

Taira Nurmela

Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän kehittäminen tuotekehityksen referenssimenetelmäksi patogeeniselle *Yersinia enterocolitica*

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

1.4.2016

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Taira Nurmela Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän kehittäminen tuotekehityksen referenssimenetelmäksi patogeeniselle <i>Yersinia enterocolitica</i> 46 sivua + 6 liitettä 13.4.2016
Tutkinto	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Laboratorioasiantuntija Jenna Flinck Ohjelmanvetäjä (NAT) Minna Mäki Lehtori Tiina Soininen
<p><i>Yersinia enterocolitica</i> on jääkaappiolosuhteissa viihtyvä, elintarvikeperäisten gastroenteriitien kolmanneksi yleisin taudinaiheuttaja koko Euroopassa. <i>Yersinioiden</i> aiheuttaman, jopa kaksi viikkoa kestävä, yersinioosiksi kutsutun suolistoinfektion oireisiin kuuluvat kuume, kovat vatsakivut ja ripuli. <i>Y. enterocolitica</i> tunnistetaan kliinisistä ulostenäytteistä viljelemällä tai PCR-menetelmällä, mutta sen haastava viljeltävyys, apatogeenisten kantojen antamat väärät positiiviset viljetytulokset ja plasmidikato voivat johtaa virheelliseen diagnoosiin.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitysosastolle uuden testimenetelmän kehittämisen avuksi referenssimenetelmä <i>Y. enterocolitica</i> bakteerin tunnistamiseen. Tavoitteena oli saada kaupallisen referenssimenetelmän rinnalle kahdesta kolmeen eri virulenssigeeneille suunniteltua PCR-menetelmää, joilla patogeeniset kannat voitaisiin tunnistaa spesifisesti.</p> <p>Työtä varten tehtiin kirjallisuuskatsaus, jonka pohjalta lähdettiin testaamaan useita valmiita <i>Yersinioille</i> suunniteltuja PCR-menetelmiä. Kun tarpeeksi spesifiseen ja herkkään tulokseen ei näillä menetelmillä päästy, alettiin tarvetta vastaavaa menetelmää suunnittelemaan itse.</p> <p>Reaaliaikaisen qPCR-referenssimenetelmän kehittäminen aloitettiin suunnitteleamalla alukkeet patogeenisille <i>Y. enterocolitica</i>-bakteerikannoille spesifiselle <i>ail</i>-geenialueelle. Suunniteltuja alukkeita testattiin ja sopivimmat valittiin mukaan menetelmän optimointiin. Optimoitulle menetelmälle tehtiin kantakattavuus- ja ristireaktiotestit, joissa pyrittiin viitteellisesti arvioimaan testin spesifisyyttä ja herkkyyttä. Lopuksi menetelmää testattiin vielä kliinisillä ulostenäytteillä.</p> <p>Opinnäytetyön kokeellisen osuuden aikana onnistuttiin kehittämään patogeenisten <i>Y. enterocolitica</i>-kantojen tunnistamiseen sopiva herkät, reaaliaikainen qPCR-menetelmä. Koska käytössä ei ollut yhtään <i>Yersinia</i>-positiiviseksi todettua kliinistä ulostenäytettä, ei menetelmän toimivuutta kliinisten näytteiden osalta voitu varmistaa. Kliinisiä ulostenäytteitä testattaessa kahdeksan näytteen kohdalla kuitenkin ilmeni epäspesifistä monistumista, minkä osalta selvitystyötä on vielä jatkettava. Näytteenottomuodon havaittiin saattavan vaikuttaa sekä kehitetyllä menetelmällä saataviin tuloksiin että referenssimenetelmän kehityksessä käytetyn kaupallisen referenssimenetelmän antamiin tuloksiin.</p>	
Avainsanat	<i>Yersinia enterocolitica</i> , yersinioosi, PCR-diagnostiikka

Author Title	Taira Nurmela Development of Real-Time qPCR Based Reference Method for Detection of Pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i> in Research and Development Laboratory
Number of Pages Date	46 pages + 6 appendices 1.4.2016
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jenna Flinck, Laboratory Specialist Minna Mäki, Program Leader (NAT), R&D Tiina Soininen, Senior lecturer
<p><i>Yersinia enterocolitica</i> is an enteropathogenic bacteria which thrives in refrigerator temperatures and is the third most common cause of food borne infections. It causes an intestinal infection called yersiniosis, which can last up to two weeks. To the symptoms belong fever, strong abdominal pain and diarrhea. <i>Y. enterocolitica</i> is commonly detected from fecal samples by culturing methods or by PCR methods. Different challenges in culturing methods, like plasmid loss and appearance of non-pathogenic strains, may lead to misdiagnosis.</p> <p>This thesis was conducted at the Research and Development Department of Orion Diagnostica Oy. The purpose of this thesis was to setup two or three reference PCR methods for detection of pathogenic <i>Y. enterocolitica</i>. The aim was to find sensitive and specific PCR methods that could detect different virulence genes of pathogenic strains. Several PCR assays from the literature were tested, and when none of the tested assays were sensitive or specific enough, an assay was designed.</p> <p>The development of a PCR-based reference method was initiated by designing of the primers for the <i>ail</i>-gene, which is specific for pathogenic bacterial strains of <i>Y. enterocolitica</i>. The primers were tested and the most suitable primers were chosen for optimization of the Real-Time qPCR. The optimized method was tested for strain coverage and cross reactivity, which were used to estimate the specificity and sensitivity of the method. Last the method was tested with clinical fecal samples.</p> <p>During the experimental part of this thesis, a sensitive Real-Time qPCR method for detection of pathogenic <i>Y. enterocolitica</i> was developed. Because no <i>Yersinia</i>-positive samples were available, the effectiveness of the approach in clinical samples couldn't be proven. Eight clinical fecal samples showed unspecific amplification, in which more research work must be done. Also while testing clinical fecal samples, it was noticed that sampling methods could have an effect on the results and reproducibility of the reference methods, used in the product development.</p>	
Keywords	<i>Yersinia enterocolitica</i> , yersiniosis, PCR based diagnostic methods, Real-Time qPCR

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	<i>Yersinia enterocolitica</i> esiintyvyys ja taksonomia	1
3	<i>Y.enterocolitica</i> taudinaiheuttajana	2
4	Reaaliaikainen qPCR-tekniikka diagnostiikan välineenä	6
5	<i>Y.enterocolitica</i> tunnistamiseen käytettyjä PCR-menetelmiä kirjallisuudesta	7
6	Työn toteutus	9
6.1	Koejärjestelyt	9
6.2	Kirjallisuudesta testattavaksi valitut PCR-menetelmät	12
6.3	Alukkeiden suunnittelu ja testaus referenssi-PCR-menetelmää varten	16
6.4	Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän I suunnittelu, optimointi ja testaus	18
6.5	Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän II suunnittelu ja testaus	21
7	Tulokset ja tulosten tarkastelu	22
7.1	Kirjallisuudesta testatut PCR-menetelmät	22
7.2	Referenssimenetelmää varten suunniteltujen alukkeiden testaus	24
7.3	Reaaliaikainen qPCR-menetelmä I	28
7.4	Reaaliaikainen qPCR-menetelmä II	39
7.5	Tulosityhteen veto	40
8	Päätelmät	43
	Lähteet	44

Liitteet

Liite 1. Kirjallisuudesta testatut PCR-menetelmät

Liite 2. Suunniteltujen alukkeiden testaus

Liite 3. Magnesiumkonsentraation optimointi

Liite 4. Ristireaktioiden testaus

Liite 5. Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän testaaminen kliinisillä näytteillä

Lyhenteet

<i>Ail</i>	Attachment invasion locus. <i>Yersinia enterocolitica</i> virulenssigeeni.
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumialbumiini. Käytetään PCR-reaktiossa apuaineena.
DMSO	Dimetyylisulfoksidi. Käytetään PCR-reaktiossa apuaineena.
gDNA	Genominen DNA
<i>Inv</i>	Invasin. <i>Yersinioiden</i> virulenssigeeni.
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	No template control. PCR-reaktiossa käytettävä negatiivinen kontrollinäyte
pYV	Plasmid for <i>Yersinia</i> virulence, <i>Yersinian</i> virulenssiplasmidi.
RFU	Relative fluorescence unit. RFU on yksikkö joka korreloi fluoresenssin suhteelliseen määrään monistuneen nukleiinihapon määrää PCR-reaktiossa.
TMAC	Tetrametyyliammoniumkloridi. Käytetään PCR-reaktiossa apuaineena.
TSA	Tryptikaasi-soija-agar
TSA II™	Lampaanveriagar
<i>VirF</i>	<i>Yersinioiden</i> virulenssigeeni <i>VirF</i>
<i>YadA</i>	<i>Yersinia</i> adhesin A. <i>Y. enterocolitica</i> virulenssigeeni.
<i>Yops</i>	<i>Yersinia</i> outer proteins. <i>Yersinioiden</i> virulenssigeeni.
<i>Ysc</i>	<i>Yop</i> secretion. <i>Yersinioiden</i> virulenssigeeni.
YST	<i>Yersinia</i> heat-stabile enterotoxin. <i>Yersinian</i> tuottama, <i>ystA</i> -, <i>ystB</i> - sekä <i>ystC</i> -geenialueiden koodaama enterotoksiini.

1 Johdanto

Yersinia enterocolitica on jääkaappiolosuhteissa viihtyvä, elintarvikeperäisten gastroenteriittien kolmanneksi yleisin taudinaiheuttaja koko Euroopassa. *Yersinioiden* aiheuttaman, jopa kaksi viikkoa kestävä yersinioosiksi kutsutun suolistoinfektion oireisiin kuuluvat kuume, kovat vatsakivut ja ripuli. Usein tauti menee ohi itsestään, mutta esimerkiksi vanhusten kohdalla ja kroonisessa infektiossa diagnostiikan merkitys korostuu. *Y. enterocolitica* tunnistetaan kliinisistä ulostenäytteistä viljelemällä tai PCR-menetelmillä, mutta sen haastava viljeltävyys, apatogeenisten kantojen antamat väärät positiiviset viljelytulokset ja plasmidikato voivat johtaa virheelliseen diagnoosiin.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli pystyttää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitysosastolle referenssimenetelmä patogeenisen *Y. enterocolitica*-bakteerin tunnistamiseen. Ensimmäisenä tavoitteena oli etsiä kirjallisuudesta kahdesta kolmeen toimivaa PCR-menetelmää, joita voitaisiin käyttää referenssimenetelminä tuotekehityksessä. Toisena tavoitteena oli kehittää tarkoitukseen soveltuva PCR-menetelmä itse. Kehitettävää referenssimenetelmää optimoitaessa haluttiin viitteellisesti tarkkailla menetelmään liittyviä parametrejä, kuten selektiivisyyttä, spesifisyyttä, toistettavuutta ja toteamisrajaa.

2 *Yersinia enterocolitican* esiintyvyys ja taksonomia

Yersiniat ovat enterobakteereihin kuuluvia gram-negatiivisia sauvabakteereita, joita tunnetaan 17 eri lajia. Näistä lajeista kolme on ihmiselle patogeenisiä; gastroenteriittiä aiheuttavat *Yersinia enterocolitica* ja *Yersinia pseudotuberculosis*, sekä paiseruton aiheuttajana tunnettu *Yersinia pestis*. [1, s. 18.] *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttivat pelkästään EU:n jäsenvaltioissa yersinioosiksi kutsuttua gastroenteriittiä 9 662 tapausta vuonna 2005. Näistä noin 90 %:n arvioitiin olevan *Y. enterocolitican* aiheuttamia. [2, s. 18–19]. Vuonna 2013 Suomessa ilmoitettiin tartuntatautirekisteriin 497 *Y. enterocolitica*-tapausta [3]. Vuonna 2012 löydöksiä rekisteröitiin saman verran, mutta tyyppitystulos ilmoitettiin vain noin 200 tapauksen kohdalla. Näistä lähes 70 % kuului biotyyppiin 1A, joita pidetään apatogeenisinä. Tyyppitysten alhaisesta määrästä johtuen todellisten yersinioositapausten määrästä ei ole varmuutta [4].

Y. enterocolitica-kannat jaotellaan metaboliaan perustuen kuuteen eri biotyypiin (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) sekä lukuisiin eri O-serotyyppeihin (> 57) O-antigeeninsä mukaisesti (taulukko 1). Näistä biotyypit 1B sekä 2–5 luokitellaan patogeenisiksi, kun taas 1A-biotyyppin kantoja on pidetty harmittomina. 1A-biotyyppin kliininen merkitys kuitenkin on noussut joidenkin kantojen osalta kiistanalaiseksi. [1, s. 18–20.]

Yleisimmin taudinaiheuttajana Euroopassa ovat bioserotyypit 4/O:3 ja 2/O:9, kun taas biotyyppejä 3, 5 ja 1B tavataan harvoin. Biotyypeistä patogeenisintä 1B-tyyppiä tavataan lähinnä Pohjois-Amerikassa ja Japanissa. [5, s. 8–9.]

Taulukko 1. *Yersinia enterocolitica*-kantojen serotyypit biotyypeittäin [1, s. 19].

Biotyyppi	Serotyyppi
1A	O:4; O:5; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:7,13; O:10; O:14; O:16; O:21; O:22; O:25; O:37; O:41,42; O:46; O:47; O:57
1B	O:4,32; O:8; O:13a; O:13b; O:16; O:18; O:20; O:21; O:25; O:41,42
2	O:5,27; O:9; O:27
3	O:1,2,3; O:3; O:5,27
4	O:3
5	O:2,3

3 *Y. enterocolitica* taudinaiheuttajana

Yersinioosi

Y. enterocolitica on elintarvikeperäisten gastroenteriittien kolmanneksi yleisin aiheuttaja *Kampylobakteerin* ja *Salmonellan* jälkeen koko Euroopassa [1, s. 23]. Zoonoottisen *Yersinian* aiheuttaman yersinioosiksi kutsutun suolistoinfektion oireisiin kuuluvat kuume, kovat vatsakivut ja ripuli. Joka kolmannella on pahoinvointia ja oksentelua. [2.] Taudin itämisaika on yleensä neljästä kuuteen vuorokautta ja taudin kesto muutamasta päivästä jopa kahteen viikkoon [1, s. 23; 3]. Yleensä oireet häviävät itsestään, mutta korkeakuumeinen infektio voi vaatia antibioottihoidon [2].

Yersinioosin jälkitautina esiintyy 30 %:lla kyhmyruusua ja 15 %:lla niveltulehdusta, joka pahimmillaan muuttuu krooniseksi. Niveltulehduksen yhteydessä myös sydänlihastulehdusta, silmän värikalvontulehdusta ja virtsatieinfektioita esiintyy. [2.]

Yersinioosiepidemioiden lähde on lähes aina *Y.pseudotuberculosis*, jolloin tapauksia ilmaantuu keskitetysti useita. *Y.enterocolitican* aiheuttamia yersiniooseja kuitenkin esiintyy *Y. pseudotuberculosisin* aiheuttamiin tapauksiin verrattuna huomattavasti enemmän, vaikka sairastumiset ovatkin useimmiten yksittäisiä. Suurin osa *Yersinioiden* aiheuttamista sairaustapauksista on satunnaisia, eikä ilmeistä lähdettä löydy. Jäljitetyistä tartuntalähteistä yleisin näyttäisi olevan tuotantovaiheessa kontaminoituneet sianlihavalmistet ja siipikarja, sekä salaattit, vihannekset ja vesi. [6, s. 45–53.]

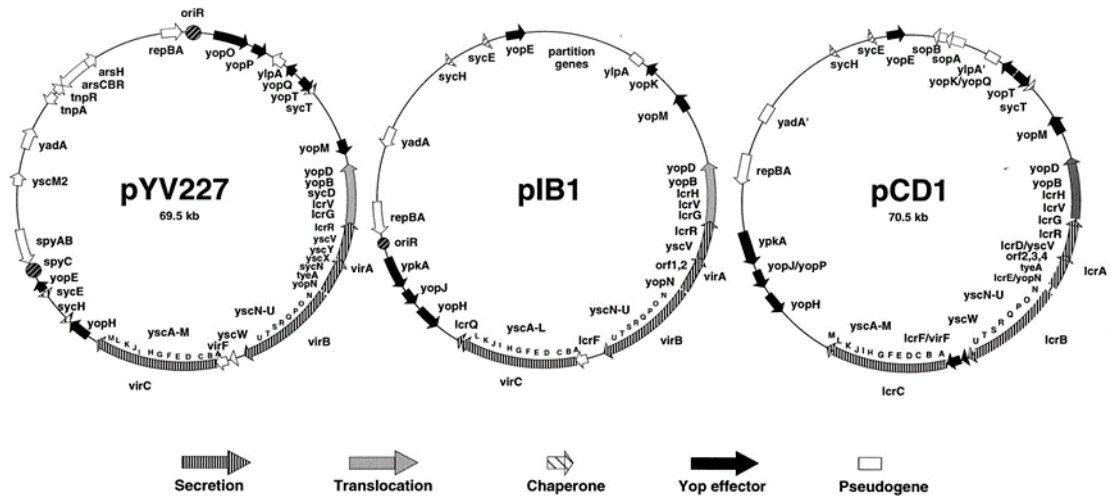
Kasvuolosuhteet

Fakultatiivisesti anaerobiset *Yersiniat* voivat kasvaa sekä hapettomissa että hapellisissa olosuhteissa. *Y.enterocolitican* kasvulämpötila vaihtelee 4–42 °C:n välillä, optimilämpötilan ollessa 28 °C. *Yersiniat* voivat kasvaa ympäristön pH:n ollessa 4,0–10,0, ja ne kestävät jopa 5 %:n natriumkloridikonsentraation. Optimaalisin pH kasvuympäristölle on 7,2–7,4. [6, s. 25.]

Virulenssitekijät

Y.enterocoliticalla tiedetään olevan useita virulenssitekijöitä. Virulenssitekijöitä on sekä kromosomaalisessa DNA:ssa että virulenssiplasmidissa. Osa plasmidin kantamista virulenssitekijöistä, kuten YadA ja VirF, aktivoituvat vasta 37 °C:n lämpötilassa. [7, s. 317–326.]

Kooltaan noin 70 kb oleva virulenssiplasmidi pYV (*Yersinia* virulence plasmid) on patogeenisyyden kannalta *Yersinioille* välttämätön. *Y.enterocoliticalla* ja *Y.pseudotuberculosisilla* virulenssiplasmidit ovat hyvin samankaltaisia, ja yhteisiä virulenssitekijöitä löytyy myös *Y.pestiksen* kanssa (kuva 1). Plasmidi koodaa esimerkiksi tyypin III eritysjärjestelmää (T3SS) sekä membraaniproteiini YadA:ta. T3SS on usealle patogeeniselle gram-negatiiviselle sauvabakteerille ominainen, neulamainen tunkeutumisympäristö, jonka avulla bakteeri infektoi isäntäorganismien soluun translokaattoreiden muodostamaa kanavaa pitkin efektoriproteiineiksi kutsuttuja taudinaiheuttajatekijöitä. *Yersinioiden* tuottamat efektoriproteiinit muun muassa häiritsevät makrofagien fagosytoosia ja aiheuttavat makrofagien apoptoosia. T3SS koodataan pYV-plasmidissa sekreetioalueella, johon kuuluu yhteensä 29 Ysc-geeniä. [6, s. 33–34.]



Kuva 1. Virulenssiplasmidit pYV227 (*Y. enterocolitica*, W227), pIB1 (*Y. pseudotuberculosis* YPIII) sekä pCD1 (*Y. pestis*). Kaikki plasmideissa sijaitsevat geenit eivät ole näkyvillä kuvassa. [8.]

Virulenssiplasmidissa sijaitseva *virF*-geeni (*Y. pestis*kä *lcrF*) on transkriptaalinen aktivaattori, joka kontrolloi efektoriproteiineja koodaavien *Yop*-geenien transkriptiota [9, s. 14–15]. Translokaattoreita koodaavat *YopB*, *YopD* ja *LcrV*. *YadA* (*Yersinia* adhesin A) koodaa samaa nimeä kantavaa adhesiivista ja invasiivista membraaniproteiinia, joka auttaa *Yersinia*a kolonisoitumaan ympäristöön, sekä toimii oleellisena tekijänä komplementtista immuunipuolustusta vastaan. Toisin kuin *Y. enterocolitica*lle, *YadA* vaikuttaisi olevan *Y. pseudotuberculosis*lle virulenssin kannalta merkityksetön. *Y. pestis*kä geeni on inaktiivinen. [6, s. 33–34.]

*Y. enterocolitica*n tärkeimmät kromosomaaliset virulenssigeenit ovat *ail*, *Inv* ja *ystA* [9, s. 25]. *Ail* ja *Inv* ovat molemmat invasiogeenejä. Patogeenisille *Y. enterocolitica*-kannoille spesifinen *ail* koodaa pintaproteiinia, joka vastaa bakteerin kiinnittymisestä solun pintaan. *Inv* puolestaan koodaa membraaniproteiineja, jotka ovat merkittävässä osassa mikrobin tunkeutuessa isäntäorganismiin. Toisin kuin *ail*, *Inv*-geeni on ominainen myös apatogeenisille *Y. enterocolitica*-kannoille, *Y. pseudotuberculosis*lle sekä *Y. pestis*lle. [10.]

YST (*Yersinia* stable toxin) on *Yersinioiden* tuottama toksiiini, jota koodaavat *ystA*-, *ystB*- ja *ystC*-geenit. *YstA* on patogeenisille *Y. enterocolitica*-kannoille spesifinen geeni, joka aktivoi toksiiinin tuotannon 37 °C:n lämpötilassa pH:n ollessa 7,5, jolloin olosuhteet ovat samat kuin ihmisellä ohutsuolessa. *YstB* on spesifinen apatogeenisille kannoille, joiden

toksiinintuotanto harvoin on aktiivinen yli 28 °C:ssa. [11.] Myös *ystC* on löydetty ainoastaan apatogeenisiltä kannoilta [12].

Y. enterocolitica tunnistaminen

Epäilty yersinioosi voidaan tunnistaa ihmisellä joko uloste- tai seeruminäytteestä. Ulostenäytteestä patogeeninen *Yersinia* voidaan todeta selektiivisen viljelyn ja rikastusviljelyn avulla, sekä PCR-menetelmällä. [13; 14.] Postinfektiivistä taudinkuvaa epäiltäessä on ensisijainen diagnostinen tutkimusmenetelmä seerumista tehtävä vasta-ainemääritys. Serologisessa bakteeriagglutinaatiotestissä vasta-aineiden määrää mitataan käyttämällä *Y. enterocolitica* O:3 ja O:9, sekä *Y. pseudotuberculosis* O:1a ja O:3 serotyypin antigeenejä. Entsyymi-immunologisessa testissä antigeeninä on virulenssiplasmidi. [13; 15.]

Yersinioiden tunnistamiseen elintarvikenäytteistä ja kliinisistä näytteistä on kehitetty useita PCR-menetelmiä, joissa kohdegeeninä on käytetty kromosomaalisia ja virulenssiplasmidissa sijaitsevia virulenssigeenejä [9; 12; 16]. Tarjolla on myös valmiita PCR-reagenssipakkauksia, kuten R-Biopharm Rida® Gene Bacterial Stool Panel, joka on tarkoitettu *Y. enterocolitica*, *Salmonellan* ja *Kampylobakteerin* detektoimiseen kliinisistä näytteistä [17]. Qiagen puolestaan tarjoaa *mericon Y. enterocolitica* Kit -reagenssipakkausta elintarvikeperäisten *Yersinioiden* detektoimiseen [18].

Patogeenisten *Yersinioiden* todentamista hankaloittaa merkittävästi bakteereissa tapahtuva, *Yersinioille* tyypillinen plasmidikato, jota alkaa esiintyä inkubointilämpötilan ylittäessä 30 °C. Vaikka plasmidikatoa ei kliinisillä näytteillä juurikaan ole tutkittu, on kuitenkin selvää, että plasmidit näyttävät häviävän optimaalisissakin kasvuolosuhteissa. [19.] Lämpötilan lisäksi myös selektiivisten kasvualustojen ja rikastuksen sekä kalsiumpitoisuuden epäillään voivan myötävaikuttaa plasmidien häviämiseen, mutta tästä ei ole tarjolla luotettavaa dataa [20]. Useassa tutkimuksessa todetaankin, ettei plasmidin virulenssigeenien todentamisen tulisi olla ainut menetelmä patogeenisten *Yersinioiden* tunnistamiseksi [9; 12; 16].

4 Reaaliaikainen qPCR-tekniikka diagnostiikan välineenä

Reaaliaikainen qPCR-tekniikka diagnostiikassa

Reaaliaikaista qPCR-tekniikkaa (Real-time qPCR) hyödynnetään monipuolisesti eri tutkimusaloilla, kuten mikrobiologiassa, geenitekniikassa, bioteknologiassa, farmakologiassa ja toksikologiassa [21]. Menetelmää on kehitelty viime vuosien aikana laajalti myös erilaisiin diagnostisiin käyttötarkoituksiin, kuten bakteeri-infektioiden aiheuttajien tunnistamiseen, johon tämä herkkä ja nopea menetelmä soveltuu hyvin. Testin kehittäminen halutulle bakteerille on mahdollista, kun sille spesifiset geenialueet ja niiden sekvenssit tunnetaan. Näille alueille suunniteltujen alukkeiden avulla kohde-DNA:n monistaminen on mahdollista jo muutamasta kopiosta, jolloin myös hankalasti viljeltävien bakteereiden tunnistaminen näytteistä onnistuu. [22.]

Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän optimointi

Reaaliaikainen qPCR-menetelmä koostuu ajo-ohjelmasta ja reaktioseoksesta. Reaktioseoksen peruskomponentit ovat templaatti, alukkeet, puskuri, polymeerasientsyymi, dNTP, magnesium sekä fluoresoiva väriaine tai koetin, eli probe. Peruskomponenttien konsentraatiot riippuvat käytetystä entsyymistä, alukkeista sekä templaattista tai monistettavasta tuotteesta. Reaktioon voidaan myös lisätä erilaisia apuaineita, joita käytetään reaktion optimoinnissa silloin, kun peruskomponenttien optimointi ei riitä saavuttamaan haluttua tulosta. [23.]

