee epävarmempi, näyte, jolla on suuri Ct-arvo, voi olla myös kontaminaatio. Tämä tarkoittaa, ettei lehmä kanno *Str. agalactiae* -bakteeria vaan bakteeri on voinut päätyä näytteeseen esimerkiksi näytteenoton yhteydessä tapahtuneen kontaminaation seurauksena. Koska kyseinen bakteeri on niin sanotusti erityistapaus sen tarttuvuuden vuoksi, voidaan katsoa, että on silti järkevää löytää myös vähäisiä määriä *Str. agalactiae* -bakteeria sisältävät eli Ct-arvoltaan 37–40 tuloksen näytteet. Tällaisen tuloksen saaneet yksilöt voidaan ottaa tarkkailuun ja testata uudelleen *Str. agalactiae* -bakteerin positiivisen tuloksen varmistamiseksi. Tällöin saadaan varmistettua kantaako kyseinen yksilö bakteeria ja estää taudin leviäminen karjassa tai vastaavasti voidaan välttää turhat lääkehoidot.

Tuloksien tarkastelussa on otettava myös huomioon virhelähteet. PCR-analyysi on hyvin herkkä menetelmä ja sen vuoksi kontaminaation vaikutus tuloksiin on huomioitava. Analyysin aikana on voinut sattua inhimillisiä tai laitteiden aiheuttamia virheitä. Näistä virheistä on voinut syntyä kontaminaatioita. Kontaminaatiot ovat voineet sattua esimerkiksi näytteen käsittelyn kuten näytteenoton yhteydessä tai laboratoriossa DNA:ta eristettäessä. Eroja tuloksiin on voinut tulla myös esimerkiksi maitonäytteen liian vähäisestä sekoittamisesta ennen eristämistä.

Vaikka *Str. agalactiae* -bakteerin löytämisen on todettu olevan taloudellisesti kannattavaa maitotiloille, tutkimus ei kuitenkaan sisältänyt taloudellisen kannattavuuden laskelmia koontinäytemenettelylle tai yksittäisten näytteiden analysoinnille. Kartoituksissa karja tutkitaan useimmiten moneen kertaan, jolloin esimerkiksi tulehduksen alkuvaiheessa bakteeria ei ole erittynyt maitoon merkittäviä määriä, mutta seuraavassa kartoituksessa bakteerin määrä maitonäytteessä voi olla suurempi tulehduksen edettyä. Jatkotutkimuksissa voitaisiin esimerkiksi selvittää, onko tuottajalla kuitenkin taloudellisesti kannattavaa löytää kaikki +/- tai + -tulokset vai ovatko vähäiset määrät useimmissa tapauksissa merkinä esimerkiksi kontaminaatiosta. Tutkimus antaa hyvän pohjan sille, kuinka hyvin tällaisten suuren Ct-arvon omaavien näytteiden tulokset pystytään havaitsemaan koontinäytteistä. Tutkimus antaa myös pohjaa sille, kuinka kartoitusmenettelyä voidaan tulevaisuudessa ja myös tilakohtaisesti muokata, mikäli myös heikosti positiivisten tulosten löytämisen katsotaan olevan tarpeellista.

Koska *Str. agalactiae* -bakteeri on todella tarttuva, tarvitaan tehokkaita toimenpiteitä, jotta bakteeri saadaan koko karjasta poistettua. Koontinäytteet ovat kustannuksiltaan halvemmat

kuin yksittäin analysoidut näytteet. Voidaan kuitenkin ajatella, että pitkällä aikavälillä katsottuna myös tuottajalle olisi edullisempaa, että näytteet analysoidaan erikseen, mikäli heikosti positiivisten -tulosten löytymisen katsotaan olevan hyödyksi. Yksittäisten näytteiden erikseen tutkimista on kuitenkin tutkittava lisää, jotta saadaan parempi kuva kokonaiskustannuksista ja tämän menettelyn tehokkuudesta. Näytteiden yksittäin tutkiminen kuitenkin kasvattaisi todennäköisyyttä sille, että kaikki *Str. agalactiae* -bakteeria kantavat yksilöt saadaan tunnistettua karjasta. Kun kaikki bakteeria kantavat yksilöt saadaan tunnistettua, uudet tartunnat saadaan estettyä ja maitotilat voivat olla askeleen lähempänä *Str. agalactiae* -vapaata karjaa.