Apuaineiden avulla voidaan vaikuttaa muun muassa reaktion herkkyYTEEN ja spesifisyyteen. Glyseroli, formamidi, dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja betaiini (*N,N,N*-trimethylglycine) ovat reagensseja, joiden avulla voidaan laskea GC-rikkaan aluke-templaattihybridisaation sulamislämpötilaa ja vaikuttaa kompleksisen templaatin sekundäärirakenteisiin. Korkea GC-pitoisuus lisää DNA:n sekundäärirakenteiden stabiiliutta ja nostaa sen sulamislämpötilaa. DMSO häiritsee DNA:n emäspariutumista, kun taas betaiini estää DNA:n sekundäärirakenteiden muodostumista tasoittamalla stabiiliuseroja GC- ja AT-sidosten välillä. DMSO:n sekä betaiinin kanssa voidaan käyttää tetrametyyliammoniumkloridia (TMAC) eliminoimaan alukkeiden epäspesifistä sitoutumista ja nostamaan niiden sulamislämpötilaa. DMSO:ta käyttäessä tulee huomioida sen inhiboiva vaikutus Taq-polymeraasientsyymiin entsyymiaktiivisuuteen. Naudan seerumialbumiini (BSA) ja gelatiini puolestaan tehostavat reaktiota stabiloimalla Taq-polymeraasientsyymiin toimintaa ja

voivat olla hyödyllisiä, mikäli reaktiossa on mukana DMSO:ta tai muita reaktiota inhiboivia tekijöitä, kuten melaniinia. Sopivaa apuainetta tai niiden kombinaatiota ja optimoituisuutta reaktiossa on vaikea määrittää etukäteen, joten optimointi on tehtävä kokeellisesti. [23; 24.]

PCR-reaktio ajetaan olosuhteissa, jotka määräytyvät PCR-reaktityypin lisäksi käytettävän entsyymin, templaatin ja alukkeiden mukaan. Sulamispisteanalyysi ajetaan reaaliaikaisen (q)PCR-ajon lopuksi, kun halutaan varmistaa monistuneen tuotteen spesifisyys. [25, s. 47.] Tämä on tärkeää erityisesti silloin, kun detektiokemiana käytetään kaikkiin nukleiinihappojuosteisiin sitoutuvaa väriainetta, kuten SYBR®Green tai EvaGreen® [21]. Sulamispisteanalyysissä lämpötilaa nostetaan asteittain (tässä työssä 65 °C:sta 95 °C:seen), jonka aikana DNA denaturoituu. DNA:n denaturoituessa fluoresenssin äkillinen lasku nähdään sulamiskäyrässä piikkinä. Monistustuotteen sulamispiste riippuu amplikonin pituudesta, nukleotidisekvenssistä ja kolmiulotteisesta rakenteesta, jolloin tuote voidaan sulamispisteensä perusteella erottaa epäspesifisestä monistumisesta, kuten alukedimeereistä. Toisinaan voimakas alukedimeereiden muodostuminen voidaan todeta myös negatiivisesta kontrollinäytteestä (NTC). [25, s. 47.] Myös reaktio-olosuhteet vaativat usein optimointia [26, s. 163–164].

5 *Y. enterocolitica* tunnistamiseen käytettyjä PCR-menetelmiä kirjallisuudesta

Opinnäytetyötä varten kirjallisuudesta etsittiin *Y. enterocolitica* tunnistamiseen suunniteltuja PCR-menetelmiä. Antikaisen ym. julkaisemassa artikkelissa “Quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea” esiteltiin kolme eri monikohde-qPCR-menetelmää, joista yksi oli suunniteltu patogeenisille *Yersinioille*, kahdelle eri *kampylobakteerille* (*C. jejuni*, *C. coli*) sekä kahdelle eri *E. coli*-kannalle (ETEC, EAEC). Patogeenisten *Yersinioiden* tunnistamiseen käytettävät alukkeet oli suunniteltu plasmidissa sijaitsevalle *virF*-geenille (taulukko 2). Artikkelissa esitetyssä qPCR-menetelmässä reagenssiseoksena oli käytetty Qiagenin Multitect NoROX master mixiä, johon oli lisätty alukkeet, probet ja templaatti. [27.]

Taulukko 2. Kirjallisuuden menetelmissä käytetyt alukkeet

Julkaisija	Geeni	Alukkeet
Antikainen ym.	<i>virF</i>	GTTTGGTACAGTTTATGGCATTTCAC CATGGCAATATCAACAATACTCAT CTTAC
Thisted Lambertz ym.	<i>ail</i>	GTTTATCAATTGCGTCTGTTAATGTGTACG CTATCGAGTTTGGAGTATTCATATGAAGCG
	<i>virF</i>	AAGGTTGTTGAGCATTACAAAGATGG TTTGAGTGAAATAAGACTGACTCGAGAACC
	<i>yst</i>	AATGCTGTCTTCATTTGGAGC ATCCAATCACTACTGACTTC
Ye ym. (Thoerner ym.)	<i>ail</i>	TAATGTGTACGCTGCGAG GACGTCTTACTTGCACTG
	<i>virF/lcrF</i>	GGCAGAACAGCAGTCAGACATA GGTGAGCATAGAGAATACGTCG
Weynants ym. (Wren ym. Nakajima ym.)	<i>ail</i>	ACTCGATGATAACTGGGGAG CCCCCAGTAATCCATAAAGG
	<i>virF</i>	TCATGGCAGAACAGCAGTCAG ACTCATCTTACCATTAAGAAG

Thisted Lambertzin ym. julkaisemassa artikkelissa "Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis" monikohde-PCR-menetelmää käytettiin tutkimuksessa, jossa tutkittiin sekä kliinisiä ulostenäytteitä että raa'asta porsaanlihasta otettuja näytteitä. Monikohde-PCR-menetelmä oli suunniteltu kolmelle *Y. enterocolitica* virulenssigeenille (*ail*, *virF*, *yst*) (taulukko 2), sekä O:3 serotyypispesifiselle *rbcC*-geenille. *VirF*-geenin ollessa spesifinen kaikille patogeenisille *Yersinioille* menetelmällä on mahdollista tunnistaa myös *Y. pseudotuberculosis* sekä *Y. pestis*. Monikohde-PCR-menetelmällä *Yersinia*-positiivisen tuloksen antaneet näytteet analysoitiin pulssikenttägelelektroforeesin (PFGE) avulla. [28.]

Yen ym. julkaisemassa artikkelissa "Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridiza-

tion targeting the *virF* and *ail* genes” esiteltiin kehitetty kaksikohde-PCR-menetelmä patogeenisen *Y.enterocolitica* tunnistamiseen jäädytetyistä elintarvikkeista [29]. PCR-menetelmässä käytetyt *ail*- ja *virF*-geeneille suunnitellut alukkeet (taulukko 2) oli julkaistu aiemmin Thoernerin ym. julkaisemassa artikkelissa [16]. Kaksikohde-PCR-menetelmällä positiivisen tuloksen antaneet näytteet analysoitiin agaroosigeelielektroforeesilla (AGE) [29].

Weynantsin ym. julkaisemassa artikkelissa ”Detection of *Yersinia enterocolitica* Sero-group O:3 by a PCR Method” esiteltiin menetelmä, joka oli kehitetty *Y.enterocolitica* O:3 serotyypin tunnistamiseen. Monikohde-PCR-menetelmän O:3 serotyypispesifiset alukkeet oli suunniteltu *rfbB*- ja *rfbC*-geeneille. Lisäksi menetelmään kuului *Y.enterocolitica* spesifiset *ail*- ja *virF*-geeneille suunnitellut alukkeet (taulukko 2) sekä *Y.pseudotuberculosis* suunnitellut *inv*-alukkeet. [30.] *Ail*-, *virF*- ja *inv*-geeneille suunnitellut alukkeet oli julkaistu aiemmin Wrenin ym. ja Nakajiman ym. artikkeleissa [31; 32]. Artikkelissa esitetyt tulokset oli analysoitu agaroosigeelielektroforeesilla (AGE) [30].

6 Työn toteutus

6.1 Koejärjestelyt

Kaikki reaktiot tehtiin käyttämällä kahta rinnakkaisnäytettä, ja jokaisessa ajossa oli mukana vähintään kaksi negatiivista kontrollia reaktiotyyppiä kohden. Negatiivisena kontrollina käytettiin reaktiooseokseen lisättyä nukleaasivapaata vettä. Käytetyt alukkeet ja templaatit laimennettiin nukleaasivapaaseen veteen ja säilytettiin -20 °C:n lämpötilassa. PCR-ajot tehtiin Bio-Radin CFX96 C1000 ja CFX96 C1000 Touch sekä Applied Biosystems Viia7 Real-Time PCR-laitteilla.

Työssä käytetyt bakteerikannat ja DNA-näytteiden valmistaminen

Työssä käytettiin neljää *Y.enterocolitica*-kantaan sekä kolmea *Y.pseudotuberculosis*-kantaan (taulukko 3). Käytetyistä *Y.enterocolitica*-kannoista ATCC9610-kantaan on epäilty apatogeeniseksi, sillä siltä on havaittu puuttuvan patogeeniselle *Y.enterocolitica* välttämättömät *ail* ja *yadA* geenit [16]. Muut käytetyt *Y.enterocolitica*-kannat olivat patogeenisiä.

Taulukko 3. Opinnäytetyössä käytetyt *Yersinia*-bakteerikannat

Bakteeri	Kanta	Serotyyppi	Tunniste
<i>Y.enterocolitica</i>	6471/76	O:8	1A
<i>Y.enterocolitica</i>	6471/76	O:8	1B
<i>Y.enterocolitica</i>	8081	O:3	
<i>Y.enterocolitica</i>	Ruokola/71	O:9	
<i>Y.enterocolitica</i>	ATCC9610	O:8	
<i>Y.enterocolitica</i>	pyV8081 (plasmidi)		
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	PB1	O:1a	
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	YPIII/pIB1	O:3	
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	IP32953	O:1b	

Y.enterocolitica 647/71 (templaatti 1B) ja *Y.pseudotuberculosis* PB1 -kantojen DNA-näytteet valmistettiin kasvattamalla bakteerit pakastetuista puhdasviljelmistä ja eristämällä DNA QIAamp® DNA Mini -eristyskitillä (Qiagen). Kasvatusalustana käytettiin Brain-heart infusion agarua, ja kasvatusolosuhteet olivat aerobiset. *Y.enterocolitica* kasvatustilassa lämpötila oli 30 °C ja *Y.pseudotuberculosis* kasvatustilassa 37 °C. Kasvatusaika kummallakin kannalla oli 48 h. Muista *Yersinia*-kannoista oli käytettävissä Qiagen EZ1 Advanced XL -eristysrobotilla valmiiksi eristetyt DNA-näytteet.

Ristirektiioestauksissa käytetyt bakteerikannat on lueteltu taulukossa 4. *Salmonella*- ja *Clostridium*-bakteerikannoista oli käytettävissä valmiiksi eristetyt DNA-näytteet. Kaikki muut bakteerikannat kasvatettiin pakastetuista puhdasviljelmistä ja niiden DNA eristettiin käyttäen Qiagen EZ1 Advanced XL eristysrobotia. *Campylobacter coli* ja *Campylobacter jejuni* kasvatettiin TSA II™ -kasvatusalustoilla mikroaerofiilissä olosuhteissa 48 tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Shigella sonnei* kasvatettiin TSA-alustoilla aerobisissa olosuhteissa 37 °C:n lämpötilassa vuorokauden ajan.

Taulukko 4. Ristireaktioiden testauksissa käytetyt bakteerikannat

Bakteeri	Kanta	Tunniste
<i>Y.enterocolitica</i>	6471/76	1B
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 43473	
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 43429	
<i>Clostridium difficile</i>	FC 6450	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10798	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	

Kaikista eristetyistä DNA-näytteistä mitattiin DNA:n konsentraatio NanoDrop 2000 UV-Vis-spektrofotometrillä (Thermo Scientific). Plasmidien ja genomisen DNA:n kopiomäärät laimennossarjoja varten laskettiin URI (University of Rhode Island) Genomics and Sequencing Centerin kopiolukulaskurilla genomien kokojen mukaisesti. Laskukaava perustuu olettamukseen, että keskimääräisen emäsparin paino on 650 Daltonia, jolloin kaksijuosteisen DNA:n moolimassa on 650 g/mol. Kun genomien tai plasmidien koko tunnetaan, gDNA:n tai plasmidin kopioluku pystytään laskemaan Avogadron vakion avulla näytteen konsentraatiosta käyttämällä kaavaa $\text{kopioluku} = (\text{määrä}(\text{ng}) \times 6,022 \times 10^{23}) / (\text{koko}(\text{bp}) \times 1 \times 10^9 \times 650)$. Kopioluku ilmoitetaan tilavuusyksikköä (μl) kohti. [33]. Työn alkuvaiheessa käytössä oli inhimillisen virheen vuoksi *Y.enterocolitica* 6471/76 1A -templaatin plasmidikonsentraatio gDNA:n konsentraatioluvun sijaan, minkä johdosta menetelmiä testattiin alhaisemmilla templaattimäärillä kuin oli tarkoitus. Virheen selvittyä testauksissa saadut tulokset analysoitiin uudelleen ja osa kokeista päätettiin toistaa tulosten varmistamiseksi. *Y.enterocolitica* 6471/76-kannasta eristettiin toinen templaattina käytettävä DNA-näyte (1B), ja kokeet toistettiin sekä 1A- ja 1B-templaateilla. Näin pystyttiin toteamaan, ettei sattunut virhe ollut vaikuttanut merkittävästi saatuihin tuloksiin.

Kliiniset näytteet

Työtä varten testattiin 21 kliinistä ulostenäytettä, jotka oli kerätty Mehiläisessä 19 ripuloi-valta potilaalta 29.1 – 6.2.2015. Jokaiselta potilaalta oli otettu näyte näytteenottopurkkiin sekä geelitikulle. Kahden potilaan näytteistä testattiin molemmat, muiden potilaiden näytteistä vain toinen (taulukko 5). Kaikista näytteistä oli valmiiksi eristetty DNA Qiagenin EZ1 Advanced XL -eristysrobotilla.

Taulukko 5. Työssä käytetyt kliiniset näytteet oli otettu kultakin potilaalta kahdella eri näytteenottomenetelmällä. Testatut näytteet on esitetty taulukossa tummennettuina.

Geelitikki	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a	17a	18a	19a
Purkki	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b		11b	12b	13b	14b	15b	16b	17b	18b	19b

6.2 Kirjallisuudesta testattavaksi valitut PCR-menetelmät

qPCR-menetelmä *virF*-geenille

Antikaisen ym. julkaisemassa artikkelissa esitettyä monikohde-qPCR-menetelmää [27] testattiin mukailusti siten, että reagenssiseoksena käytettiin Multitect NoROX master mixin (Qiagen) -reagenssin sijaan samaa polymeerasientsyymiä sisältävää HotStarTaq master mixiä (Qiagen), alukkeina käytettiin ainoastaan *virF*-geenille suunniteltuja alukkeita ja detektiokemiana SYBR®Greeniä. Koetinta ei käytetty ollenkaan.

Reaktioseos valmistettiin taulukon 6 mukaisesti 20 µl:n reaktiilavuuteen. PCR-ajo-ohjelma on artikkelin mukainen, lukuun ottamatta ajon loppuun lisättyä sulamispisteanalyysiä (taulukko 6). Käytetyt templaattilaimennossarjat olivat 100 000, 10 000, 1000 ja 100 kopiota. Templaatteina käytettiin *Y.enterocolitica* 6471/76 -kantaa (templaatti 1B), *Y.pseudotuberculosis* PB1 ja YPIII/pIB1 -kantoja sekä templaattia, joka sisälsi ainoastaan *Y.enterocolitica* puhdistettua plasmidia (pYV8081).

Taulukko 6. Antikaisen ym. suunnittelemaa qPCR-menetelmää mukailevan qPCR-menetelmän reagenssien loppukonsentraatiot ja ajo-ohjelma

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet	0,2 µM
HotStarTaq Master Mix	1x
SYBR®Green	0,1x

Lämpötila C°	Aika	Syklit
95	15 min	x1
94	60 s	
60	60 s	x40
95	60s	x1
65 to 95	0,5 C / 5s	x1

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*-, *yst*- ja *virF*-geeneille

Thisted Lambertzin ym. julkaisemassa artikkelissa käytettyä, patogeenisten *Y. enterocolitica*-kantojen tunnistamiseen suunniteltua monikohde-PCR-menetelmää testattiin alkuperäistä menetelmää mukaillen [28]. Menetelmää testattiin reaaliaikaisena PCR-menetelmänä lisäämällä reaktioon fluoresoivaksi leimaksi SYBR®Green. Alukkeina käytettiin *ail*-, *virF*- ja *yst*-virulenssigeeneille suunniteltuja alukkeita ja ne testattiin sekä yhdessä että erikseen. Templaattina käytettiin *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) -kanta, jonka laimennossarjan plasmidikonsentraatiot olivat 100 000, 10 000, 1000 ja 100 kopiota, ja gDNA konsentraatiot 5 000, 500, 50 ja 5 kopiota. Reaaliaikaisen PCR-menetelmän ajo-ohjelma ja reagenssien loppukonsentraatiot erillisissä reaktioissa sekä monikohdereaktiossa on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Thisted Lambertzin ym. julkaisussa esitetystä PCR-menetelmästä mukaillun reaaliaikaisen PCR-menetelmän reagenssien loppukonsentraatiot (reaktiotilavuus 40 µl) ja ajo-ohjelma

Reagenssi	Loppukonsentraatio (yksittäiset reaktiot)	Loppukonsentraatio (monikohdereaktio)
Alukkeet		
yst	0,2 µM	5 pmol
ail	0,2 µM	10 pmol
virF	0,2 µM	15 pmol
AmpliTaq® (Thermo Fisher)	1 U	1 U
10x Buffer II (Thermo Fisher)	1x	1x
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
dNTP mix (10 mM)	0,2	0,2
SYBR®Green	0,1x	0,1x

Lämpötila C°	Aika	Syklit
94	3 min	x1
94	30 s	
60	60 s	x30
72	60 s	
72	5 min	x1
65 to 95	0,5 C / 5s	x1

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*- ja *virF*-geeneille

Testattu reaaliaikainen PCR-menetelmä perustui Yen ym. artikkelissa julkaistuun kaksikohde-PCR-menetelmään [29]. Testatussa menetelmässä reaktioon lisättiin fluoresoivaksi leimaksi SYBR®Green. Alukkeina käytettiin artikkelissa esitettyjä, *ail*- ja *virF*-geeneille suunniteltuja alukkeita, jotka testattiin artikkelista poiketen erikseen. Templaattina käytettiin *Y.enterocolitica* 6471/76 (1A) ja Ruokola/71 -kannoista valmistettuja laimennossarjoja, joissa plasmidikonsentraatiot olivat 10 000, 1000, 100 ja 10 kopiota ja gDNA:n konsentraatiot 500, 50, 5 kopiota. Reaktiot valmistettiin taulukon 8 mukaisesti. Koe toistettiin vielä käyttämällä annealing-lämpötilagradienttia 58 - 64 °C. Muut reaktioolosuhteet pysyivät muuttumattomana

Taulukko 8. Yen ym. suunnittelemaan PCR-menetelmään perustuvan reaaliaikaisen PCR-menetelmän reagenssien loppukonsentraatiot (reaktiotilavuus 25 µl) ja ajo-ohjelma

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet	0,4 µM
10x Buffer (NEB)	1x
Taq DNA Polymerase (NEB)	2 U
dNTP mix	0,2 mM
SYBR®Green	1x

Lämpötila C°	Aika	Syklit
95	2 min	x1
94	60 s	
58	45 s	x35
72	60 s	
72	7 min	x1
65 to 95	0,5 C / 5 s	x1

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*- ja *virF*-geeneille (II)

Weynantsin ym. julkaisemaa monikohde-PCR-menetelmää [30] testattiin alkuperäistä menetelmää mukaillen reaaliaikaisena PCR-menetelmänä. Alukkeina käytettiin artikkeleissa esitettyjä *ail*- ja *virF*-geeneille suunniteltuja alukkeita ja ne testattiin erillisissä reaktioissa. Templaattina käytettiin *Y.enterocolitica* 6471/76 (1A) -kantaa sekä *Y.pseudotuberculosis* PB1 -kantaa laimennossarjojen. Laimennossarjojen plasmidikonsentraatiot olivat 10 000, 1000, 100 ja 10 kopiota ja gDNA:n konsentraatiot 500, 50 ja 5 kopiota. Reaaliaikaisen PCR-reaktion ajo-ohjelma ja reagenssien loppukonsentraatiot on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Weynantsin ym. julkaisemasta PCR-menetelmästä mukailun reaaliaikaisen PCR-menetelmän reagenssien loppukonsentraatiot (reaktiotilavuus 25 µl) ja ajo-ohjelma

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet <i>ail</i> / <i>virF</i>	0,2 µM / 0,4 µM
DyNAzyme II DNA polymerase	0,5 U
Optimized 10x DyNAzyme buffer	1x
dNTP mix	0,1 mM
SYBRGreen	0,1x

Lämpötila C°	Aika	Syklit
95	10 min	x1
95	30 s	
55	60 s	x30
72	60 s	
72	10 min	x1
60 to 95	0,5 C / 5s	x1

6.3 Alukkeiden suunnittelu ja testaus referenssi-PCR-menetelmää varten

Alukkeiden suunnittelu

*Yersinia*ille tyypillisen plasmidikadon vuoksi kohdegeenialueen haluttiin olevan genomisen, joten geenialueeksi valikoitui patogeenisille *Y. enterocolitica*-kannoille spesifinen *ail*-geeni. Alukkeet suunniteltiin *ail*-geenialueelle käyttäen National Center for Biotechnology Information (NCBI) sivuston Primer-BLAST -ohjelmaa, jolla voitiin myös varmistaa alukkeiden spesifisyys [34]. Alukkeiden pituudet vaihtelivat 19–25 nukleotidin välillä ja monistuvien tuotteiden pituudet 97–191 bp:n välillä. Alukkeiden sulamislämpötilat (T_m) pidettiin 57–63 °C:n välillä enintään kahden asteen lämpötilaerolla. Lopuksi tilattavat alukkeet valittiin niiden nukleotidisekvenssit ja GC-pitoisuudet huomioon ottaen. Alukkeita tilattiin yhteensä kolmesta paria, ja ne on esitetty liitteessä 6. Liite on luovutettu vain Orion Diagnostica Oy:n käyttöön.

Alukkeiden testaus

Alukkeet testattiin käyttämällä HotStar Taq MasterMix -reagenssipakkausta (Qiagen) [35]. Fluoresoivana väriaineena oli SYBR®Green ja templaattina *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A). Reaktiot suunniteltiin reagenssipakkauksen käyttöohjeen mukaisesti ja ajettiin käyttäen annealing-gradienttia (54–59 °C). Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän reagenssien loppukonsentraatiot ja ajo-ohjelma on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Reagenssien loppukonsentraatiot (reaktiotilavus 25 µl) ja reaaliaikaisen qPCR-menetelmän ajo-ohjelma aluketestauksessa

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet	0,2 µM
HotStar MasterMix	1x
SYBR®Green	0,1x
Templaatti	50 kopiota

Lämpötila C°	Aika	Syklit
95	15 min	x1
94	60 s	
54-59 gradientti	60 s	x35
72	60 s	
72	10 min	x1
95	30 s	x1
65 to 95	0,5 C / 5 s	x1

Toimivat alukkeparit testattiin lämpötilagradienttiajotulosten perusteella valituissa annealing-lämpötiloissa (taulukko 11). Reaktiot valmistettiin kuten edellä, käyttäen *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) -templaattilaimennossarjaa 50 000, 5 000, 500, 50 ja 5 kopiota. Matalimpien templaattimäärien monistamiseksi PCR-sykliden määrä nostettiin neljäänkymmeneen.

Taulukko 11. Alukkeille testatut annealing-lämpötilat

Alukkeet	56 °C	57 °C	58,5 °C
D.Hhoff 9		x	
D.Hhoff 11		x	x
D.Hhoff 13			x
D.Hhoff 14	x	x	
D.Hhoff 15			x

6.4 Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän I suunnittelu, optimointi ja testaus

Menetelmän suunnittelu

Referenssimenetelmäksi kehitettävä reaaliaikainen qPCR-menetelmä haluttiin suunnitella siten, että työvaiheiden määrä minimoitaisiin. Näin ollen päätettiin lähteä optimoimaan luvussa 6.3 esiteltyä, alukkeiden testauksessa käytettyä reaaliaikaista qPCR-menetelmää. Aluketestauksessa saatujen tulosten perusteella reaaliaikaista qPCR-menetelmää lähdettiin optimoimaan käyttäen alukepareja D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14. Annealing-lämpötilaksi määräytyi kummallekin alukeparille sopiva 57 °C, mikä myös mahdollisti reaktioiden samanaikaisen testauksen. Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän ajo-ohjelma on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. Kehitettävän reaaliaikaisen qPCR-menetelmän ajo-ohjelma

Lämpötila C°	Aika	Syklit
95	15 min	x1
94	60 s	
57	60 s	x40
72	60 s	
72	10 min	x1
95	30 s	x1
65 to 95	0,5 C / 5 s	x1

Magnesiumkonsentraation optimointi

Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän optimointi aloitettiin reaktion magnesiumkonsentraation optimoinnista. Magnesiumin määrän vaikutusta reaktioon ja alukkeiden monistusherkkyyteen testattiin templaattilaimennossarjan avulla nostamalla magnesiumkonsentraatiota 1,5 mM:sta 5 mM:iin asti 0,5 mM:n välein. Optimoinnissa käytettiin aluketestauksen perusteella valittuja D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14 -alukkeita. Magnesiumkonsentraatiota lukuun ottamatta reagenssien konsentraatiot ja ajo-ohjelma pysyivät muuttumattomina. Templaattina käytettiin *Y.enterocolitica* 6471/76 -kanta (1A) laimennossarjalla 50 000, 5 000, 500, 50 ja 5 kopiota.

Lopuksi D.Hhoff 9 alukkeet testattiin vielä tarkemmin 2,5 mM ja 4,0 mM MgCl₂ -konsentraatioissa kahdella *Y.enterocolitica* 6471/76 -kannasta eristetyllä DNA-templaattilla (1A, 1B) käyttäen laimennossarjoja 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota.

Kantakattavuuden testaus

Menetelmän kantakattavuutta tutkittiin testaamalla kaikki käytettävissä olevat *Yersinia*-kannat. *Y.enterocolitica*-kantoja oli yhteensä neljä, joista kolme oli patogeenisiä kantoja (Ruokola/71, 8081, 6471/76 (1B)) ja yksi kanta apatogeeniseksi oletettu *Y.enterocolitica* ATCC9610 [21]. *Y.pseudotuberculosis*-bakteerikantoja oli kolme: PB1, YPIII/pIB1 ja IP32953.

Y.enterocolitica-kannat testattiin laimennossarjoin 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota, *Y.pseudotuberculosis*-kannat laimennossarjoin 10 000, 1000 ja 100 kopiota. Käytettyjen reagenssien loppukonsentraatiot on esitetty taulukossa 13. Menetelmän magnesiumkonsentraation optimoinnin vuoksi ajo-ohjelmaa voitiin muuttaa lasquemalla syklien määrä 35:een. Patogeeniset *Y.enterocolitica* -kannat testattiin toistamiseen tuloksen varmistamiseksi.

Taulukko 13. Kantakattavuustesteissä käytettyjen reagenssien loppukonsentraatiot

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet (D.Hhoff 9)	0,2 µM
HotStar MasterMix	1x
MgCl ₂	4,0 mM
SYBR®Green	0,1x
Templaatti	1x10 ⁶ - 5 kopiota

Ristireaktioiden testaus

Referenssimenetelmäksi suunniteltu reaaliaikainen qPCR-menetelmä haluttiin testata mahdollisten ristireaktioiden varalta, jotta voitaisiin varmistaa, ettei muiden bakteereiden läsnäolo aiheuta vääriä positiivisia tuloksia tai vaikuta reaktioon inhiboivasti. Testaukseen haluttiin ottaa mukaan mahdollisimman monta käytettävissä olevaa gastroenteriittia aiheuttavaa enterobakteerilajia. Ristireaktiotestauksessa olivat mukana *C.coli*, *C.jejuni*, *C.difficile*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.enteriditis*, *S.typhimurium* ja *S.sonnei* (taulukko 3). Ristireaktiotestausta varten *K.pneumoniae*, *S.sonnei*, *E.coli*, *C.jejuni* sekä *C.coli* kasvatettiin puhtasviljelmistä ja DNA eristettiin käyttäen EZ1 Advanced XL -eristysrobotia. *C.difficile*-, *S.enteriditis*- ja *S.typhimurium*-bakteereista käytettävissä oli valmiiksi eristetyt DNA-näytteet. Jokainen bakteerikanta testattiin sekä erikseen että patogeenisen *Y.enterocolitica* 6471/76 -templaatin (1B) läsnäollessa. *Y.enterocolitica*-templaattista käytettiin laimennossarjaa 10 000, 1000, 100 ja 10 kopiota, kun taas ristireaktiotestattavan bakteerin määrä oli kaikissa reaktioissa 10 000 kopiota. Jokaisessa ajoissa käytettiin standardisuoraa, joka tehtiin *Y.enterocolitica* 6471/76 -templaattista laimennossarjalla 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota. Reaktiot valmistettiin taulukon 13 mukaisesti ja ajo-ohjelma pysyi muuttumattomana.

Menetelmän testaus kliinisillä ulostenäytteillä

Menetelmä testattiin yhteensä 21 kliinisellä ulostenäytteellä. Käytettävissä oli kliinisistä näytteistä eristetty kokonais-DNA, joka testattiin laimennossarjoin 1:1, 1:10 ja 1:100. Lisäksi kolme kliinistä näytettä testattiin siten, että näytteisiin oli lisätty *Y.enterocolitica* 6471/76 -templaattia (1B) 10 000, 1000 ja 100 kopion laimennossarjana. Reaktiot valmistettiin taulukon 13 mukaisesti ja ajo-ohjelma pysyi muuttumattomana. Tulosten varmistamiseksi kaikki kliiniset näytteet testattiin myös Rida®Gene Bacterial Stool Panel -reagenssipakkauksella (R-Biopharm) [17].

6.5 Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän II suunnittelu ja testaus

Toinen menetelmä haluttiin rakentaa reagenssipakkauksen sijaan erillisistä PCR-reagensseista yksittäisten komponenttien mahdollistaessa tarkemman optimoinnin. Entsyymiksi valittiin DyNAzyme II (Thermo Fisher Scientific) ja reaktio suunniteltiin entsyymin ominaisuuksien mukaan niin, että reaktiokomponenttien konsentraatiot vastaisivat entsyymin toiminnan kannalta optimaalisia konsentraatioita [36]. Reaaliaikaisen qPCR:n ajo-ohjelma suunniteltiin entsyymin valmistajan ohjeen mukaisesti siten, että syklien kestot ja määrä olisivat alukkeiden ja monistuvan tuotteen kannalta riittävät. Annealing-lämpötila 57 °C määräytyi käytettyjen D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14 -alukkeiden mukaan (kuva 8).

Menetelmää testattiin valmistamalla reaktiot taulukon 14 mukaisesti. Templaattina käytettiin *Y.enterocolitica* 6471/76 -kannasta eristettyä DNA:ta (templaatti 1A) laimennossarjana 50 000, 5 000, 500, 50 ja 5 kopiota. Koe toistettiin D.Hhoff 9 -alukkeille käyttäen kahta *Y.enterocolitica* 6471/76 -templaattia (1A, 1B) laimennossarjoin 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100 ja 10 kopiota.

Taulukko 14. Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän II reagenssien loppukonsentraatiot (reaktiotilavuus 25 µl) ja ajo-ohjelma

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet	0,5 µM
DyNAzyme II DNA Polymerase	0,5 U
Optimized 10x DyNAzyme buffer*	1x
dNTP mix	0,2 mM
SYBRGreen	0,1x
Templaatti	

*10 mM Tris-HCl, 1,5 mg MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100

Temp. °C	Time	Cycles
94	2 min	x1
94	30 s	
57	30 s	x40
72	40 s	
72	10 min	x1
94	30 s	x1
65 to 95	0,5 °C / 5 s	x1

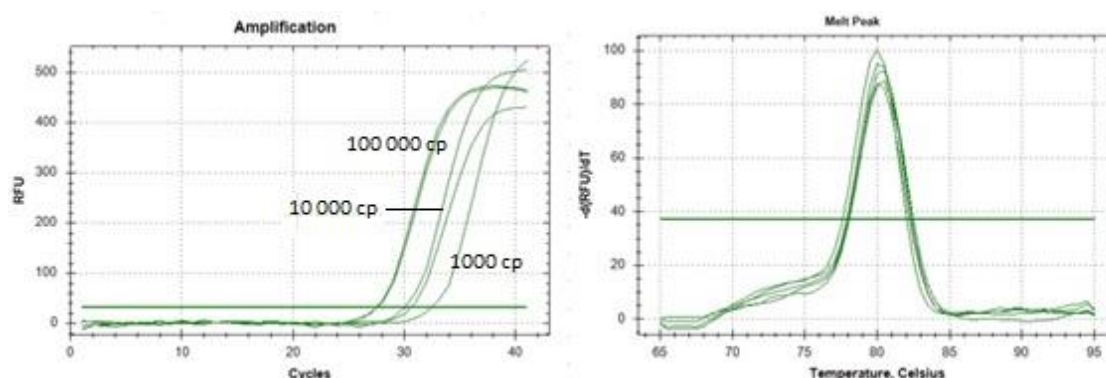
7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

7.1 Kirjallisuudesta testatut PCR-menetelmät

qPCR-menetelmä *virF*-geenille

Testattu qPCR-menetelmä perustui *E.colille*, *C.colille*, *C.jejunille* sekä patogeenisille *Yersinioille* kehitettyyn monikohde-qPCR-menetelmään [27]. Antikaisen ym. artikkelissa julkaistua monikohde-qPCR-menetelmää mukailevassa qPCR-menetelmässä käytettiin ainoastaan *Y.enterocolitica* suunniteltuja alukkeita, sillä muiden bakteereiden tunnistamiselle ei ollut tarvetta. Alukkeet oli suunniteltu virulenssiplasmidissa sijaitsevalle *virF*-geenille, joka on spesifinen kaikille patogeenisille *Yersinioille*. Kokeessa käytettiin templaattina *Y.enterocolitica* 6471/76 (1B) -kantaa, *Y.enterocolitica*stasta puhdistettua pYV8081-plasmidinäytettä sekä kahta *Y.pseudotuberculosis*-kantaa (PB1, YPIII/pIB1).

Y.enterocolitica 6471/76 monistui vain, kun templaattia oli 100 000 kopiota. Puhdistettu plasmidinäyte monistui tuhanteen kopioon saakka (kuva 2). *Y.pseudotuberculosis*-kantojen monistuminen vaati kummankin kannan kohdalla 10 000 kopiota. *Y.enterocolitica*n monistustuotteen sulamispiste oli 80,5 °C ja *Y.pseudotuberculosis*ksen 80 °C. Aiotulokset on esitetty liitteessä 1.



Kuva 2. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y.enterocolitica* plasmidiprepin (pYV8081) monistumisesta.

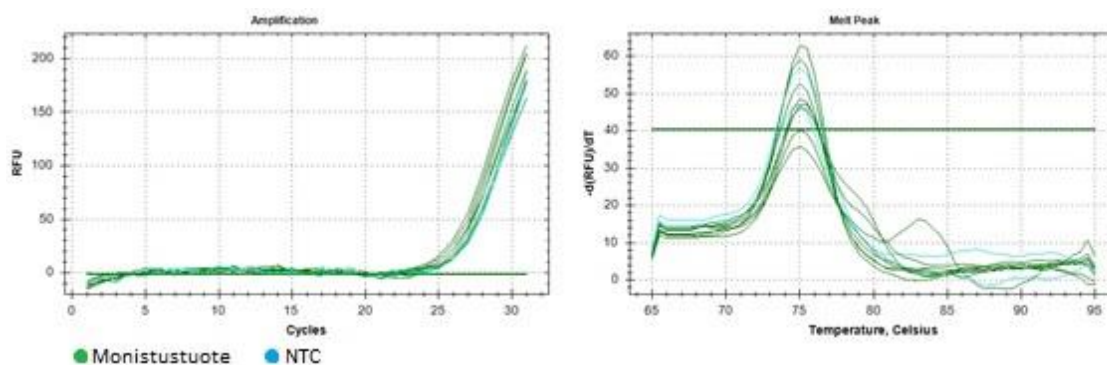
Monistuminen vaatii korkean kopioluvun templaattia, eikä alkuperäistä qPCR-menetelmää mukaileva qPCR-menetelmä ole ilman optimointia sopiva vertailumenetelmäksi. Koska alukkeet on suunniteltu kaikista patogeenisista *Yersinioista* löytyvälle *VirF*-geenille, menetelmä tunnistaa kaikki patogeeniset *Y.enterocolitica*-, *Y.pseudotuberculosis*-

ja *Y.pestis*-kannat, eikä niitä ole tällä menetelmällä mahdollista erottaa toisistaan. Lisäksi menetelmän luotettavuutta saattaa heikentää plasmidikato, jota *Yersinioilla* on todettu esiintyvän ympäristön lämpötilan noustessa yli 30 °C:n [19].

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*-, *yst*- ja *virF*-geeneille

Thisted Lambertzin ym. julkaisemassa artikkelissa esitettyä monikohde-PCR-menetelmää [28] testattiin menetelmää mukailleen kolmelle eri *Y.enterocolitican* geenialueelle. Alukkeista *ail*- ja *yst*-geenialueille suunnitellut alukkeet ovat spesifisiä *Y.enterocolitica*lle [9, s. 25] ja *virF*-alukkeet kaikille patogeenisille *Yersinioille* [6, s. 33]. Kokeessa kaikki alukeparit testattiin erikseen sekä yhdessä.

Kokeessa yksikään alukepari ei monistanut oikeaa tuotetta. Sen sijaan sulamispisteanalyysistä voitiin havaita kaikkien alukeparien muodostaneen runsaasti alukedimeerejä. Negatiiviset kontrollit monistuivat kaikilla alukepareilla, ja niiden monistus- ja sulamispistekäyrät vastasivat reaktioita, joissa oli mukana templaattia (kuva 3). Tulosten perusteella menetelmää ei lähdetty optimoimaan referenssimenetelmäksi *Y.enterocolitica*lle.



Kuva 3. Monikohde-PCR-menetelmän monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä monikohdereaktiossa.

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*- ja *virF*-geeneille

Yen ym. artikkelissa esitettyä *ail*- ja *VirF*-geeneille suunniteltua kaksikohde-PCR-menetelmää [29] testattiin *Y.enterocolitican* tunnistamiseksi työnkuvauksen mukaisesti. Kummallakin toteutustavalla saatiin tulokseksi ainoastaan epäspesifistä monistumista. Kumpikaan alukepari ei monistanut haluttua tuotetta ja negatiiviset kontrollit monistuivat. Su-

lamispisteanalyysissä negatiivisten kontrollien monistus- ja sulamispistekäyrät vastasivat templaattia sisältäviä reaktioita. Molemmat alukeparit kuitenkin testattiin erikseen, eikä niitä laitettu samaan reaktioon. On mahdollista, että kaksikohdemenetelmäksi suunniteltu reaktio ei toiminut juuri tästä syystä, mutta saatujen tulosten ja negatiivisten kontrollien nousun johdosta menetelmä todettiin tarkoitukseen sopimattomaksi referenssimenetelmäksi. PCR-ajotulokset on esitetty liitteessä 1.

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*- ja *virF*-geeneille (II)

Weynantsin ym. julkaisema, monikohdemenetelmäksi suunniteltu PCR-menetelmä [30] testattiin alkuperäistä menetelmää mukaillen *ail*- ja *virF*-alukkeilla. Alukepareista *ail*-geenille suunnitellut alukkeet muodostivat runsaasti alukedimeerejä ja negatiiviset kontrollit monistuivat. *VirF*-geenille suunnitelluista alukkeista yhdessä reaktiossa muodostui alukedimeerejä ja muut reaktiot eivät toimineet ollenkaan. Negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisina.

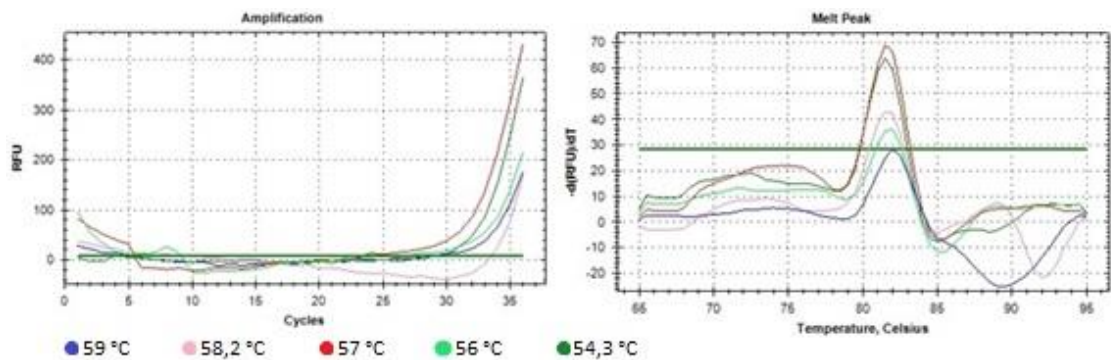
On mahdollista, että menetelmä ei toiminut, sillä se oli suunniteltu monikohdemenetelmäksi. Testaamatta jätettiin alukkeet, jotka oli suunniteltu kaikilta *yersinioilta* löytyvälle *inv*-geenille, sekä O:3 serotyypispesifisille *rfbB*- ja *rfbC*-geeneille, sillä apatogeenisten *Yersinoiden* tai ainoastaan yhden patogeenisen serotyypin tunnistamiseen ei nähty tarvetta. Koska kummatkaan testatuista alukkeista eivät monistaneet oikeaa tuotetta, ei menetelmää haluttu lähteä optimoimaan. Ajotulokset on esitetty liitteessä 1.

7.2 Referenssimenetelmää varten suunniteltujen alukkeiden testaus

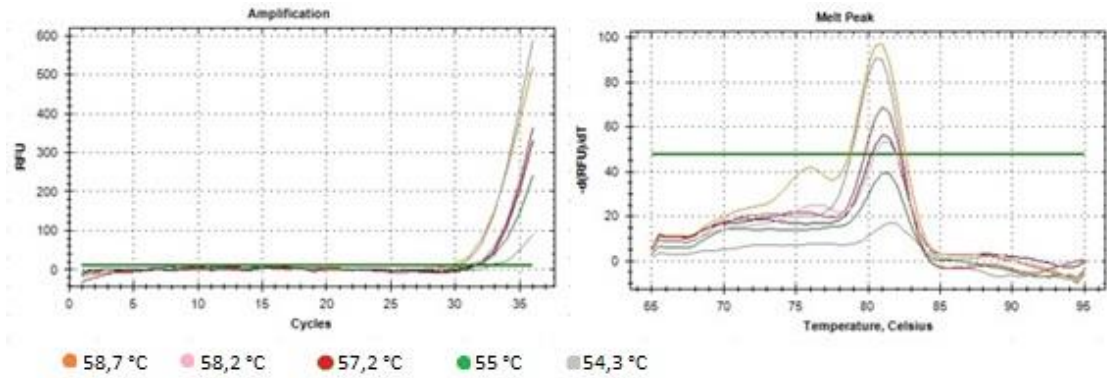
Kaikki suunnitellut D.Hhoff-alukkeet testattiin käyttäen annealing-lämpötilagradienttia, jotta tuotteen monistumista voitaisiin vertailla eri lämpötiloissa. Näin voitiin löytää optimaalisin annealing-lämpötila kullekin alukeparille. Kolmestatoista alukeparista viisi paria todettiin toimiviksi, mutta on mahdollista, että templaatin tarkoituksettoman liian alhaisen määrän (50 kopiota) vuoksi tulos on virheellinen. Tällä kuitenkin saatiin jo projektin alkuvaiheessa karsittua jatkotestattaviksi kaikkein herkimmät alukkeet, eikä kokeen uusimiselle näin ollen nähty tarvetta. Sulamispisteanalyysin perusteella alukkeilla monistuvan tuotteen sulamispiste on noin 83 °C, kun taas epäspesifinen monistuminen oli tunnistettavissa matalammasta, noin 75 °C:n sulamispisteestä. Alukkeiden monistumislämpötilat on esitetty taulukossa 15 ja ajodata kuvissa 4–9.

Taulukko 15. Reaaliaikaista qPCR-menetelmää varten suunniteltujen alukkeiden monistumislämpötilat. Annealing-gradientin optimaalisimmat annealing-lämpötilat on esitetty taulukossa lihavoituna.

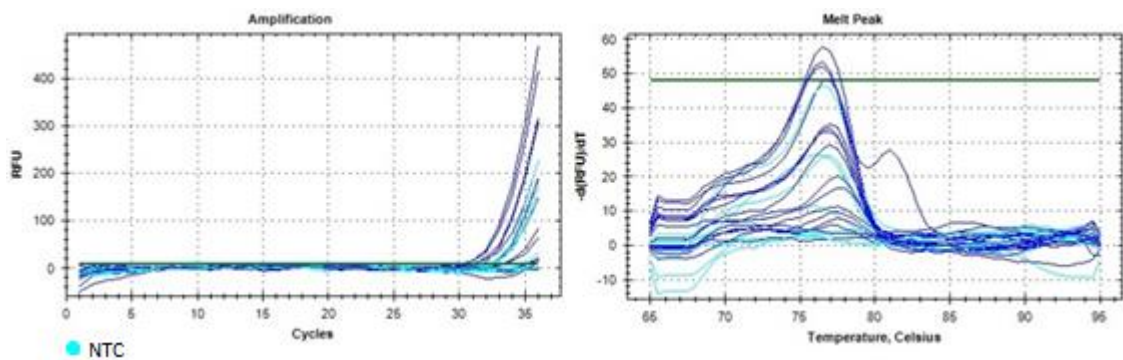
Alukepari	Monistumislämpötilat (°C)	Lisätietoja
D.Hoff 1		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 2		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 4		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 6		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 7		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 8		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 9	54,3 56 57,2 58,2 59	
D.Hoff 10		Ei amplifikaatiota
D.Hoff 11	54 54,3 55 57,2 58,2 58,7	
D.Hoff 12		Muodosti runsaasti alukedimeerejä
D.Hoff 13	58,7 59	Alukedimeerejä kun lämpötila alle 58,2 °C
D.Hoff 14	54,3 55 56 57,2 58,7	
D.Hoff 15	54,3 56 57,2 58,7	56 °C:ssa NTC nousu (alukedimeerejä)



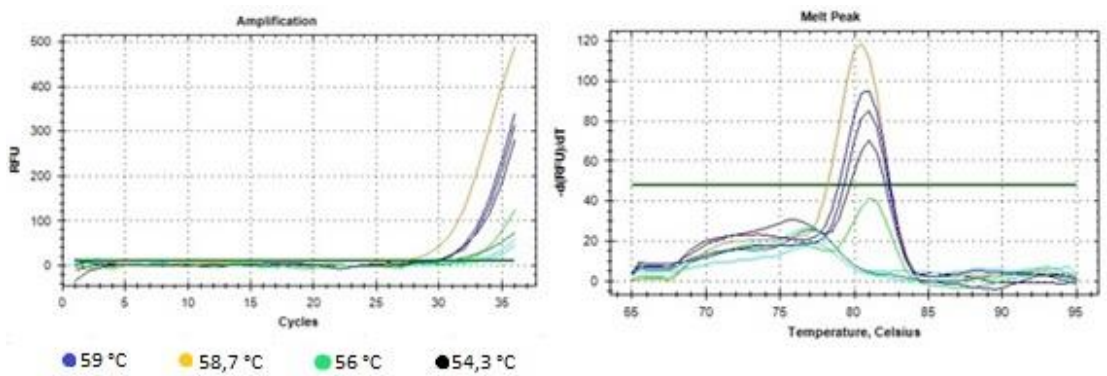
Kuva 4. D.Hoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä eri annealing-lämpötiloissa



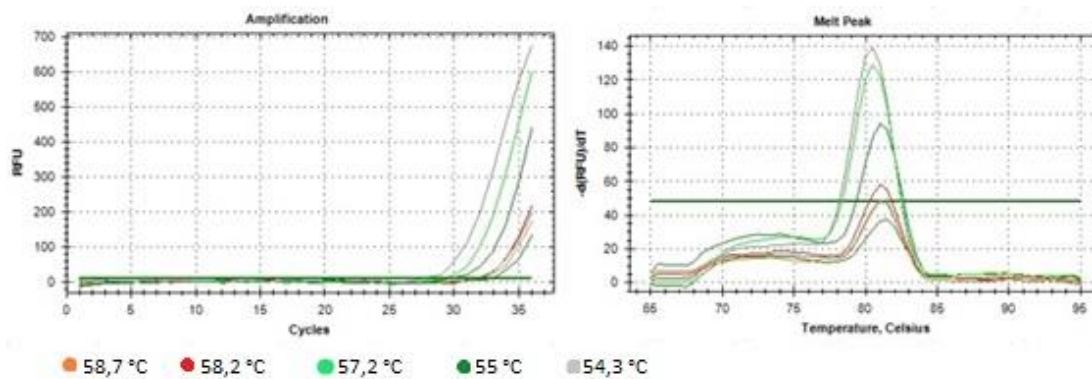
Kuva 5. D.Hoff 11 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä eri annealing-lämpötiloissa



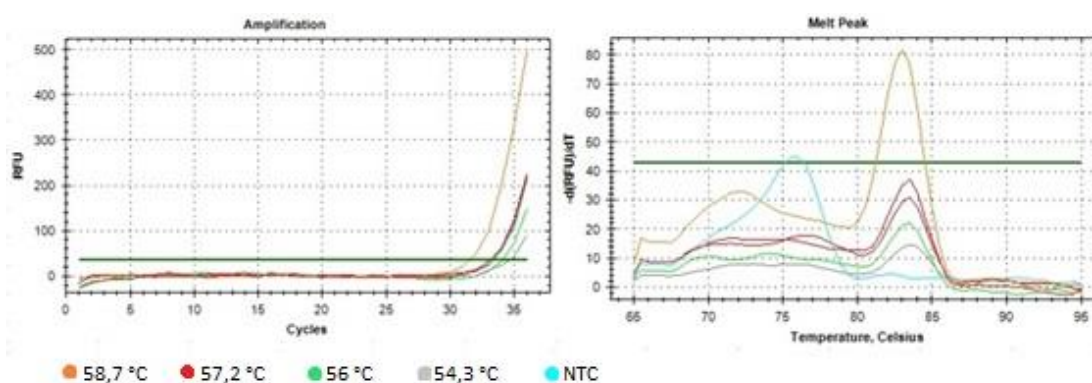
Kuva 6. D.Hoff 12 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-gradientilla. Tuotetta ei monistunut, mutta alukedimeerejä muodostui runsaasti.



Kuva 7. D.Hoff 13 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä eri annealing-lämpötiloissa



Kuva 8. D.Hoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä eri annealing-lämpötiloissa.



Kuva 9. D.Hoff 15 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä eri annealing-lämpötiloissa. Yksi negatiivinen kontrolli muodosti alukedimeerejä, muut negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisina.