## LÄHTEET

- Blowey, R. & Edmondson, P. (2010). *Mastitis control in dairy herds* (2nd ed.). CABI.
- Hakala, M. (2004). *Maidon koostumus ja laatutekijät*. Seinäjoen ammattikorkeakoulu.
- Happonen, P., Holopainen, M., Sariola, H., Sotkas, P., Tenhunen, A., Tihtarinen-Ulmanen, M. & Venäläinen, J. (2012). *Bios: 5, Bioteknologia* (5. uud. p. 2012, 5.–7. p. 2013.). Sanoma Pro.
- Heikkilä, A.-M., Nousiainen, J., & Pyörälä, S. (2010). *Kallis utaretulehdus*. Suomen maataloustieteiden seuran tiedote (26) [Sähköinen tietoaaineisto]. Suomen maataloustieteellinen seura. <https://journal.fi/smst/article/view/75787/37169>
- Hiitiö, H. (2018). *Multiplex Real-Time PCR in Bovine Mastitis Diagnostics* (ACADEMIC DISSERTATION Academic dissetation) [Väitöskirja, Helsingin yliopisto]. Helsinki: University of Helsinki. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/237233/Multiple.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hiitiö, H., Autio, T. & Pyörälä, S. (2013). Miten tulkita utaretulehdustestin tuloksia? *Maito ja me*, 25(3), 40–42.
- Hokkanen, A-H. (27.9.2017). Utaretulehdusten aiheuttamaa kipua kannattaa hoitaa. *Maito ja me*. <https://www.maitojame.fi/artikkelit/utaretulehduksen-aiheuttamaa-kipua-kannattaa-hoitaa/>
- Jørgensen, H.J., Nordstoga, A.B., Sviland, S., Zadoks, R.N., Sølverød, L., Kvitle, B. & Mørk, T. (2016). *Streptococcus agalactiae in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks?* (Volume 184) [sähköinen tietoaaineisto]. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.014>.
- Kulkas, L. (1.12.2016). Streptococcus agalactiae. *Maito ja me*. <https://www.maitojame.fi/artikkelit/streptococcus-agalactiae/>
- Mikkola, H. (2006). *Kantaspesifisen kvantitatiivisen PCR-tunnistusmenetelmän kehittäminen Bifidobacterium longum 1/10 -bakteerille*. [julkaisematon Pro gradu -työ]. Helsingin yliopisto.
- Movet. (3.5.2022). *Utaretulehdus*. <https://www.movet.fi/tutkimukset/utaretulehdus-pcr-15-patogeenia-betalaktamaasigeeni/>
- Mustonen, S., Kämäräinen, H., Hartikainen, K. & Suhonen, P. (5.7.2010). *Nautojen tarttuvat taudit*. Savonia ammattikorkeakoulu. <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/342650/nautojentarttuvataudit.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Pärssinen, R., Suominen, I. & Haajanen, K. (2012). *Biogeeni: Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa*. Opetushallitus.

- Pasma, S. (2016). Nautojen utaretulehdusdiagnoosi PCR menetelmällä. [Lisensiaatin tutkielma, Helsingin yliopisto]. Helda. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/165824/Sanna%20Pasma.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Thermo Scientific. (2015a). *Protocol Book: Thermo Scientific PathoProof Complete-16 kit Instructions for Use* (PF1650/PF1600). <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D14910-02-PathoProof%20Complete-16%20IFU.pdf>
- Thermo Scientific. (2015b). *Protocol Book: Thermo Scientific PathoProof Major-4.2 kit Instructions for Use* (PF4250/PF0942). <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D14909-02-PathoProof%20Major-42%20IFU.pdf>
- Thermo Scientific. (2016). *Soft manual: Thermo Scientific PathoProof Norden Lab Studio Instructions for use* (PF0888A). <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D14911-02-PathoProof%20Norden%20Lab%20Studio%20IFU.pdf>
- Thermo Scientific. (2018). *PathoProof Norden Lab Studio: instructions of use* (Catalog Numbers PF0888A Publication Number D14911 Revision 4).
- Torppa, J. (2014). Utaretulehduksen hoito lypsykaudella: kirjallisuuskatsaus. [Lisensiaatin tutkielma, Helsingin yliopisto]. Helda. [https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/135559/Tutkielma\\_Torppa\\_Arvosteltava.pdf?sequence=1](https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/135559/Tutkielma_Torppa_Arvosteltava.pdf?sequence=1)
- Ulmanen, I., Tenhunen, J. & Yläne, J. (2014). *Biologia: Geeni ja biotekniikka* (6.–9. p.). Sanoma Pro