Annealing-lämpötilagradienttiajon tulosten perusteella alukkeet D.Hoff 9, D.Hoff 11, D.Hoff 13, D.Hoff 14 ja D.Hoff 15 testattiin niille sopivimmissa annealing-lämpötiloissa templaattilaimennossarjan avulla. Alukkeet D.Hoff 9, D.Hoff 11 ja D.Hoff 14 testattiin 57 °C:n annealing-lämpötilassa ja tuotteen monistuminen oli kaikilla alukkeilla eksponentiaalista ja yhdenmukaista. Kaikki alukkeet muodostivat jonkin verran alukedimeerejä, mutta negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisina. D.Hoff 14 -alukkeille testattiin myös 56 °C:n annealing-lämpötilaa. Monistumista tapahtui ja herkkyys oli samaa luokkaa kuin 57 °C:n lämpötilassa, mutta monistuminen ei ollut yhtä lineaarista (taulukko 16). Alukkeet D.Hoff 11, D.Hoff 13 ja D.Hoff 15 testattiin 58,5 °C:n annealing-lämpötilassa. Monistuminen oli kaikilla alukkeilla epäspesifistä ja negatiiviset kontrollit monistuivat, sillä alukkeet muodostivat runsaasti alukedimeerejä. Monistustuotteiden sulamis-lämpötilat vaihtelivat 78–85 °C:n välillä.

Taulukko 16. Reaaliaikaisen qPCR-tuotteiden sulamispisteet ja monistumissyklit templaattimäärittäin alukkeiden optimaalisimmissa annealing-lämpötiloissa.

Alukepari	Annealing (°C)	Cq (50 000)	Cq (5000)	Cq (500)	Sulamispiste (°C)
D.Hhoff 9	57	27,58 / 27,47	32,04 / 30,1	34,16 / -	82
D.Hhoff 11	57	27,37 / 27,77	32,01 / -	39,53 / -	81,5
D.Hhoff 14	57	28,25 / 28,23	32,64 / 33,44	35,25 / -	80,5
D.Hhoff 14	56	27,92 / 30,14	35,15 / 31,06	32,33 / -	81

Saatujen tulosten perusteella alukkeet D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14 valittiin reaktion optimointiin. Annealing-lämpötilan ollessa 57 °C oli tuotteen monistuminen näillä alukkeilla lineaarisinta ja epäspesifisiä tuotteita monistui vähiten. Annealing-lämpötila 58,5 °C todettiin epäsojivaksi kaikille testatuille alukkeille. Ajotulokset on esitetty liitteessä 2.

7.3 Reaaliaikainen qPCR-menetelmä I

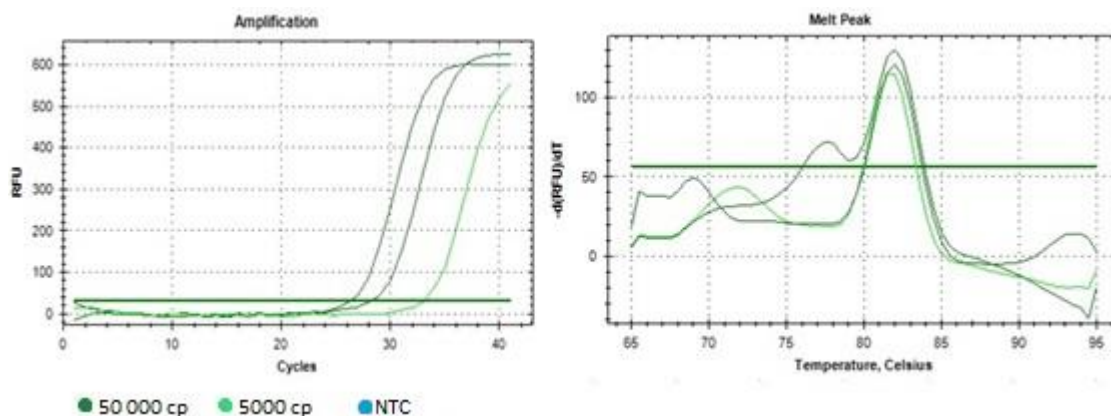
Magnesiumkonsentraation optimointi

Alukkeiden testauksessa käytettyä Reaaliaikaista qPCR-menetelmää lähdettiin optimoimaan magnesiuminkonsentraation avulla herkkyuden parantamiseksi. Magnesiumin määrää nostettiin 0,5 mM välein lähtökonsentraatiosta 1,5 mM aina 5,0 mM:n asti. Ko-keessa käytettiin templaattina *Y.enterocolitica* 6471/76 (1A) -templaattilaimennossarjaa (50 000, 5000, 500, 50 ja 5 kopiota), jotta magnesiumin määrän vaikutusta reaktion herkkyyteen voitiin tutkia. Alukkeina käytettiin D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14 -alukkeita ja saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa (taulukko 17).

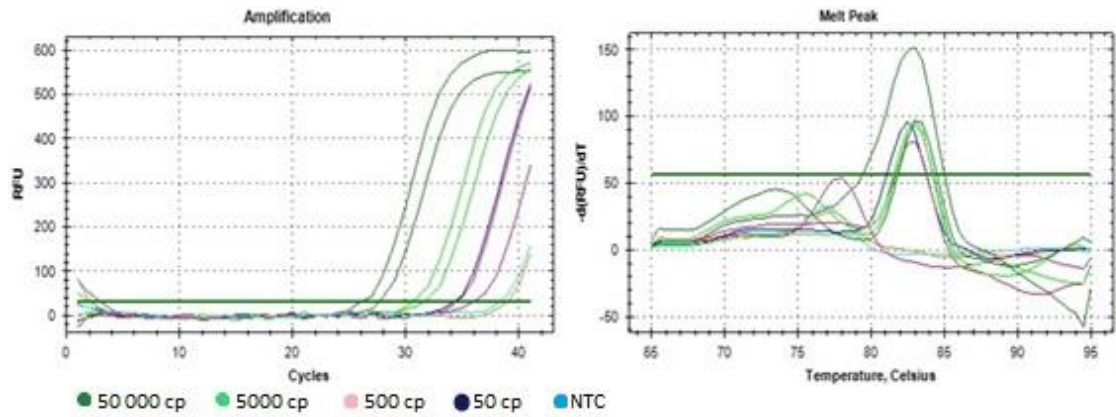
Taulukko 17. Magnesiumkonsentraation vaikutus reaaliaikaiseen qPCR-reaktioon. Negatiivisten kontrollien nousu johtui alukedimeereiden muodostumisesta.

D.Hhoff 9			D.Hhoff 14		
MgCl ₂ (mM)	Herkkyys (kopiota)	Lisätietoa	MgCl ₂ (mM)	Herkkyys (kopiota)	Lisätietoa
1,5	5 000	Lievästi alukedimeerejä	1,5	5 000	Alukedimeerejä
2	5 000	Lievästi alukedimeerejä, NTC koholla	2	5 000	Alukedimeerejä, NTC koholla
2,5	500		2,5	5 000	Runsaasti alukedimeerejä, NTC:t koholla
3	500	Alukedimeerejä, NTC:t koholla	3	5 000	Runsaasti alukedimeerejä, NTC:t koholla
3,5	500	Yksi NTC koholla	3,5	5 000	Runsaasti alukedimeerejä, NTC:t koholla
4	50	Lievästi alukedimeerejä	4	5 000	Runsaasti alukedimeerejä, NTC:t koholla
4,5	5000	Alukedimeerejä, NTC:t koholla	4,5	5 000	Runsaasti alukedimeerejä, NTC:t koholla
5	5000	Alukedimeerejä, NTC:t koholla	5	500	Runsaasti alukedimeerejä, NTC:t koholla

D.Hhoff 9 -alukkeilla magnesiumkonsentraation nosto paransi reaktion herkkyyttä merkittävästi (kuvat 10 ja 11). 4,0 mM:n magnesiumkonsentraatiolla reaktion herkkyys parani viiteenkymmeneen kopioon, mutta jonkin verran alukedimeerejä oli havaittavissa. Magnesiumkonsentraatiolla 2,5 mM herkkyys parani alkuperäisestä jonkin verran, eikä alukedimeerejä muodostunut ollenkaan. Negatiivisten kontrollien monistuminen johtui sulamispisteanalyysin mukaan alukedimeereistä.



Kuva 10. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä D.Hhoff 9 alukkeilla alkuperäisessä 1,5 mM:n magnesiumkonsentraatiossa



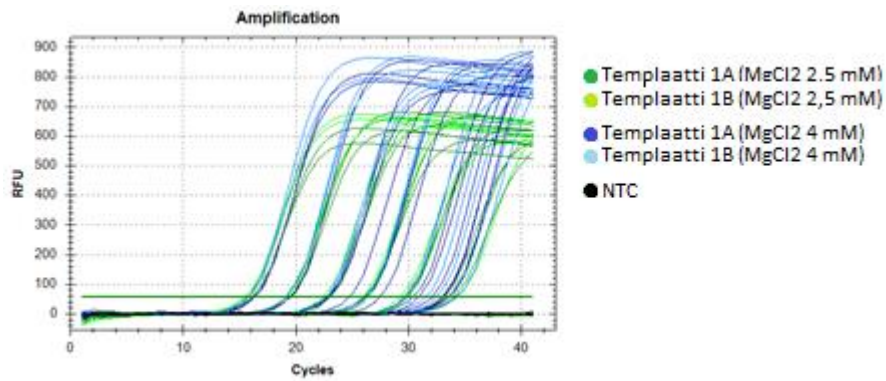
Kuva 11. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä D.Hhoff 9 alukkeilla magnesiumkonsentraatioissa 4,0 mM.

Magnesiumkonsentraation nostosta ei ollut D.Hhoff 14 -alukkeiden kohdalla merkittävää hyötyä. Herkkyys parani jonkin verran konsentraation ollessa 5,0 mM, mutta magnesiumkonsentraation nosto lisäsi alukedimeereiden muodostumista voimakkaasti.

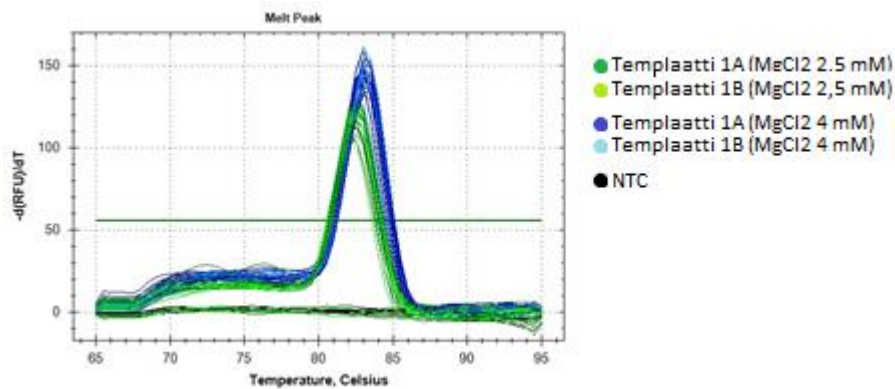
Reaaliaikainen qPCR-menetelmä testattiin vielä uudelleen D.Hhoff 9 -alukkeilla magnesiumkonsentraatioissa 2,5 mM ja 4,0 mM käyttäen kahta eri *Y.enterocolitica* 6471/76 -templaattia (1A, 1B). Uudet templaattilaimennossarjat olivat 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota. Templaattien välillä ei havaittu monistumisen suhteen merkittävää eroa, mutta sen sijaan menetelmän herkkyys näytti parantuvan; kummallakin magnesiumkonsentraatiolla päästiin viiden kopion herkkyuteen. Vertailtaessa tuloksia voitiin kuitenkin todeta monistumisen olevan hieman lineaarisempaa 4 mM:n magnesiumkonsentraatiolla, kuin 2,5 mM:n magnesiumkonsentraatiolla (taulukko 18, kuva 12). Myös sulamspiikit olivat intensiteetiltään hieman korkeampia (kuva 13). Epäspesifistä monistumista ei esiintynyt kummassakaan magnesiumkonsentraatioissa ja negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisina. Kaikki ajotulokset on esitetty liitteessä 3. Saatujen tulosten perusteella reaaliaikaisessa qPCR-menetelmässä käytettäviksi alukkeiksi päätettiin valita D.Hhoff 9 -alukkeet.

Taulukko 18. Templaattien monistuminen D.Hhoff 9 -alukkeilla reaaliaikaisen qPCR-reaktion magnesiumkonsentraatioiden ollessa 2,5 mM ja 4,0 mM. Cq-arvo kertoo monistumisen kynnysyökin ylittymisestä.

Templaatin kopioluku	1A / 2,5 mM Cq	1A / 4,0 mM Cq	1B / 2,5 mM Cq	1B / 4,0 mM Cq
1x10 ⁶	16,13 / 16,15	16,36 / 16,22	15,41 / 15,62	15,82 / 15,79
1x10 ⁵	19,55 / 19,43	19,49 / 19,76	19,10 / 19,16	19,20 / 19,16
10 000	22,88 / 22,98	22,89 / 23,05	22,89 / 22,37	22,76 / 22,58
1000	26,15 / 26,40	26,21 / 27,41	26,01 / 26,16	26,24 / 26,08
100	29,89 / 29,70	30,39 / 30,9	29,24 / 29,97	29,55 / 29,89
10	33,18 / 33,39	33,12 / 33,03	- / 34,26	34,26 / 31,51
5	34,08 / -	33,54 / 32,12	- / -	33,77 / 32,47



Kuva 12. Tuotteiden monistumiskäyrät D.Hhoff 9 -alukkeilla magnesiumkonsentraatioissa 2,5 mM ja 4,0 mM



Kuva 13. Tuotteen sulamispistekäyrät D.Hhoff 9 -alukkeilla magnesiumkonsentraatioissa 2,5 mM ja 4,0 mM.

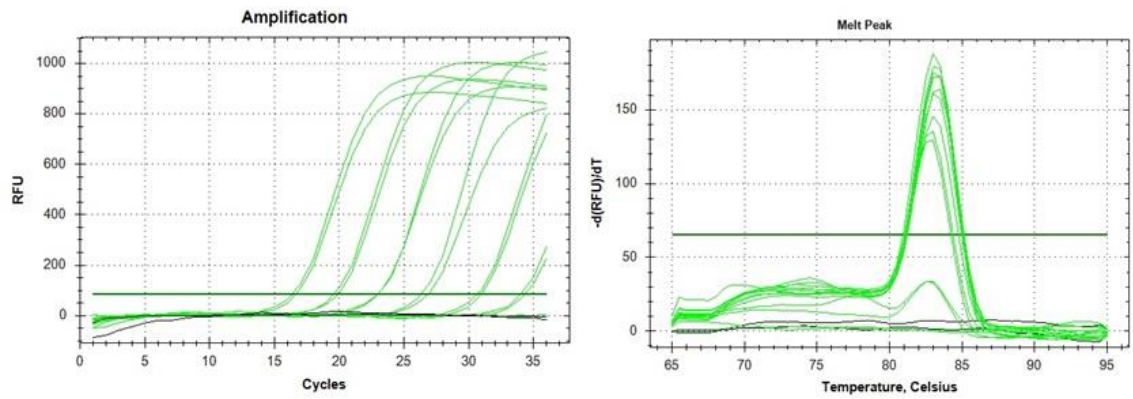
Kantakattavuus

Patogeenisille *Y.enterocolica*-kannoille suunnitellun reaaliaikaisen qPCR-menetelmän kantakattavuus D.Hhoff 9 -alukkeilla testattiin kaikilla käytettävissä olleilla *Yersinia*-kannoilla. *Y.enterocolitica*-bakteerikannoista mukana oli kolme patogeenistä kantaa (Ruokola/71, 8081, 6471/76) sekä apatogeeniseksi oletettu *Y.enterocolitica* ATCC9610 -kanta [16]. *Y.pseudotuberculosis*-bakteerikantoja oli kolme: PB1, YPIII/pIB1 ja IP32953. Kaikki patogeeniset *Y.enterocolitica*-kannat monistuivat. ATCC9610 -kanta ei monistunut, kuten eivät *Y.pseudotuberculosis*-kannatkaan.

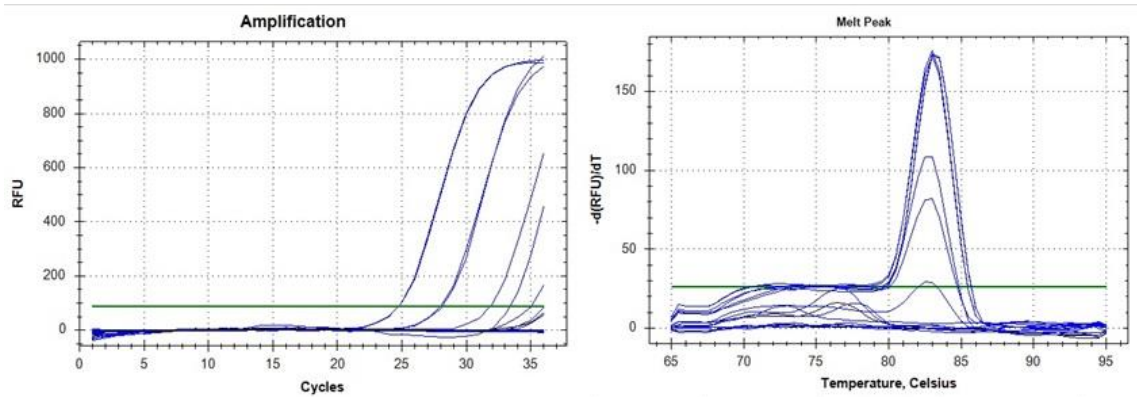
Patogeenisillä *Y.enterocolitica*-kannoilla monistuminen oli lineaarista ja kannoilla 6471/76 (1B) ja Ruokola/71 herkkyys oli viisi kopiota. Kannalla 8081 herkkyys oli vain tuhat kopiota, mutta kun kaikkien kantojen monistumiskäyriä verrattiin keskenään, vastasi kannan 8081 monistuminen templaattikopiomäärillä 1 000 000–1000 kantojen 6471/76 (1B) ja Ruokola/71 monistumista templaattikopiomäärien ollessa 10 000–10 kopiota (taulukko 19). On siis mahdollista, että templaattilaimennoksissa on sattunut virhe tai templaatin laatu on ollut heikompaa. Monistuminen patogeenisillä *Y.enterocolitica*-kannoilla on esitetty kuvissa 14–16.

Taulukko 19. Patogeenisten *Y.enterocolitica*-kantojen monistumissyklit (Cq) suhteessa templaatin kopiolukuun

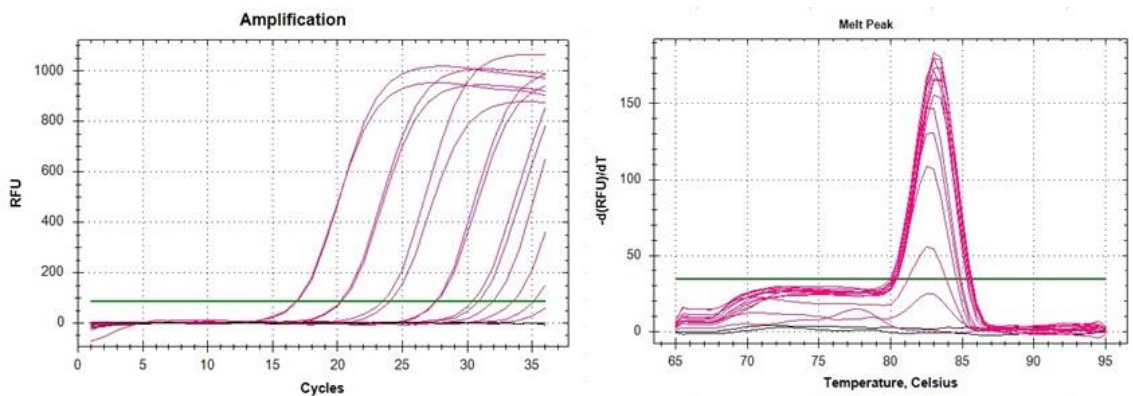
Templaatti	Cq (1 000 000)	Cq (100 000)	Cq (10 000)	Cq (1000)	Cq (100)	Cq (10)	Cq (5)
6471/76 (1B)	16,67 / 16,39	20,0 / 19,59	23,05 / 23,06	26,92 / 26,34	31,02 / 30,69	- / -	34,05 / 34,35
8081	24,71 / 24,70	28,11 / 27,97	31,82 / 33,36	- / 35,02	- / -	- / -	- / -
Ruokola/71	16,9 / 16,77	20,21 / 20,29	23,45 / 24,05	27,51 / 27,62	30,37 / 30,85	35,11 / 32,01	33,49 / -



Kuva 14. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 6471/76 (1B) -kannan monistumisesta. Pienin herkkyys 5 kopiota.



Kuva 15. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 8081 -kannan monistumisesta. Pienin herkkyys 1000 kopiota.



Kuva 16. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* Ruokola/71 -kannan monistumisesta. Pienin herkkyys 5 kopiota.

Ristireaktiot

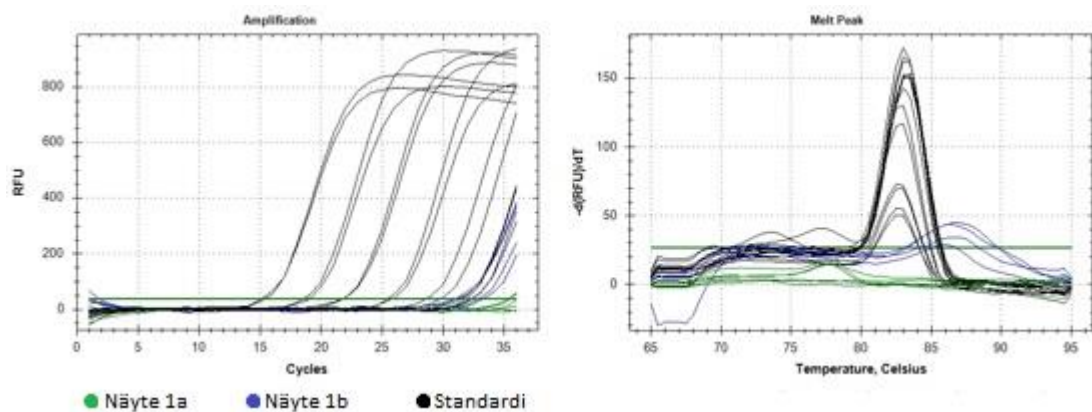
Ristireaktiot testattiin *C.coli*, *C.jejuni*, *C.difficile*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium* ja *S.sonnei* -bakteereiden kanssa. Jokainen bakteerikanta testattiin sekä erikseen, että patogeenisen *Y.enterocolitica*-templaatin läsnä ollessa. Vääriä positiivisia tuloksia ei tullut, eikä yhdenkään bakteerin läsnäolo vaikuttanut *Y.enterocolitican* monistumiseen. Kaikki negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisina. *Y.enterocolitican* templaattilaimennossarjojen monistuminen oli yhtenäistä ja lineaarista. Kaikki *Y.enterocolitican* rinnakkaisnäytteet monistuivat sataan kopioon saakka, ja jokaisesta rinnakkaisnäytteestä ainakin toinen monistui, kun templaatin määrä oli kymmenen kopiota. Mukana olleet standardit muodostivat lineaarisen standardisuoran, joista ensimmäisen ajon korrelaatiokerroin oli 0,995 ja toisen 0,992. Standardisuorissa ei ole huomioitu seuraavia poikkeavia näytteitä: ensimmäisessä standardisuorassa kumpikaan kymmenen kopion rinnakkaisnäytteestä ei monistunut, eikä toinen viiden kopion rinnakkaisnäytteestä. Toisen ajon standardisuorassa ensimmäinen viiden kopion rinnakkaisnäytteestä ei monistunut yhdenmukaisesti ja toinen ei monistunut ollenkaan. Standardisuorat ja ajotulokset on esitetty liitteessä 4.

Kliiniset näytteet

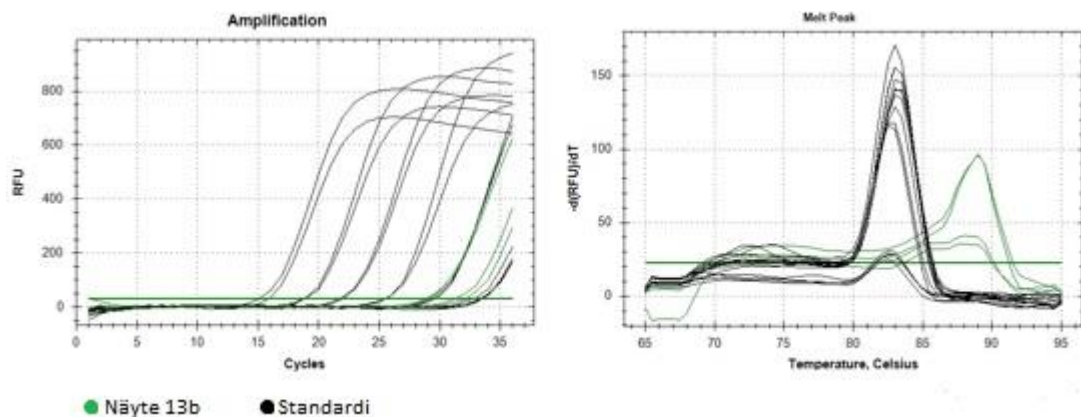
Kliinisiä ulostenäytteitä otettiin reaaliaikaisen qPCR-menetelmän testaukseen mukaan yhteensä 21 kpl, jotka oli kerätty 19 eri potilaalta. Jokaiselta potilaalta näyte oli otettu näytteenottopurkkiin sekä geelitikulle. Kahden potilaan näytteistä testattiin molemmat näytemuodot, muiden potilaiden näytteistä vain toinen (taulukko 4). Kaikki testattavat näytteet oli testattu aiemmin toisen tuotekehitysprojektin yhteydessä Rida®Gene Bacterial Stool Panel -reagenssipakkauksella (R-Biopharma), jolloin kahden potilaan kohdalla näytteenottopurkkiin otettu näyte oli todettu *Y.enterocolitica*-positiiviseksi (1b ja 13b). *Salmonella*-positiivinen tulos oli saatu toisesta näytteestä kahdeksan potilaan kohdalla (6a, 12b, 14b, 15b, 16b, 17b, 18a, 19b) ja kahden potilaan kohdalla sekä näytteenottopurkkiin että geelitikulle otetut näytteet oli todettu *Campylobacter*-positiiviseksi (4a/b, 8a/b).

Referenssimenetelmäksi kehitettyä reaaliaikaista qPCR-menetelmää testattaessa kliiniset näytteet testattiin laimennossarjoin 1:1, 1:10 ja 1:100, jotta näytemäärän vaikutusta menetelmän herkkyteen voitaisiin tarkastella. Kliinisistä näytteistä kahdeksan monistui

(1b, 2b, 5b, 6b, 7b, 9b, 13b, 15b) (liite 5). Näyte 15b monistui ainoastaan laimentamattomalla näytteellä, kun muut monistuneet näytteet monistuivat sekä laimentamattomalla että 1:10 laimennetulla näytteellä. Monistuminen oli yhdenmukaista ja tapahtui kummallakin rinnakkaisnäytteellä. Sulamispisteanalyysin mukaan kaikkien monistustuotteiden sulamispisteet poikkesivat kuitenkin merkittävästi standardina käytetyn *Y. enterocolitica* 6471/76 -kannan sulamispisteestä (83 °C). Sulamispistepeikkien intensiteetit olivat myös standardia huomattavasti matalampia, mutta kuitenkin selkeitä. Tulokset olivat uudelleen testattaessa toistettavia. Näytteiden 1b ja 13b monistuminen on esitetty kuvissa 17 ja 18.



Kuva 17. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteistä 1a ja 1b. Käyristä voidaan nähdä näytteen 1b monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



Kuva 18. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 13b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.

Saatujen tulosten vuoksi tehtiin koe, jossa yksi negatiivinen näyte (10a), sekä Rida®Gene Bacterial Stool Panel -testillä aiemmin *Y. enterocolitica*-positiivisiksi todetut näytteet (1b ja 13b) testattiin referenssimenetelmäksi kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä siten, että laimentamattomien näytteiden joukkoon lisättiin laimennossarja standardina käytettyä *Y. enterocolitica* 6471/76 -templaattia (10 000, 1000, 100 ja 0 kopiota). Negatiivisen näytteen kohdalla lisätyn templaatin monistuminen vastasi standardina käytettyjen näytteiden monistumista. Kun standardina käytettyä templaattia oli näytteissä 1b ja 13b läsnä 10 000 kopiota, saatiin monistustuotteille sulamispisteanalyysissä ainoastaan yksi selkeä sulamispikki, jonka sulamispiste oli 83 °C. Kun samaa templaattia oli läsnä 1000 kopiota, saatiin näytteen 1b kohdalla lievästi kaksiosainen sulamispikki, jonka sulamispisteet olivat 83 °C ja 86 °C, ja näytteen 13b kohdalla lievästi kaksiosainen sulamispikki, jonka sulamispisteet olivat 83 °C ja 89 °C. Templaattimäärän ollessa 100 kopiota olivat nämä kaksiosaiset sulamispikit kummankin näytteen kohdalla selkeät. Kun positiivista templaattia ei ollut läsnä ollenkaan, havaittiin kummankin näytteen kohdalla yksi sulamispikki, joka näytteen 1b kohdalla oli 86 °C ja näytteen 13b kohdalla 89 °C. Ajotulokset tehdystä kokeesta on esitetty liitteessä 5.

Tulosten tulkintaa hankaloitti myös Rida®Gene Bacterial Stool Panel -reagenssipakkauksella saadut ristiriitaiset tulokset. Aiempien reagenssipakkauksella saatujen tulosten mukaan näytepurkkeihin otetut kliiniset näytteet 1b ja 13b olivat *Y. enterocolitica*-positiivisia. Kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä saatujen tulosten jälkeen kaikki testatut kliiniset näytteet testattiin vielä kahdesti Rida®Gene Bacterial Stool Panel -reagenssipakkauksella, mutta yksikään näyte ei antanut enää *Y. enterocolitica*-positiivista tulosta. Sen sijaan näytteen 1b tulos muuttui *Y. enterocolitica*-positiivisesta *Salmonella*-positiiviseksi, jonka jälkeen näyteestä saatiin kokonaan negatiivinen tulos. Näytteestä 13b, josta saatiin ensimmäisessä PCR-ajossa *Y. enterocolitica*- ja *Salmonella*-positiivinen tulos, saatiin koetta toistettaessa enää *Salmonella*-positiivinen tulos. Näytteestä 14b saatiin kaksi positiivista ja yksi negatiivinen tulos *Salmonellalle*. Testin sisäiset positiivinen ja negatiivinen kontrollinäyte toimivat normaalisti. Standardinäytteenä käytetystä *Y. enterocolitica* 6471/71 -näytteistä saatiin odotetusti *Y. enterocolitica*-positiiviset tulokset. Taulukkoon 20 on koottu kaikki työtä varten testatut kliiniset näytteet näytepareineen ja näytteistä saadut testitulokset kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä sekä Rida®Gene Bacterial Stool Panel -reagenssipakkauksella. Taulukosta voidaan havaita, että pääsääntöisesti Rida®Gene Bacterial Stool Panel -testillä saatu positiivinen tulos on peräisin purkinäytteestä, kun taas geelitikulla otettu näyte on ollut negatiivinen. Tulokset

eivät ole jokaisen näytteen kohdalla toistettavia, mikä lisää epävarmuutta tulosten paikansapitävyydestä. Huomio kiinnittyy myös kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä saatuihin epäspesifisiin tuloksiin, jotka ovat kaikki peräisin näytepurkkiin otetuista kliinisistä näytteistä. Tämä viittaa näytteenottotavan vaikuttavan tuloksiin sekä kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä, että Rida®Gene Bacterial Stool Panel -testillä.

Taulukko 20. Kliinisistä näytteistä Rida®Gene Bacterial Stool Panel -testillä ja referenssimenetelmäksi kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä saadut tulokset. Opinnäytetyössä testatut näytteet on esitetty taulukossa tummennettuna.

Geelitikki	Purkki	Alkuperäinen tulos (RidaGene)	2. tulos (RidaGene)	3. tulos (RidaGene)	Tulos ref. qPCR:lla
1a	1b	NEG / <i>Y. enterocolitica</i> POS	NEG / <i>Salmonella</i> POS	- / NEG	NEG / Monistumista
2a	2b	NEG / NEG	- / NEG	- / NEG	- / Monistumista
3a	3b	NEG / NEG	- / NEG	- / -	- / NEG
4a	4b	<i>Campylobacter</i> POS / POS	- / <i>Campylobacter</i> POS	- / <i>Campylobacter</i> POS	- / NEG
5a	5b	NEG / NEG	- / NEG	- / NEG	- / Monistumista
6a	6b	<i>Salmonella</i> POS/NEG	- / NEG	- / NEG	- / Monistumista
7a	7b	NEG / NEG	NEG / NEG	- / NEG	- / Monistumista
8a	8b	<i>Campylobacter</i> POS / POS	- / <i>Campylobacter</i> POS	- / <i>Campylobacter</i> POS	- / NEG
9a	9b	NEG / NEG	- / NEG	- / NEG	- / Monistumista
10a		NEG	NEG	- / -	NEG
11a	11b	NEG / NEG	NEG / -	- / -	NEG / -
12a	12b	NEG / <i>Salmonella</i> POS	NEG / -	- / -	NEG / -
13a	13b	NEG / <i>Y. enterocol.</i> + <i>Salm.</i> POS	NEG / <i>Salmonella</i> POS	- / <i>Salmonella</i> POS	- / Monistumista
14a	14b	NEG / <i>Salmonella</i> POS	- / NEG	- / <i>Salmonella</i> POS	- / NEG
15a	15b	NEG / <i>Salmonella</i> POS	- / <i>Salmonella</i> POS	- / <i>Salmonella</i> POS	- / Monistumista
16a	16b	NEG / <i>Salmonella</i> POS	NEG / -	- / -	NEG / -
17a	17b	NEG / <i>Salmonella</i> POS	NEG / -	- / -	NEG / -
18a	18b	<i>Salmonella</i> POS/NEG	- / NEG	- / -	- / NEG
19a	19b	NEG / <i>Salmonella</i> POS	NEG / -	- / -	NEG / -

Tulosten varmistamiseksi kehitetyllä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä monistuneet PCR-tuotteet lähetettiin sekvensoitavaksi ja näytteiden tutkimustulokset pyydettiin Mehiläisestä. Taulukkoon 21 on koottu näytteistä saadut viralliset tulokset. Vain yhden potilaan ulostenäytteestä (1a/b) oli tehty nukleiinihappomääritys (F-baktVIP), muut näytteet on testattu eri bakteeriviljelymenetelmillä. Kolmen potilaan näytteistä oli tutkittu myös parasiitit. Tulosten mukaan yksi näyte oli *Salmonella*-positiivinen (13a/b) ja kahdesta näytteestä löytyi parasiitteja (1a/b ja 13a/b). Sekventointitulosten perusteella kaikki monistustuotteet olivat epäspesifistä monistumista. Monistuneiden tuotteiden koot vaihtelivat 741 bp:n ja 964 bp:n välillä. Forward-alkukkeen monistamat sekvenssit analysoitiin

NCBI:n BLAST® -verkko-ohjelmalla. Näytteiden 1b ja 2b monistustuotteet kuuluivat sekvensointitulosten perusteella *Adenovirus C*:lle ja näytteiden 6b, 7b, 9b ja 13b monistustuotteet joko *Pseudomonas fluorescens* tai *Pseudomonas simiae*. Näytteiden 5b ja 15b monistustuotteita ei löytynyt NCBI:n tietokannasta. Sekvensointitulokset on esitetty taulukossa 22.

Taulukko 21. Kliinisten näytteiden tutkimustulokset

Näyte	Tulos (Mehiläinen)
1a/1b	F-baktVIP NEG, F-baktVi1 NEG, F-AmebVR POS (<i>Dientamoeba fragilis</i>)
2a/2b	F-baktVi1 NEG
5a/5b	F-baktVi1 NEG, F-para NEG
6a/6b	F-baktVi1 NEG
7a/7b	F-salmVi NEG, F-shigVi NEG, F-yersVi NEG
9a/9b	F-baktVi1 NEG, F-para NEG
13a/13b	F-baktVi1 NEG, F-salmVi POS, F-para POS (<i>Blastocystis hominis</i>)
15a/15b	F-baktVi NEG

Taulukko 22. Sekvensoinnin tulokset

Näyte	Sekvenssin pituus (bp)	Organismi
	Aluke: Forward/Reverse	
1b	931/885	<i>Adenovirus C</i>
2b	935/685	<i>Adenovirus C</i>
5b	970/754	-
6b	922/912	<i>P.fluorescence, P.simiae</i>
7b	881/526	<i>P.fluorescence, P.simiae</i>
9b	748/888	<i>P.fluorescence, P.simiae</i>
13b	931/894	<i>P.fluorescence, P.simiae</i>
15b	964/872	-

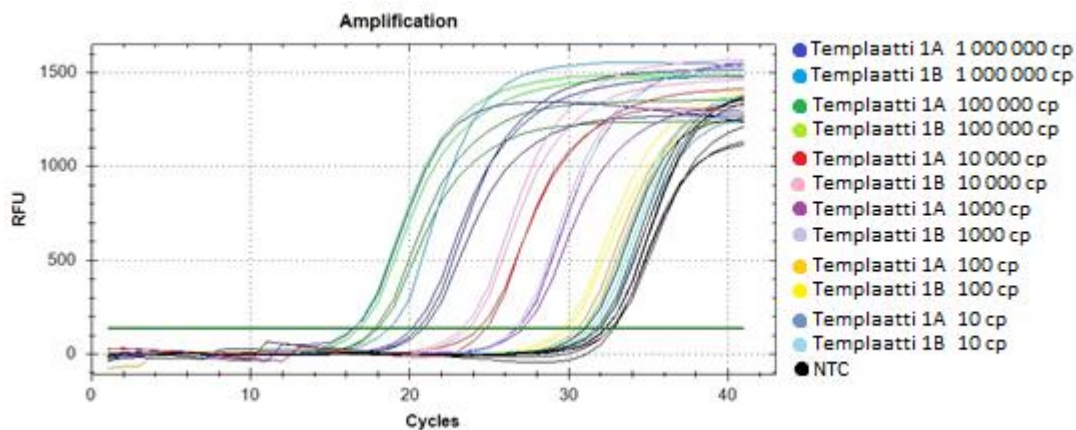
Tulosten perusteella voidaan todeta, ettei yksikään kliininen ulostenäyte ollut *Y.enterocolitica*-positiivinen. Näin ollen ei kehitetyn reaaliaikaisen qPCR-menetelmän selektiivisyyttä voida *Y.enterocolitica*-positiivisten näytteiden puuttuessa arvioida. Sen sijaan havaittiin, että menetelmällä on mahdollista saada väärä positiivinen tulos, vaikka alukkeet suunniteltiin spesifiseksi *Y.enterocolitica*:lle. Toisaalta kontaminaationkaan mahdollisuutta ei voida poissulkea. Epäspesifisen monistumisen vuoksi menetelmä vaatii lisätestausta selektiivisyyden suhteen. Ajotulokset kliinisistä näytteistä on esitetty liitteessä 5.

7.4 Reaaliaikainen qPCR-menetelmä II

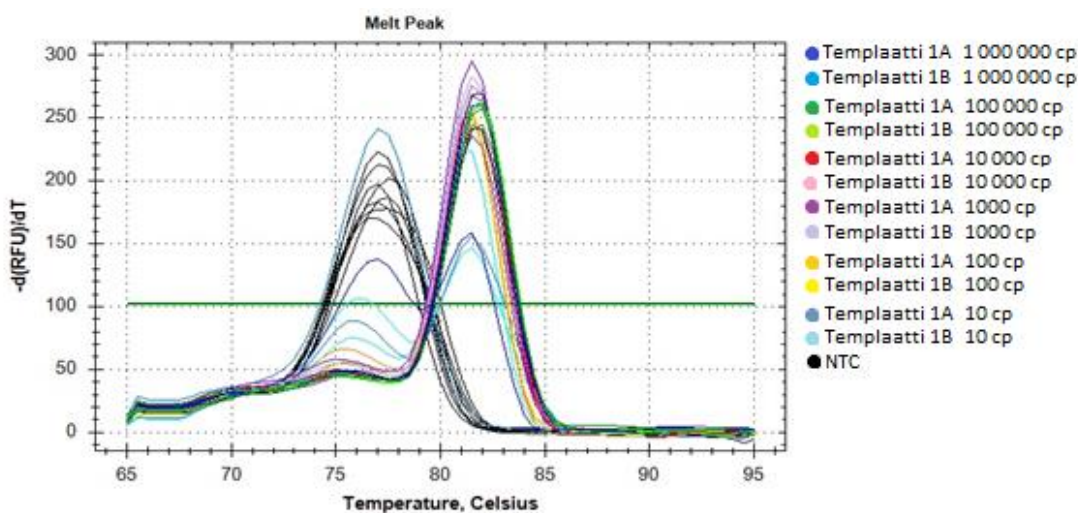
Reaaliaikaista qPCR-menetelmää II lähdettiin testaamaan ajatuksella, että erillisistä komponenteista rakennettua reaaliaikaista qPCR-menetelmää olisi helpompi optimoida, mikäli toimivan reaaliaikaisen qPCR-menetelmän kehittäminen yksinkertaisemmalle PCR-reagenssipakkaukselle osoittautuisi haastavaksi. Ensimmäisellä testauskerralla saadut tulokset varmistettiin toistamalla koe sen jälkeen, kun ensimmäisen testin templaatti-DNA:n konsentraation huomattiin olevan oletettua matalampi.

DyNAzyme II -entsyymille rakennettu reaaliaikainen qPCR-menetelmä tuotti runsaasti epäspesifistä monistumista siitä huolimatta, että optimointiin oli valittu parhaiten toimivat alukeparit D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14. D.Hhoff 14 -alukkeet eivät monistaneet haluttua tuotetta ollenkaan, mutta alukedimeerejä muodostui runsaasti. D.Hhoff 9 -alukkeet monistivat haluttua tuotetta kun templaattimäärä reaktioissa oli 50 000 ja 5 000 kopiota. Kaikissa muissa reaktioissa muodostui pelkästään alukedimeerejä. Kummankin alukeparin kohdalla alukedimeerejä muodostui myös negatiivisissa kontrolleissa.

Koe toistettiin vielä D.Hhoff 9 -alukkeilla käyttäen kahta eri *Y.enterocolitica* 6471/71 -templaattia (1A, 1B). Verrattuna ensimmäiseen kokeeseen tulokset paranivat huomattavasti. Haluttua tuotetta monistui kymmenen kopion herkkyyteen saakka, mutta epäspesifistä monistumista oli havaittavissa edelleen. Epäspesifistä monistumista tapahtui kahdessa näytteessä, joista kummankin näytteen rinnakkaisnäytteet monistivat ainoastaan spesifistä tuotetta. Kokeessa esiintyi kuitenkin sama ongelma, kuin ensimmäiselläkin kerralla; kaikki negatiiviset kontrollit nousivat. DNA-kontaminaatio pystyttiin poissulkemaan, sillä samaa templaattia käytettiin myös muissa kokeissa, joissa negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisina. Tässä menetelmässä alukedimeerejä muodostui todella runsaasti, ja sulamispiekit olivat intensiteetiltään samaa tasoa oikeiden tuotteiden sulamispiekkien kanssa. Epäspesifisen tuotteen sulamispiekkien lämpötila oli 77 °C, halutun tuotteen sulamislämpötilan ollessa 82 °C. Monistuskäyrä on esitetty kuvassa 19 ja sulamispistekäyrä kuvassa 20. Menetelmällä II saatuja tuloksia verrattiin ensimmäisellä menetelmällä saatuihin tuloksiin, ja merkittävästi runsaammasta alukedimeereiden muodostumisesta johtuen menetelmää II ei lähdetty optimoimaan. Päätökseen vaikutti myös menetelmän I helppokäyttöisyys.



Kuva 19. Monistuskäyrä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä II tehdystä toisesta kokeesta



Kuva 20. Sulamispistekäyrä reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä II tehdystä toisesta kokeesta. Kuvasta voidaan havaita alukedimeerien muodostuminen myös negatiivisista kontrollinäytteistä (NTC).

7.5 Tulosityhteenveto

Opinnäytetyössä kehitettiin *Y.enterocolitican* tunnistamista varten yksi reaaliaikainen qPCR-menetelmä ja testattiin neljää valmista PCR-tekniikkaan perustuvaa menetelmää. Referenssimenetelmän kehitysvaiheessa suunniteltuja alukkeita testattiin menetelmillä I ja II, joista menetelmä I oli suunniteltu mahdollisimman helpokäyttöiseksi ja menetelmä II siten, että reaktion eri komponentit olisivat helposti optimoitavissa, mikäli menetelmän I optimoiminen osoittautuisi hankalaksi. Suunniteltuja menetelmiä testattaessa mene-

telmä I todettiin jo lähtökohtaisesti menetelmää II toimivammaksi ja helpommaksi menetelmäksi. Menetelmän II optimoinnille ei näin ollen nähty tarvetta ja menetelmä I kehitettiin referenssimenetelmäksi. Käytettäviksi alukkeiksi päätyivät D.HHoff 9 -alukkeet. Alukkeiden sekvenssit on esitetty liitteessä 6.

Referenssimenetelmäksi kehitetyn reaaliaikaisen qPCR-menetelmän alukkeet suunniteltiin genomiselle *ail*-geenille, joka on spesifinen geeni patogeenisille *Y.enterocolitica*-kannoille. Kantakattavuustesti osoitti alukkeiden monistavan ainoastaan patogeeniset *Y.enterocolitica*-kannat. Apatogeenisiksi oletettu *Y.enterocolitica*-kanta ei monistunut, kuten eivät *Y.pseudotuberculosis*-kannatkaan. Ristireaktiotestauksissa ei havaittu epäspesifistä monistumista, eikä toisen bakteerin läsnäolo inhiboinut reaktiota.

Kehitetyn menetelmän toteamisraja eristetyille, puhtaalle *Y.enterocolitica*-templaatile on kymmenen kopiota. Templaattimäärän ollessa viisi kopiota kaikista rinnakkaisnäytteistä ainakin toinen monistui. Monistuminen templaattilaimennossarjoilla on ollut yhdenmuukaista ja lineaarista.

Koska kliinisiä *Y.enterocolitica*-positiivisia näytteitä ei ollut, ei menetelmän herkkyyttä kliinisten näytteiden suhteen pystytty tarkastelemaan. *Y.enterocolitica*-negatiivisilla kliinisillä näytteillä pystyttiin kuitenkin osoittamaan, ettei häiritsevää tausta vaikuttanut näytteeseen lisätyn *Y.enterocolitican* monistumiseen testatuilla templaattimäärillä (100–10 000 kopiota). Kliinisillä näytteillä havaitun epäspesifisen monistumisen vuoksi menetelmä vaatii kuitenkin lisätestausta selektiivisyyden suhteen. On todennäköistä, että epäspesifinen monistuminen johtuu näytemuodosta, sillä kaikki epäspesifinen monistuminen tapahtui purkinäytteistä eristetyillä DNA-näytteillä. Purkinäytteestä eristetyssä DNA:ssa on epäpuhtauksia geelitikkunäytteestä eristettyä DNA:ta enemmän, jolloin alukkeiden epäspesifisen sitoutumisen todennäköisyys kasvaa. Kontaminaation mahdollisuutta ei kuitenkaan voida poissulkea. Jotta näytteenottotavan merkitystä tuloksiin voitaisiin tutkia ja vertailla, tarvittaisiin *Y.enterocolitica*-positiivisia näytteitä testattavaksi.

Referenssimenetelmäksi kehitetyn reaaliaikaisen qPCR-menetelmän reagenssien lopukonsentraatiot ja valmis ajo-ohjelma on esitetty taulukossa 23. D.Hhoff 9 -alukkeilla monistuvan tuotteen pituus on 114 bp ja sen sulamispiste on noin 83 °C. Menetelmää käytettäessä monistuvan tuotteen sulamispiste tulee aina varmistaa ajo-ohjelmaan kuuluvalla sulamispisteanalyysillä, sillä on mahdollista, että purkinäytteestä eristetty DNA

saattaa sisältämiensä epäpuhtauksien suuren määrän takia johtaa epäspesifisten tuotteiden monistumiseen. Tuloksia tarkastellessa on huomioitava, ettei menetelmää ole validoitu, ja tuloksista tehdyt johtopäätökset ja parametrien arvot ovat viitteellisiä.

Taulukko 23. Referenssimenetelmäksi kehitetyn reaaliaikaisen qPCR-menetelmän ajo-ohjelma ja reagenssien loppukonsentraatiot. Reaktiivilavuuteen 25 µl päästään käyttämällä RNAasi-vapaata vettä.

Reagenssi	Loppukonsentraatio
Alukkeet (D.Hhoff 9)	0,2 µM
HotStar MasterMix	1x
MgCl ₂	4,0 mM
SYBR®Green	0,1x

Lämpötila C°	Aika	Syklit
95	15 min	x1
94	60 s	
57	60 s	x35
72	60 s	
72	10 min	x1
95	30 s	x1
65 to 95	0,5 C / 5 s	x1

Vertailumenetelmistä ainoastaan Antikaisen ym. kehittämää qPCR-menetelmää mukailtava qPCR-menetelmä saatiin toimimaan. Alkuperäinen qPCR-menetelmä on käytössä HUSLABin laboratorioissa, joten tähän menetelmään pohjautuvaa qPCR-menetelmää voitaisiin tarvittaessa käyttää referenssimenetelmänä. Alkuperäistä menetelmää olisi kuitenkin hyvä testata myös sellaisenaan. Menetelmää käytettäessä on huomioitava, ettei *virF*-geenialueelle suunnitelluilla alukkeilla pystytä erottamaan *Y.enteocoliticaa* ja *Y.pseudotuberculosisista* toisistaan. Alukkeet tunnistavat myös *Y.pestiksen*, mutta sen löytyminen kliinisistä näytteistä on hyvin epätodennäköistä. On myös muistettava *Yersinioille* tyypillinen plasmidikato, mistä johtuen tällä menetelmällä patogeenisen *Yersinian* todentaminen ei ole varmaa vaikka näyte sisältäisikin *Yersiniaa*.

8 Päätelmät

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli pystyttää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitys-osastolle kahdesta kolmeen nukleiinihappomonistukseen perustuvaa referenssimenetelmää patogeenisen *Y. enterocolitica*-bakteerin tunnistamiseen. Työ aloitettiin kirjallisuuskatsauksella, josta valittiin testattavaksi valmiita PCR-menetelmiä. Kun valmiista PCR-menetelmistä ei testausvaiheessa löytynyt tarkoitukseen sopivaa menetelmää, päädyttiin referenssimenetelmä suunnittelemaan itse.

Referenssimenetelmää varten suunniteltiin patogeenisille *Y. enterocolitica*-kannoille spesifiset alukkeet, ja pienellä optimoinnilla reaaliaikaisesta qPCR-menetelmästä saatiin kehitettyä toistettava ja herkkä menetelmä. *Y. enterocolitican* toteamisrajaksi saatiin kehitetyllä menetelmällä kymmenen kopiota. Ristireagoimista ei testattujen bakteereiden kanssa ilmennyt, eikä kliinisissä näytteissä ilmennyt reaktiota inhiboivia tekijöitä. Joidenkin kliinisten näytteiden kohdalla kuitenkin havaittiin epäspesifistä monistumista, joka todennäköisesti johtuu näytemuodosta, mutta kontaminaation mahdollisuutta ei pystytty poissulkemaan. Kliinisiin näytteisiin liittyvä epäspesifinen monistuminen vahvistaa menetelmään kuuluvan sulamispisteanalyysin merkityksen; monistuneen tuotteen spesifisyys tulee aina varmistaa sulamispisteanalyysillä epäspesifisen monistumisen poissulkemiseksi.

Kehitetty reaaliaikainen qPCR-menetelmä on potentiaalinen referenssimenetelmä *Y. enterocolitican* tunnistamiseen, mutta sen selektiivisyyttä ja toteamisrajaa kliinisillä näytteillä tulisi vielä testata ja validointi suorittaa loppuun. Lisäksi proben lisäämistä tulisi harjoitella, jolloin epäspesifistä monistumista ei välttämättä enää syntyisi.

Kehitetyn reaaliaikaisen qPCR-menetelmän luotettavuutta testattaessa havaittiin menetelmälle referenssimenetelmänä käytössä olleen Rida® Gene Bacterial Stool Panel (R-Biopharma) PCR-testimenetelmän antaneen tässä työssä epätoistettavia tuloksia, mutta syy tähän ei työn aikana selvinnyt. Tätä asiaa tulisi tarkastella lisää, sillä kaupallisella menetelmällä saadut väärät positiiviset tai negatiiviset tulokset saattavat haitata uusien testien kehittämistyötä.

Lähteet

- 1 Sihvonen, Leila M. 2014. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* in Finland, Identification and Epidemiology. National Institute for Health and Welfare (THL). University of Helsinki.
- 2 Lumio Jukka & Huovio Pentti. 2013. Yersinia-infektiot, yersinioosi. Verkkodokumentti. Duodecim. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00616](http://www terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00616)>. Luettu 22.3.2015.
- 3 Jaakola S., Lyytikäinen O., Rimhanen-Finne R., Salmenlinna S., Savolainen-Kopra C., Pirhonen J., Vuopio J., Jalava J., Toropainen M., Nohynek H., Toikkanen S., Löflund J-E., Kuusi M., Salminen M. Tartuntataudit Suomessa 2013. 2014. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- 4 Jaakola S., Lyytikäinen O., Rimhanen-Finne R., Salmenlinna S., Vuopio J., Roivanen M., Nohynek H., Löflund J-E., Kuusi M., Kuusi P. Tartuntataudit Suomessa 2012. 2013. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- 5 Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. 2007. European Food Safety Authority. The EFSA Journal (2007) 595, s. 1–30.
- 6 Hallanvuo S. 2009. Foodborne *Yersinia* – Identification and molecular epidemiology of isolates from human infections. National Institute for Health and Welfare. University of Helsinki.
- 7 Carniel E., Autenrieth I., Cornelius G., Fukushima H., Guinet F., Isberg R., Pham J., Prentice M., Simonet M., Skurnik M., Wauters G. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. 2006. The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma subclass. Springer.
- 8 Cornelis G., Boland A., Boyd A., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M-P., Stainier I. 1998. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. Microbiology and Molecular Biology reviews, 12/1998, s. 1315–1352.
- 9 Thisted Lambertz S. 2015. Development of a PCR-based method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pork. Swedish University of Agricultural Sciences.
- 10 Pierson D.E., Falkow S. 1993. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infection and Immunity, May 1993, s. 1846–1852.
- 11 Singh I., Viridi J. S. 2004. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of yst genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. Journal of Medical Microbiology, 53, s. 1065–1068.

- 12 Zheng H., Sun Y., Mao Z., Jiang B. 2008. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. Federation of European Microbiological Societies, Immunology and Medical Microbiology, 58, s. 368–374.
- 13 Leino R. 2013. Yersinioosi. Verkkodokumentti. Lääkäriin tietokannat, Duodecim. <http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00002&p_haku=yersinia>. Luettu 23.4.2015.
- 14 Bakteeri, viljely ja nukleiinihappo (kval), ulosteesta. 2015. Verkkodokumentti. HUSLAB, tutkimusohjekirja. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=21088&terms=f-bakteeri>. Luettu 23.4.2015.
- 15 Yersinia, vasta-aineet, laaja tutkimus (EIA ja agglutinaatio). 2015. Verkkodokumentti. HUSLAB, tutkimusohjekirja. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=20867&terms=s-yersabl>. Luettu 23.4.2015.
- 16 Thoerner P., Bin Kingombe C. I., Bögli-Stuber K., Fray J. 2002. PCR Detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. Applied and environmental microbiology, 69(3), s. 1810–1816.
- 17 RIDA®GENE Bacterial Stool Panel. 2015. Verkkodokumentti. R-Biopharm. <<http://www.r-biopharm.com/products/clinical-diagnostics/molecular-diagnostics/bacteria/item/ridagene-bacterial-stool-panel>>. Luettu 27.5.2015.
- 18 Mericon Y.enterocolitica kit. 2015. Verkkodokumentti. Qiagen. <<https://www.qiagen.com/at/products/catalog/assay-technologies/complete-assay-kits/food-safety-testing/mericon-y-enterocolitica-kit/>>. Luettu 27.5.2015.
- 19 Li H., Bhaduri S., Magee W. E. 1998. Maximizing plasmid stability and production of released proteins in *Yersinia enterocolitica*. Applied and environmental microbiology, 64(5), s. 1812–1815.
- 20 Logue C. M., Sherwood J. S., Doetkott C. 2006. Growth studies of plasmid bearing and plasmid cured *Yersinia enterocolitica* GER O:3 in the presence of cefsulodin, irgasan and novobiocin at 25 and 37C. Journal of applied microbiology, 100(6), s. 1299–1306.
- 21 Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M. J., Solera J. 2014. Real-time PCR detection chemistry. Invited critical review. Clinica Chimica Acta, 439, s. 231–250.
- 22 Maurin. 2014. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. Expert review of molecular diagnostics, 12(7), s. 731–754.
- 23 Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Research, 1997, 25(19), s. 3957–3958.

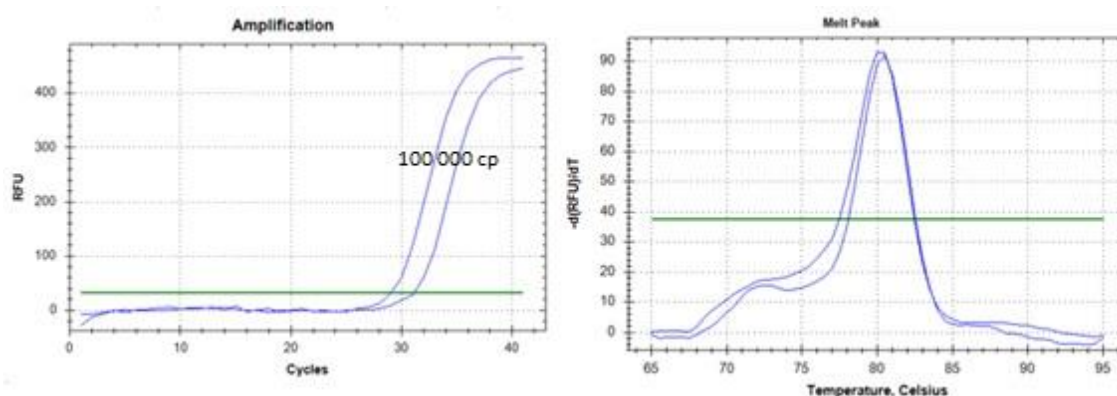
- 24 PCR Additives & Enhancers, Certificate of analysis & Product manual. 2014. Verkkodokumentti. GeneLink inc. <https://www.genelink.com/Literature/ps/M40-3021-PCR_Additives_Ver5.1.pdf>. Luettu 12.4.2015.
- 25 qPCR Guide. 2013. Verkkodokumentti. Eurogentec. <<http://www.eurogentec.com/uploads/qpcr-guide.pdf>>. Luettu 18.4.2015.
- 26 Suominen I., Pärssinen R., Haajanen K., Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Turun Ammattikorkeakoulu.
- 27 Antikainen J., Kantele A., Pakkanen S.H., Lääveri T., Riutta J., Vaara M., Kirveskari J. 2013. Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of 9 Pathogens Directly From Stools of Travelers With Diarrhea. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11, s. 1300–1307.
- 28 Thisted Lambertz S., Danielsson-Tham M-L. 2005. Identification and Characterization of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolates by PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, 07/2005, s. 3674–3681.
- 29 Ye YW., Ling N., Han YJ., Wu QP. 2014. Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the *virF* and *ail* genes. *Journal of Dairy Science*, 97(11), s- 6785–6791.
- 30 Weynants V., Jadot V., Deonel P.A., Tibor A., Letesson J-J. 1996. Detection of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:3 by a PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), s. 1224–1227.
- 31 Wren B., Tabaqchali S. 1990. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet* 336: 693.
- 32 Nakajima H., Inoue M., Mori M., Itoh K-I., Arakawa E., Watanabe H. 1992. Detection and identification of *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *Journal of clinical microbiology*. 09/1992, s. 2484–2486.
- 33 Calculator for determining the number of copies of a template. 2004. Verkko-ohjelma. URI Genomics & Sequencing Center. <<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>>. Luettu 20.2.2016.
- 34 Primer-BLAST. 2015. Verkko-ohjelma. National Center for Biotechnology Information. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Luettu 28.11.2015.
- 35 HotStarTaq® PCR Handbook. 2010. Qiagen.
- 36 User Guide: DyNAzyme II DNA Polymerase. 2014. Thermo Scientific.

Kirjallisuudesta testatut PCR-menetelmät

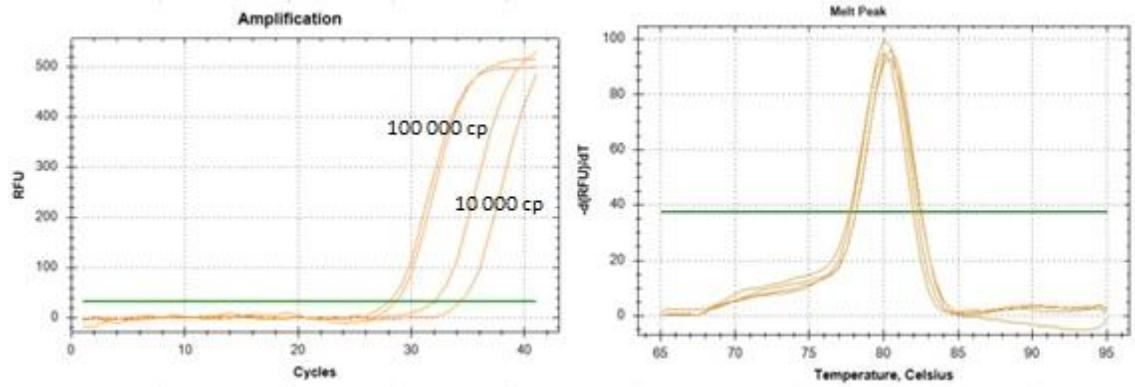
Tässä liitteessä on esitetty PCR-ajotiedostot kolmesta kirjallisuudesta kerätystä, mukailen testatusta PCR-menetelmästä. *Ail*-, *yst*- ja *virF*-geeneille suunnitellun reaaliaikaisen PCR-menetelmän ajodata on esitetty luvussa 7.1 "Tulokset ja tulosten tarkastelu".

qPCR-menetelmä *virF*-geenille

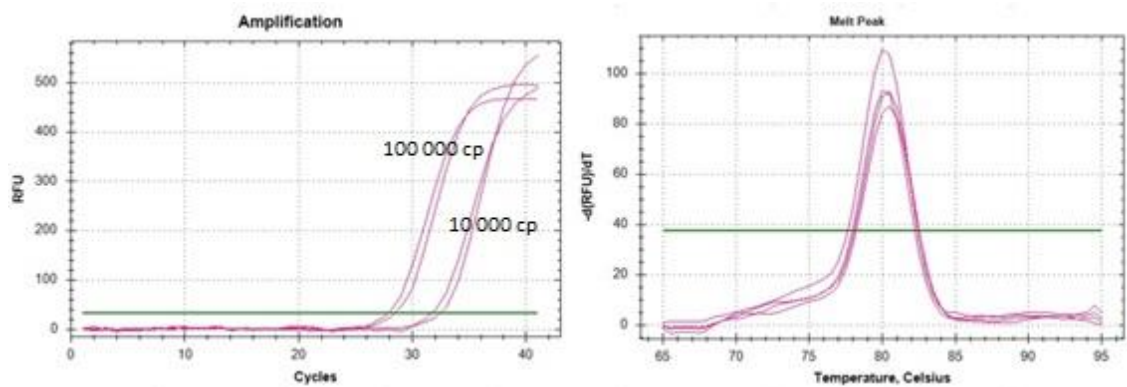
Antikaisen ym. artikkelissa [27] julkaistua monikohde-qPCR-menetelmää mukailevassa qPCR-menetelmässä käytettiin ainoastaan *Y. enterocolitica* 6471/76 (1B) -kantaan suunniteltuja *virF*-alukkeita. Kokeessa käytettiin templaattina *Y. enterocolitica* 6471/76 (1B) -kantaan, *Y. enterocolitica* puhdistettua pYV8081 -plasmidinäytettä, sekä kahta *Y. pseudotuberculosis*-kantaan (PB1, YPIII/pIB1). Käytettyjen templaattilaimennossarjojen plasmidimäärät olivat 100 000, 10 000, 1000 ja 100 kopiota.



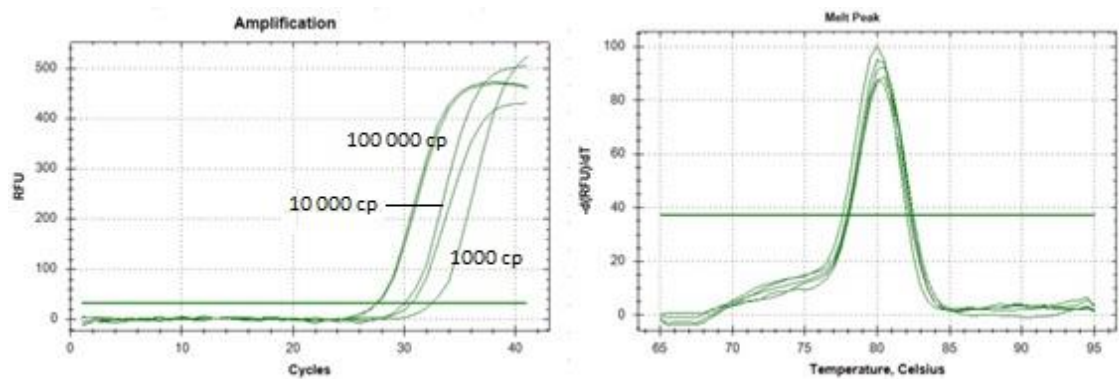
Kuva 1. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) -templaatin monistumisesta.



Kuva 2. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y.pseudotuberculosis* PB1 -templaatin monistumisesta.



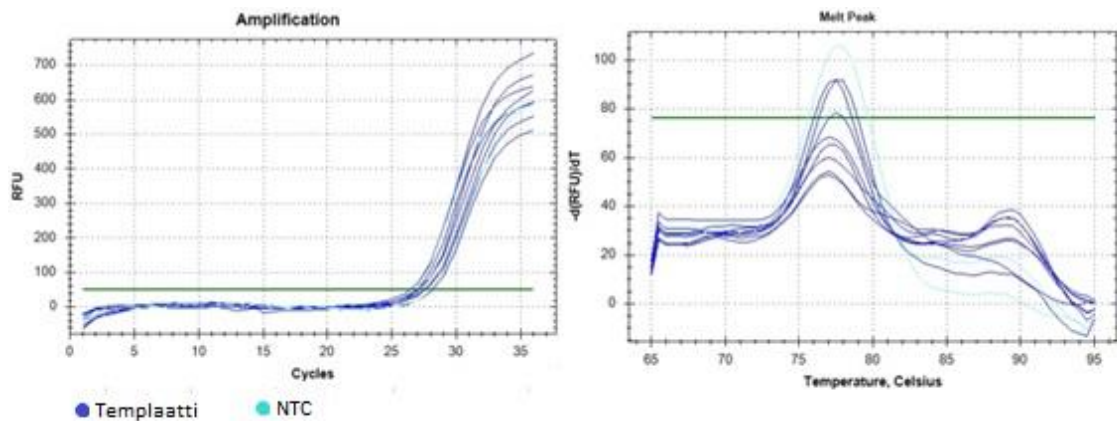
Kuva 3. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y.pseudotuberculosis* YPIII/pIB1 -templaatin monistumisesta.



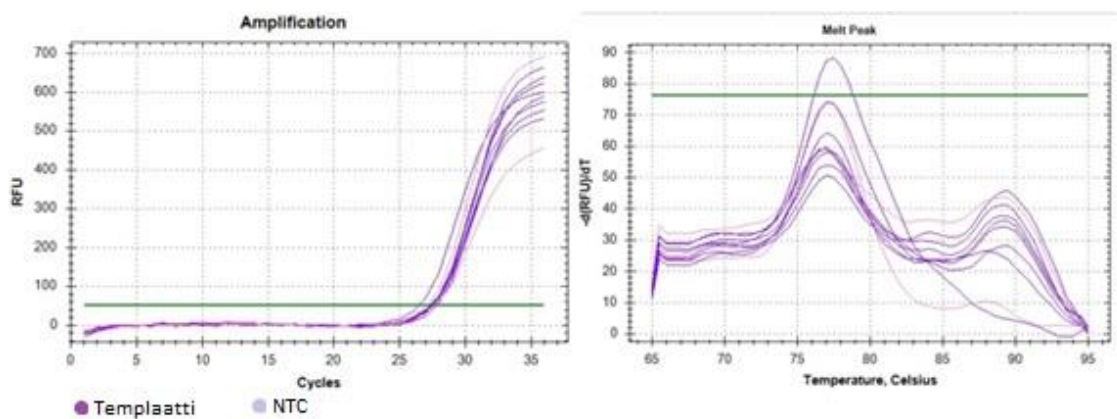
Kuva 4. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä plasmidiprepin (pYV8081) monistumisesta.

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*- ja *virF*-geneille (I)

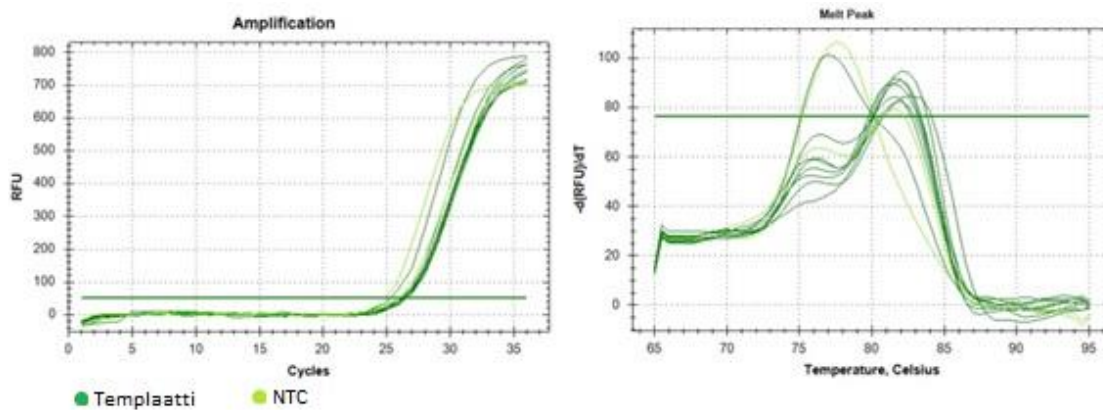
Testattu reaaliaikainen PCR-menetelmä perustui Yen ym. artikkelissa julkaistuun kaksi-kohde-PCR-menetelmään [29]. Alukkeina käytettiin *ail*- ja *virF*-geneille suunniteltuja alukkeita ja templaattina *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) ja Ruokola/71 -kannoista valmistettuja laimennossarjoja, joissa plasmidikonsentraatiot olivat 10 000, 1000, 100 ja 10 kopiota ja gDNA:n konsentraatiot 500, 50, 5 kopiota.



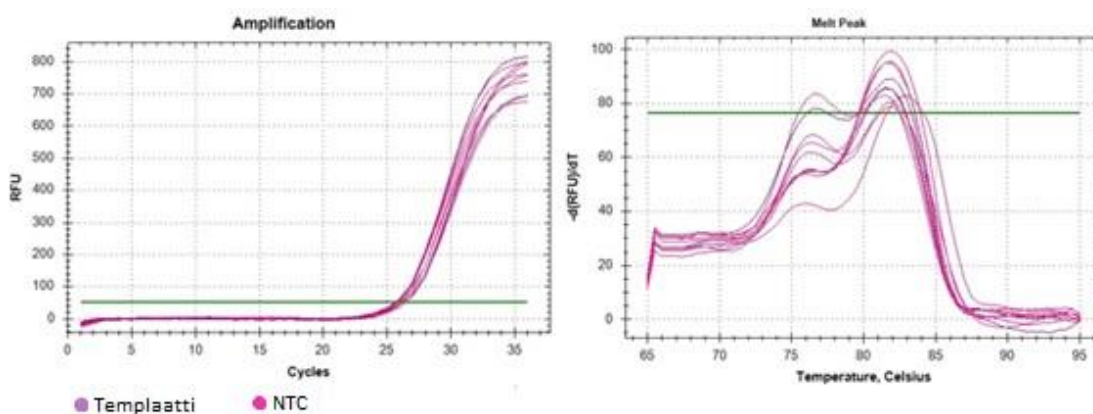
Kuva 5. *Ail*-geenille suunniteltujen alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) -templaattilla.



Kuva 6. *Ail*-geenialueelle suunniteltujen alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 8081 -templaattilla.



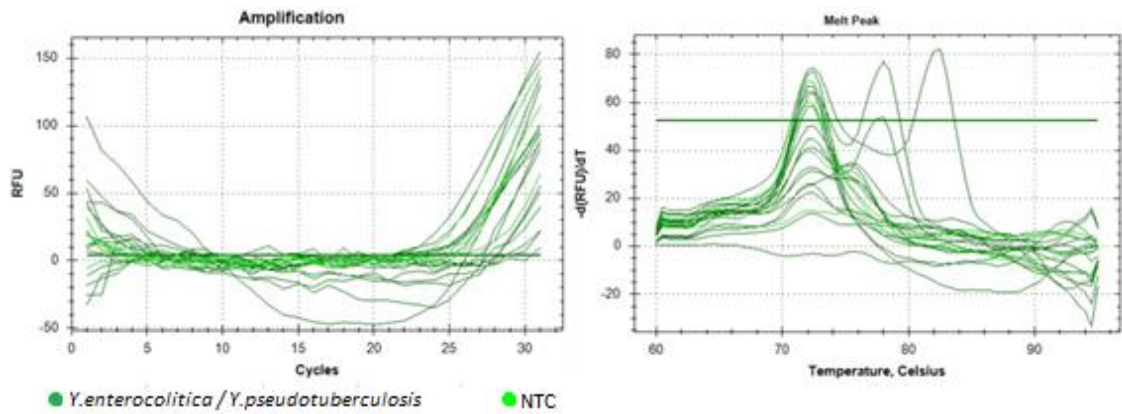
Kuva 7. *VirF*-geenialueelle suunniteltujen alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) -templaatilla.



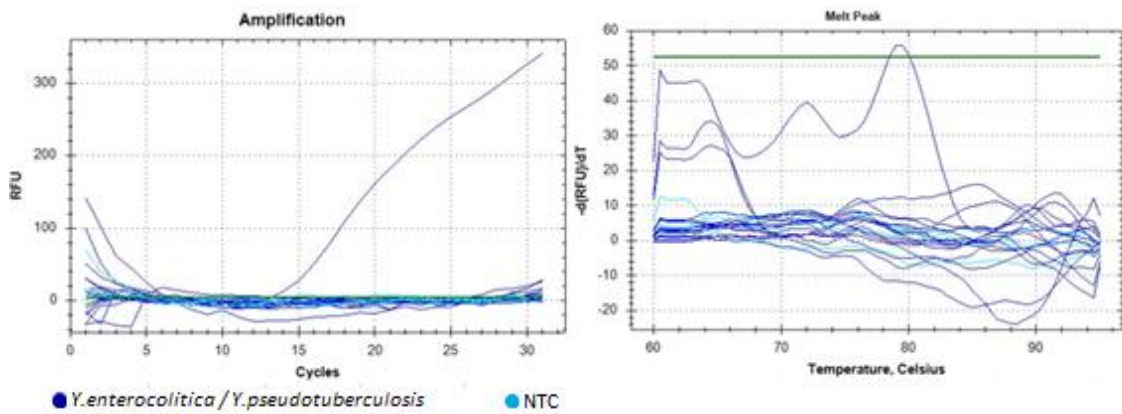
Kuva 8. *VirF*-geenialueelle suunniteltujen alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *Y. enterocolitica* 8081 -templaatilla

Reaaliaikainen PCR-menetelmä *ail*- ja *virF*-geeneille (II)

Weynantsin ym. julkaisemaa monikohde-PCR-menetelmää [30] testattiin alkuperäistä menetelmää mukaillen reaaliaikaisena PCR-menetelmänä. Alukkeina käytettiin *ail*- ja *virF*-geeneille suunniteltuja alukkeita ja templaattina käytettiin *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) -kanta sekä *Y. pseudotuberculosis* PB1 -kanta. Templaattilaimennossarjojen plasmidikonsentraatiot olivat 10 000, 1000, 100 ja 10 kopiota ja gDNA:n konsentraatiot 500, 50 ja 5 kopiota.



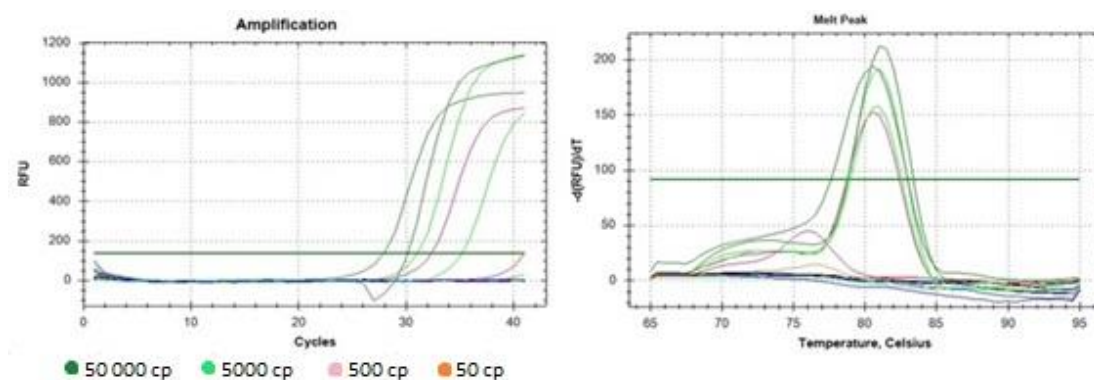
Kuva 9. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *ail*-geenialueelle suunnitelluilla alukkeilla. Käyrissä on esitetty monistuminen *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) ja *Y. pseudotuberculosis* PB1 -kannoilla. Vaaleanvihreät käyrät ovat negatiivisia kontrolleja.



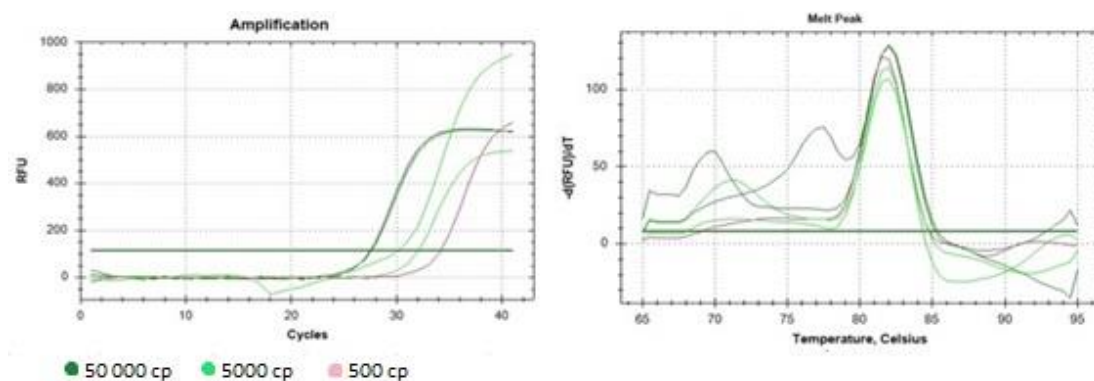
Kuva 10. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä *virF*-geenialueelle suunnitelluilla alukkeilla. Käyrissä on esitetty monistuminen *Y. enterocolitica* 6471/76 (1A) ja *Y. pseudotuberculosis* PB1 -kannoilla. Vaaleansiniset käyrät ovat negatiivisia kontrolleja.

Suunniteltujen alukkeiden testaus

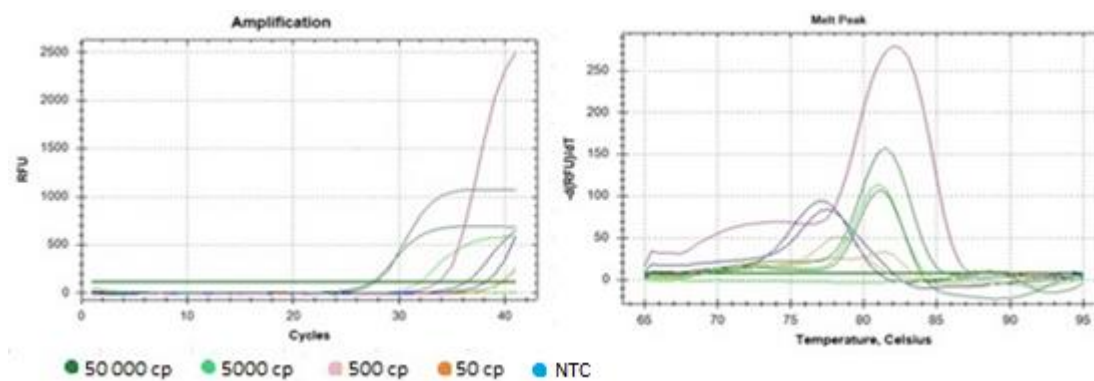
Liitteessä on esitetty PCR-ajotiedostoina alukkeiden monistaminen niille optimaalisimmissa annealing-lämpötiloissa.



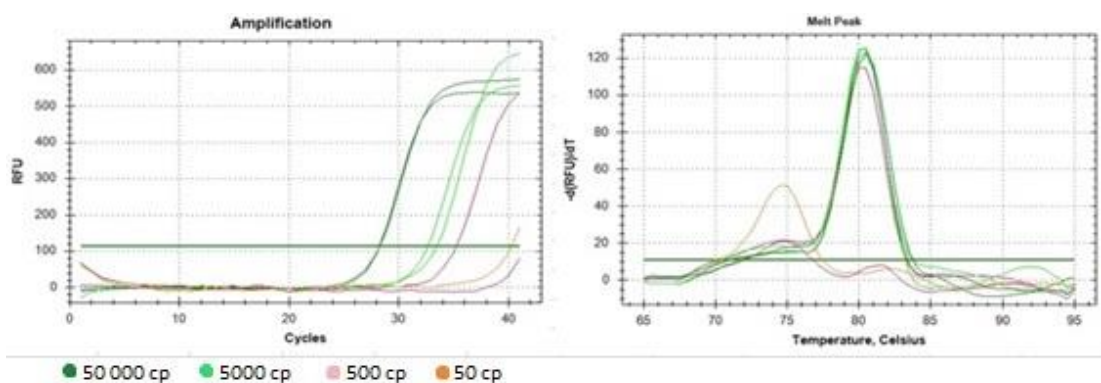
Kuva 1. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 56 °C. Templaattikopiomäärällä 500 muodostui alukedimeerejä.



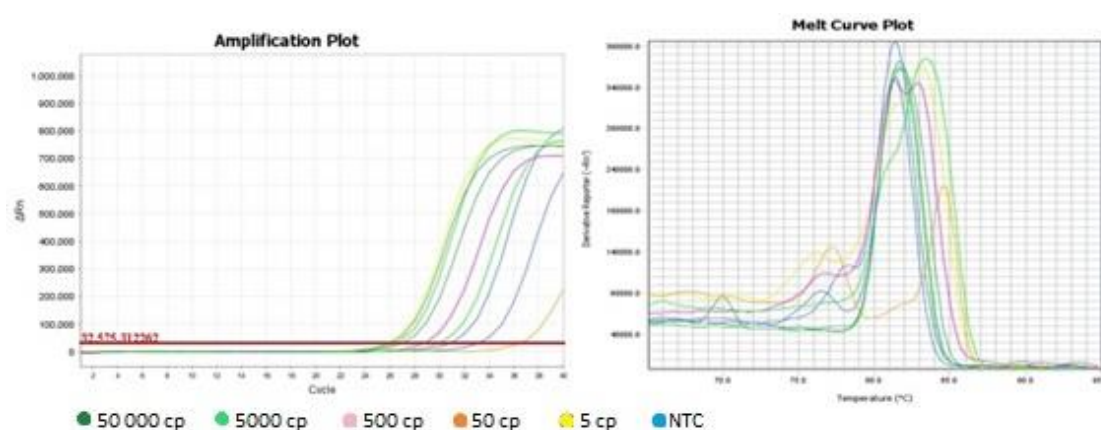
Kuva 2. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 57 °C



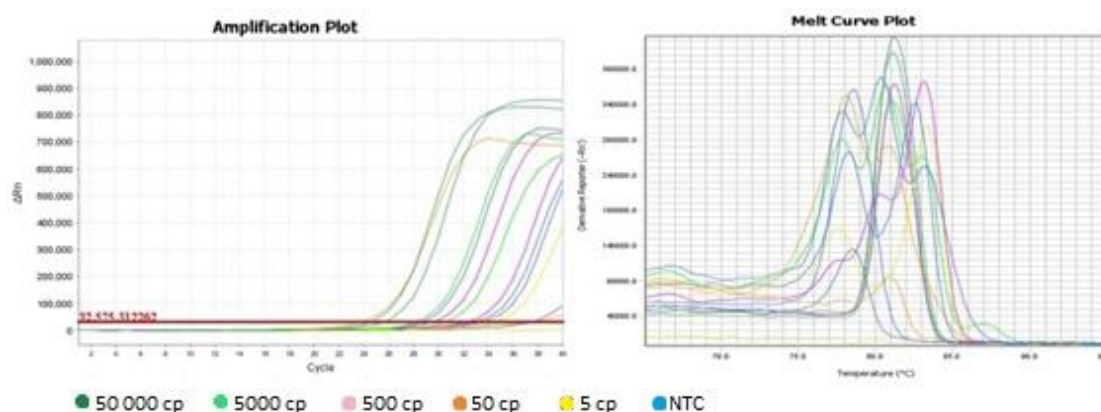
Kuva 3. D.Hhoff 11 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 57 °C. Negatiiviset kontrollit muodostivat alukedimeerejä.



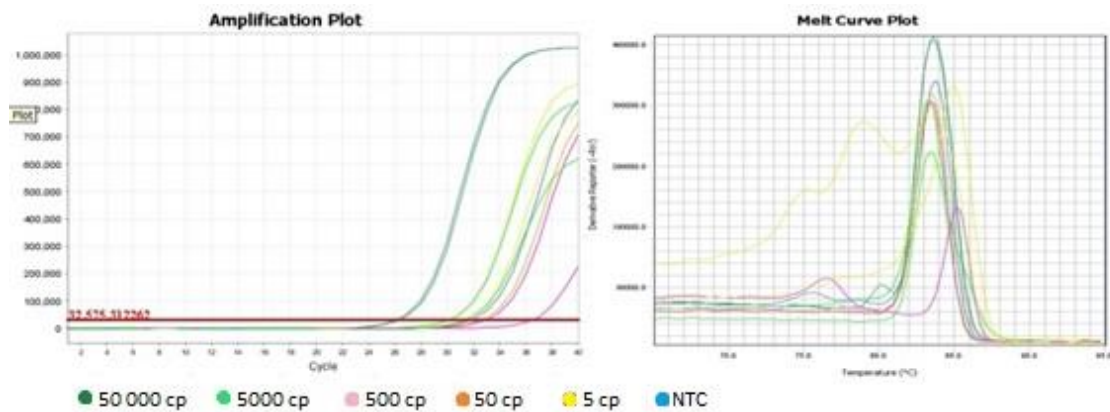
Kuva 4. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 57 °C. Templaattikopiomäärillä 500 ja 50 muodostui alukedimeerejä.



Kuva 5. D.Hhoff 11 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 58,5 °C. Epäspesifisiä tuotteita muodostui ja negatiiviset kontrollit monistuivat (alukedimeerejä).



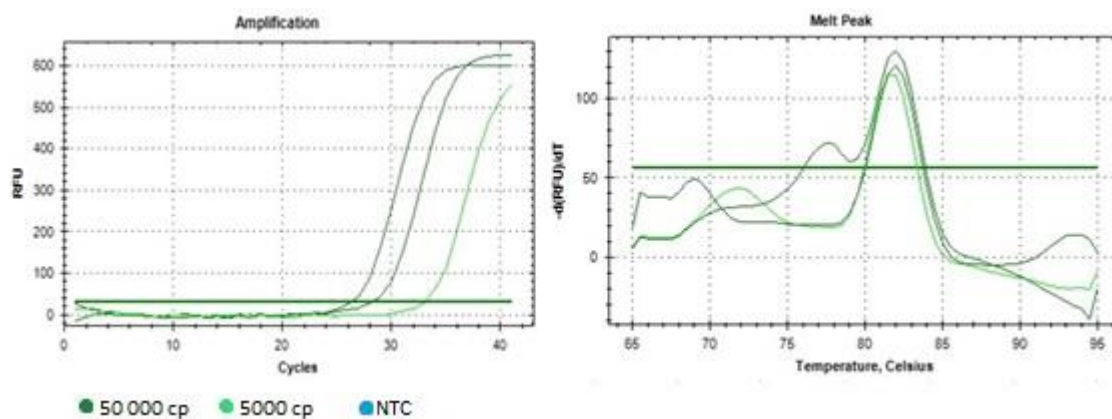
Kuva 6. D.Hhoff 13 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 58,5 °C. Monistuminen oli epäspesifistä ja alukedimeerejä muodostui myös negatiivisissa kontrolloissa.



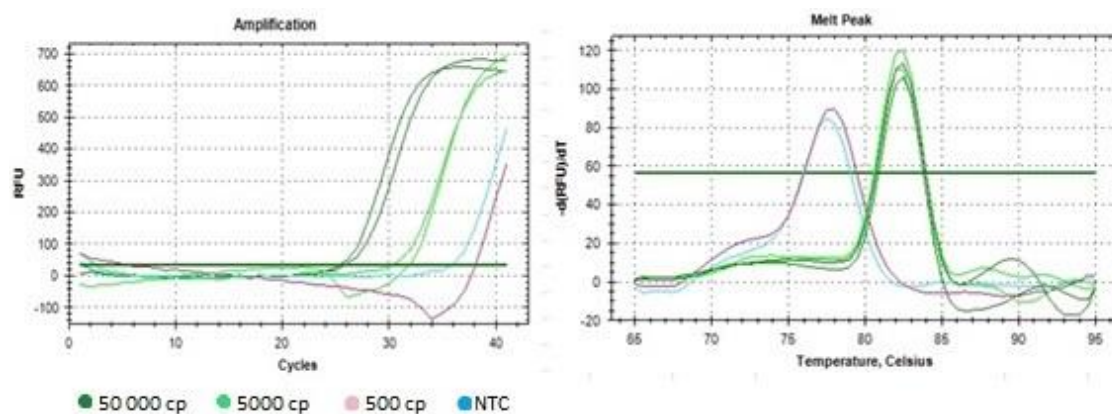
Kuva 7. D.Hoff 15 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä annealing-lämpötilassa 58,5 °C. Monistuminen oli epäspesifistä ja myös yhdessä negatiivisessa kontrollissa muodostui alukedimeerejä.

Magnesiumkonsentraation optimointi (ajotiedostot)

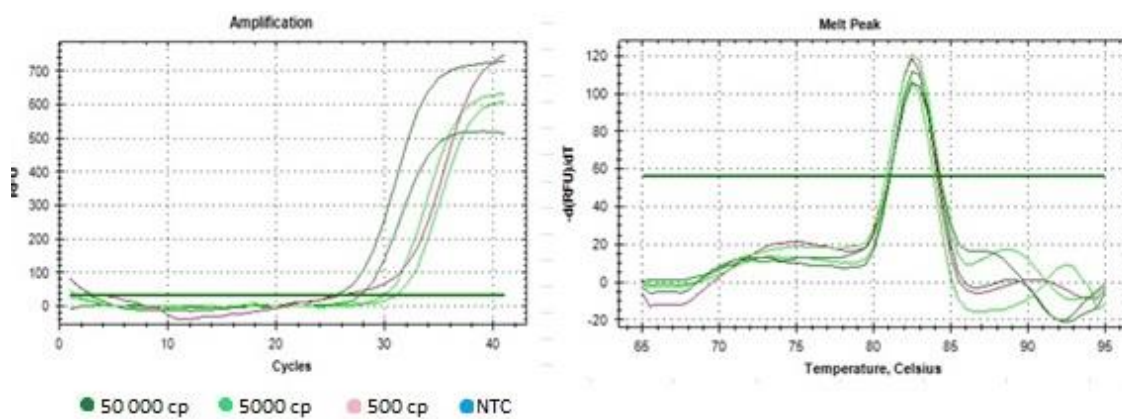
Liitteessä on esitetty PCR-ajotiedostot menetelmän I magnesiumkonsentraation optimoinnista alukkeille D.Hhoff 9 ja D.Hhoff 14.



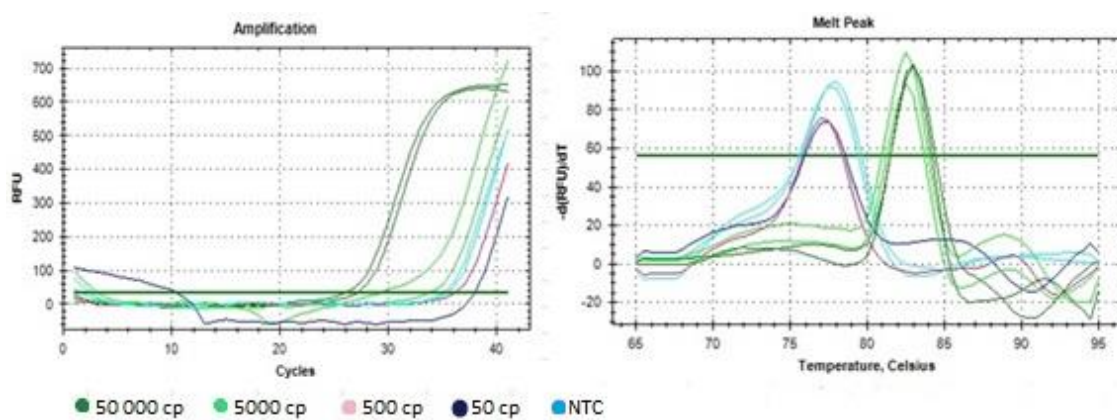
Kuva 1. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 1,5 mM.



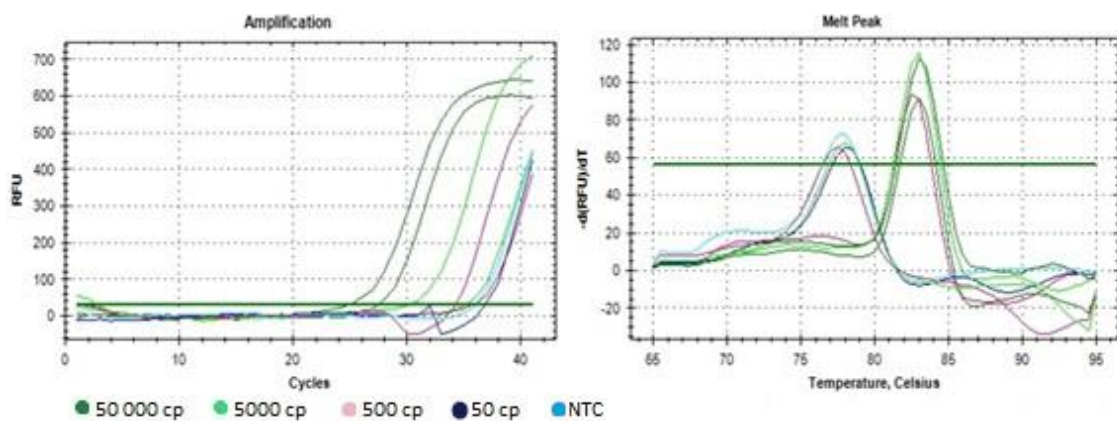
Kuva 2. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 2,0 mM.



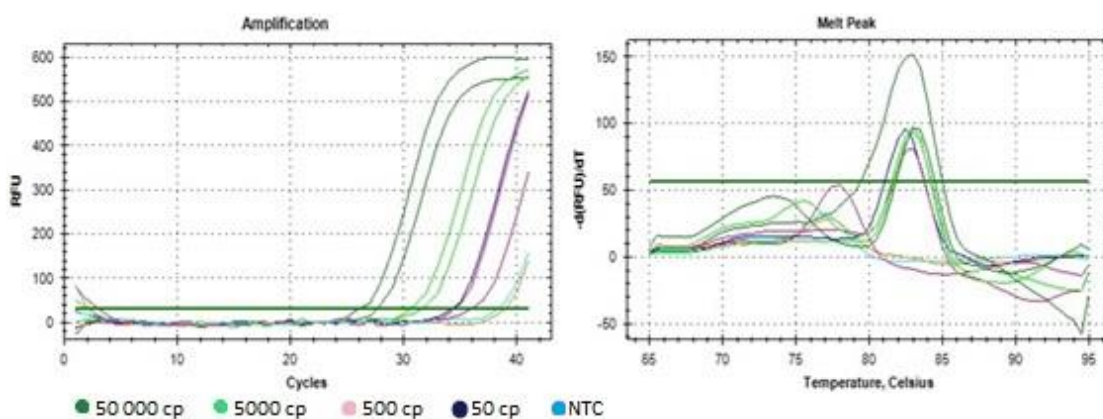
Kuva 3. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraati-
ossa 2,5 mM.



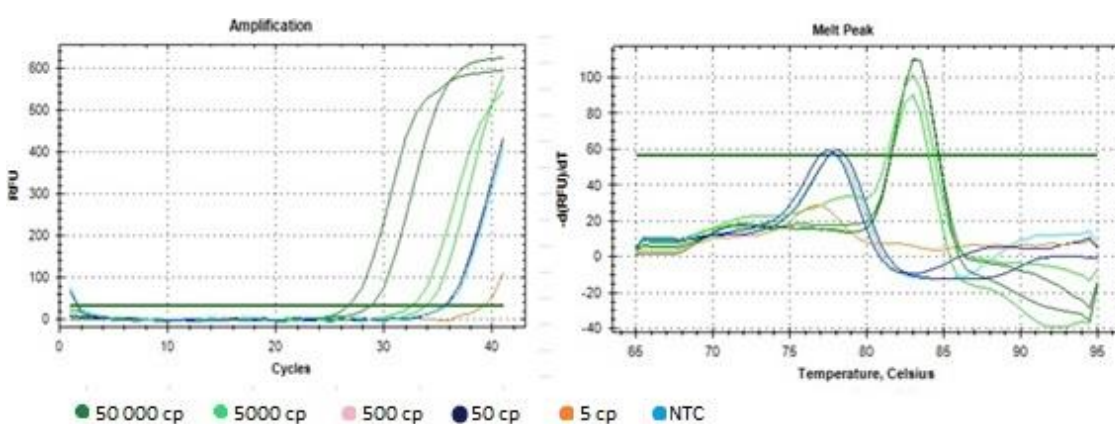
Kuva 4. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraati-
ossa 3,0 mM.



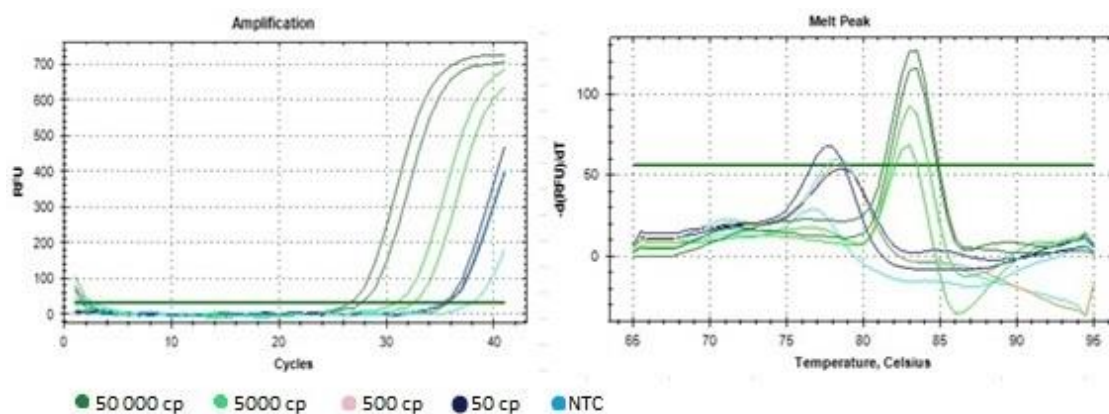
Kuva 5. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraati-
ossa 3,5 mM.



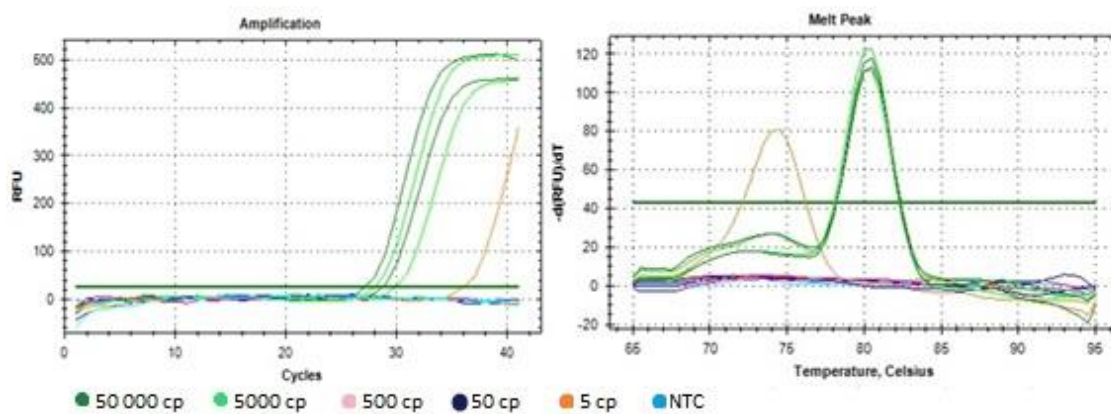
Kuva 6. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 4,0 mM.



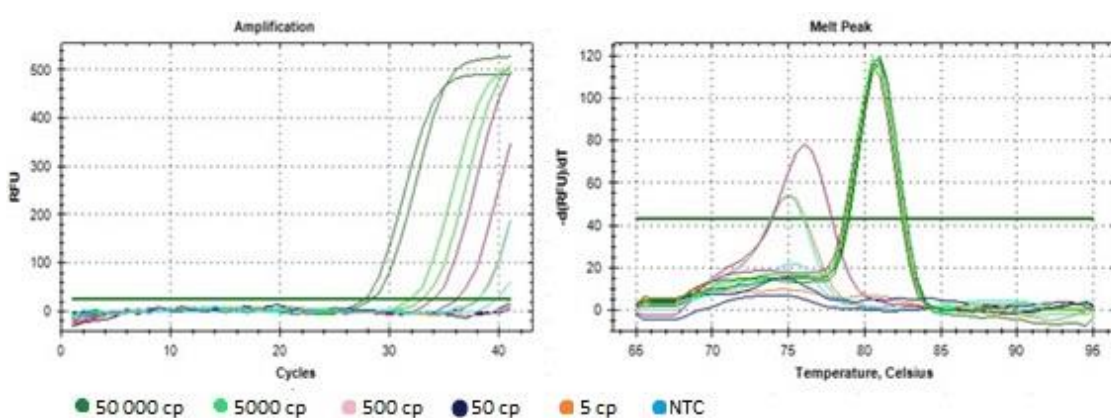
Kuva 7. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 4,5 mM.



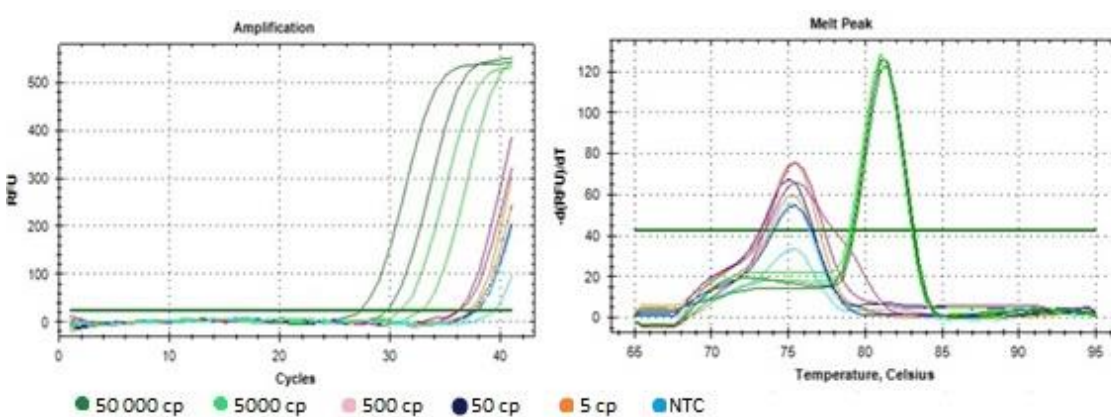
Kuva 8. D.Hhoff 9 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 4,5 mM.



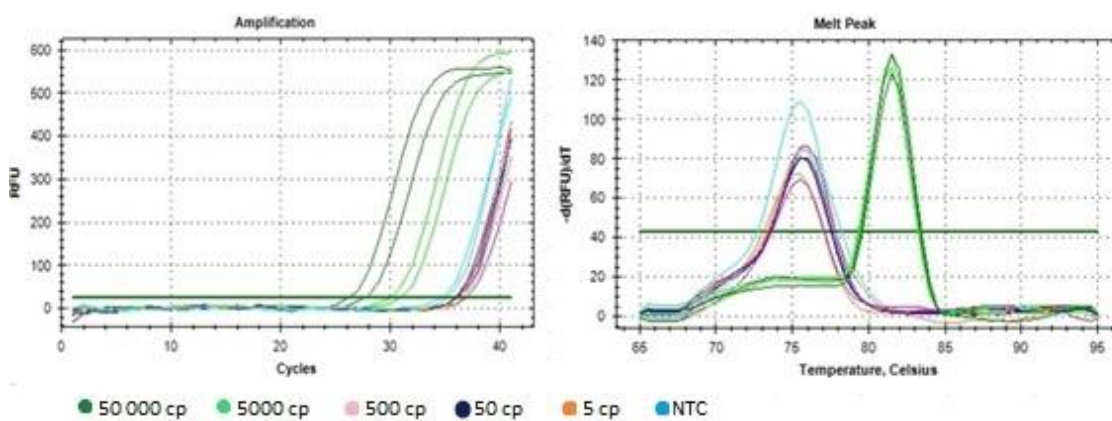
Kuva 9. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraati-
ossa 1,5 mM.



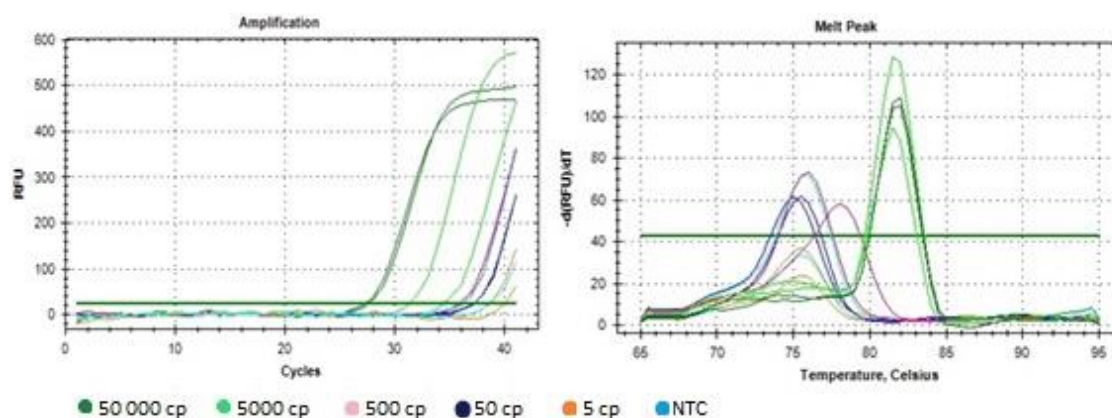
Kuva 10. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraati-
ossa 2,0 mM.



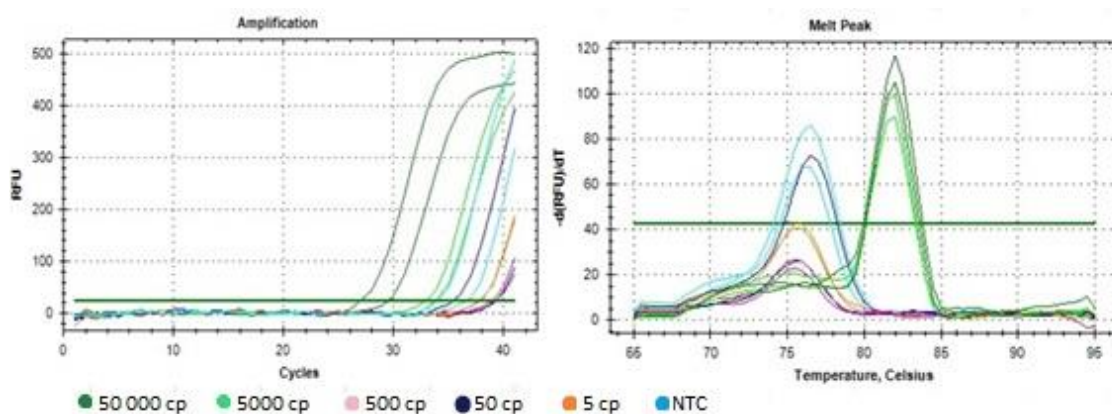
Kuva 11. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraati-
ossa 2,5 mM.



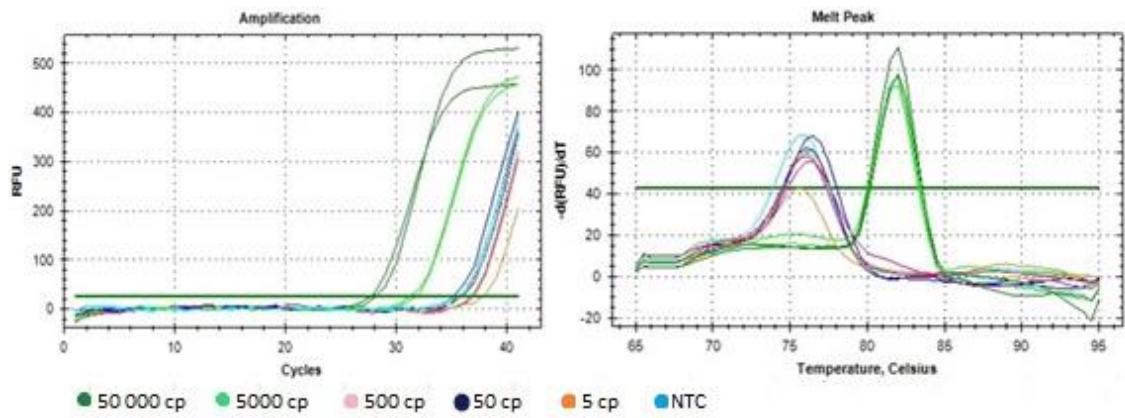
Kuva 12. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 3,0 mM.



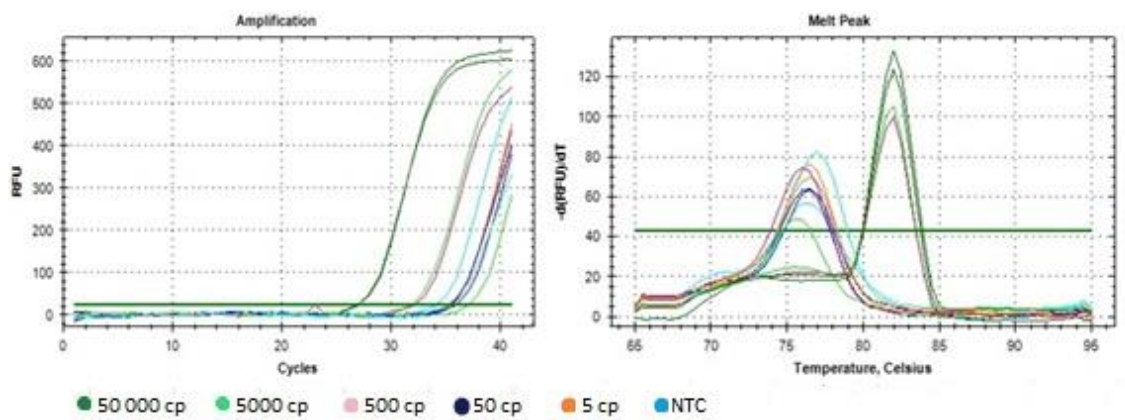
Kuva 13. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 3,5 mM.



Kuva 14. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 4,0 mM.



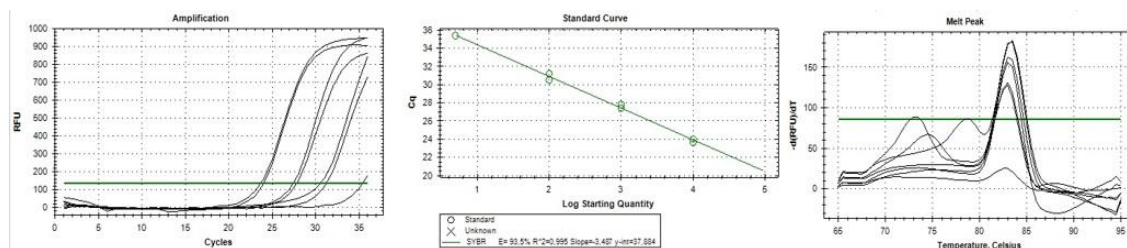
Kuva 15. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 4,5 mM.



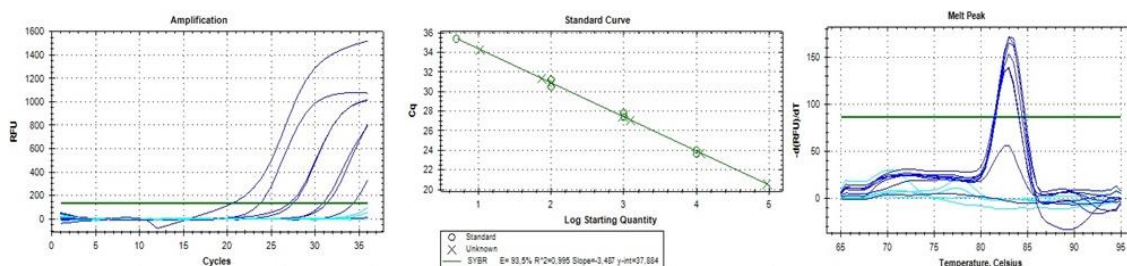
Kuva 16. D.Hhoff 14 -alukkeiden monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä magnesiumkonsentraatiossa 5,0 mM.

Ristireaktioiden testaus (ajotiedostot)

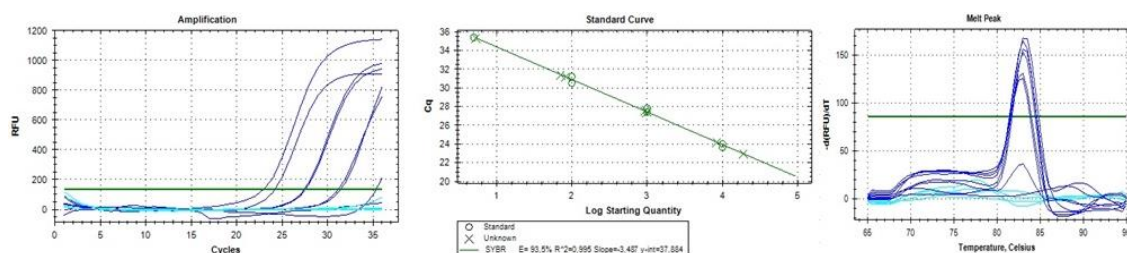
Liitteessä on esitetty ristireaktiotestauksen PCR-ajotiedostot. Koe tehtiin kahdessa ajossa BioRad CFX96 C1000 Touch -laitteella. Standardina on käytetty *Y.enterocolitica* 6471/76 (1B) -templaatin laimennossarjaa 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota.



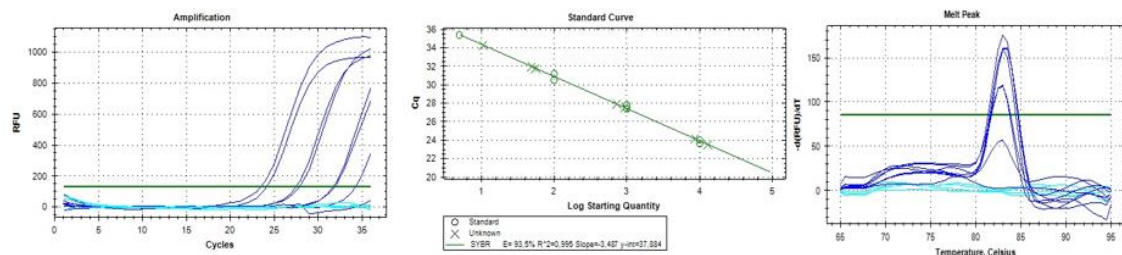
Kuva 1. Ensimmäisen osa-ajon standardien monistuskäyrä, standardisuora ja sulamispistekäyrä.



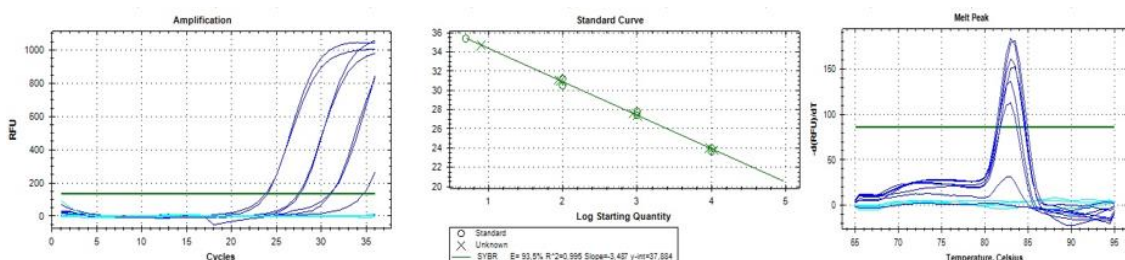
Kuva 2. *C.colin* ja *Y.enterocolitican* ristireaktiotestaus (ajo I). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tumman siniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *C.colia*.



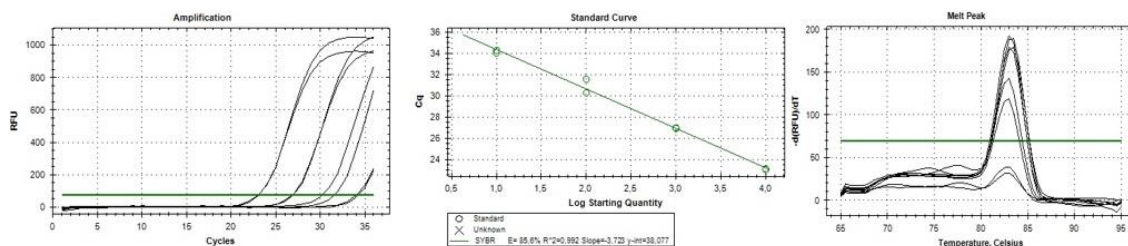
Kuva 3. *C.jejunin* ja *Y.enterocolitican* ristireaktiotestaus (ajo I). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tumman siniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *C.jejunia*.



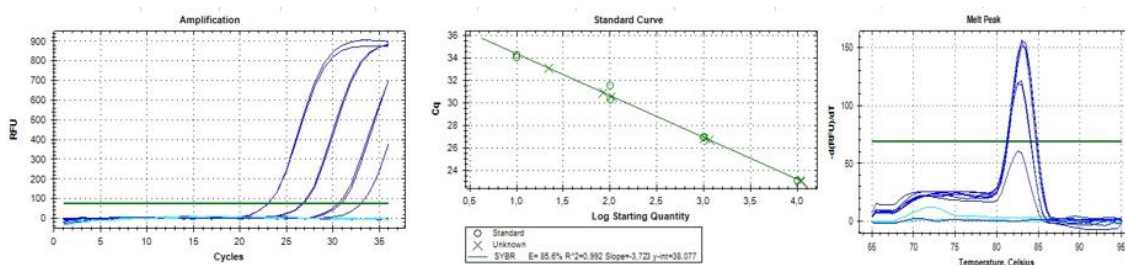
Kuva 4. *C.difficile*n ja *Y.enterocolitica*n ristireaktiotestaus (ajo I). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tummansiniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *C.difficile*-bakteeria.



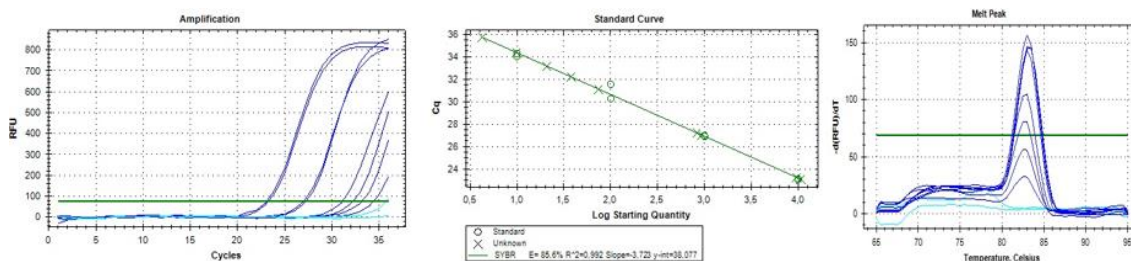
Kuva 5. *K.pneumoniae*n ja *Y.enterocolitica*n ristireaktiotestaus (ajo I). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tummansiniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *K.pneumoniae*-bakteeria.



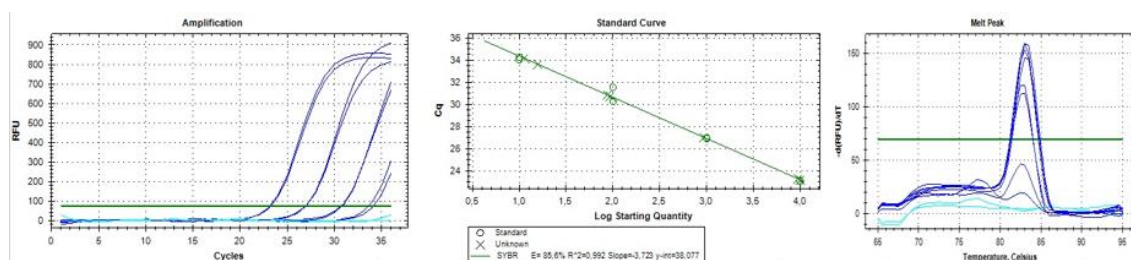
Kuva 6. Toisen osa-ajon standardien monistuskäyrä, standardisuora ja sulamispistekäyrä.



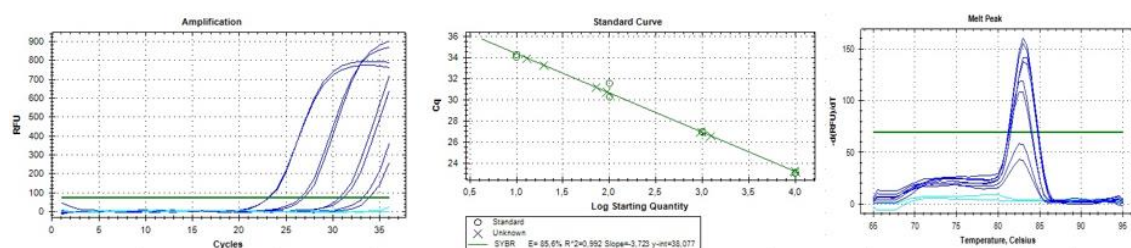
Kuva 7. *S.enteritidis*n ja *Y.enterocolitica*n ristireaktiotestaus (ajo II). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tummansiniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *S.enteritidis*-bakteeria.



Kuva 8. *S.typhimuriumin* ja *Y.enterocolitican* ristireaktiotestaus (ajo II). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tummansiniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *S.typhimurium*-bakteeria.



Kuva 9. *S.sonnein* ja *Y.enterocolitican* ristireaktiotestaus (ajo II). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tummansiniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *S.sonnei*-bakteeria.

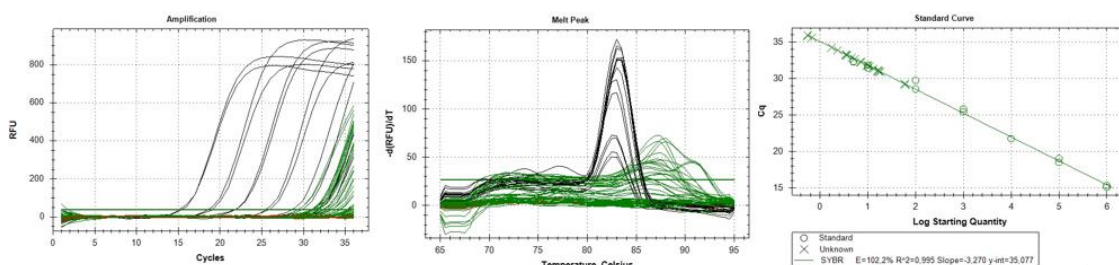


Kuva 10. *E.Colin* ja *Y.enterocolitican* ristireaktiotestaus (ajo II). Monistuskäyrä, *Y.enterocolitica*-templaatin monistumisen sijoittuminen standardisuoraan, sekä sulamispistekäyrä. Tummansiniset käyrät ovat reaktioista joissa mukana on kumpaakin bakteeria, vaaleansiniset käyrät ovat reaktioista joissa läsnä on vain *E.coli*-bakteeria

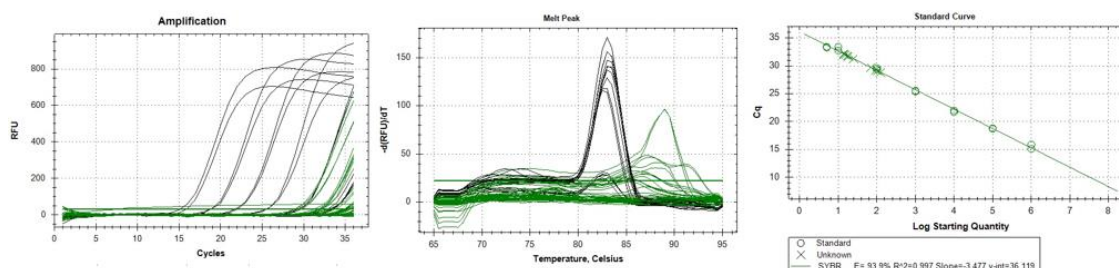
Reaaliaikaisen qPCR-menetelmän testaaminen kliinisillä näytteillä

Osa I

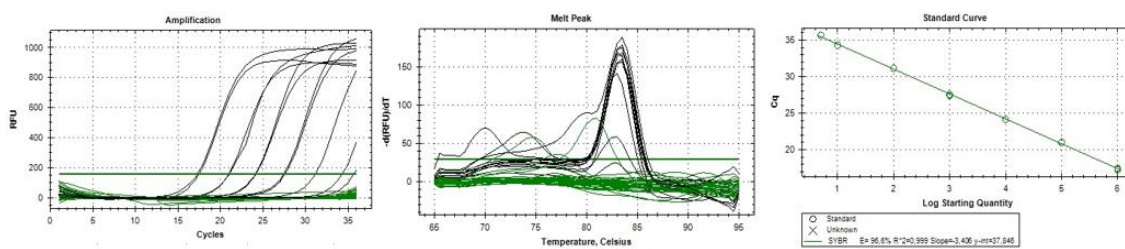
Liitteen ensimmäisessä osassa on esitetty PCR-ajotiedostot reaaliaikaisen qPCR-menetelmän testaamisesta kliinisillä näytteillä standardien ja monistuneiden näytteiden kohdalta. Ensimmäinen koe sisälsi kolme ajoa, joiden aikana kaikki kliiniset näytteet testattiin laimennossarjoin 1:1, 1:10 ja 1:100. Ensimmäisessä ajossa olivat mukana näytteet 1a, 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b ja 8b. Toisessa ajossa olivat mukana näytteet 9b, 10a, 11a, 12a, 13a, 13b, 14b ja 15b. Kolmannessa ajossa olivat mukana näytteet 16a, 17a, 18b ja 19a. Standardina käytettiin *Y.enterocolitica* 6471/76 (1B) -templaatin laimennossarjaa 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota.



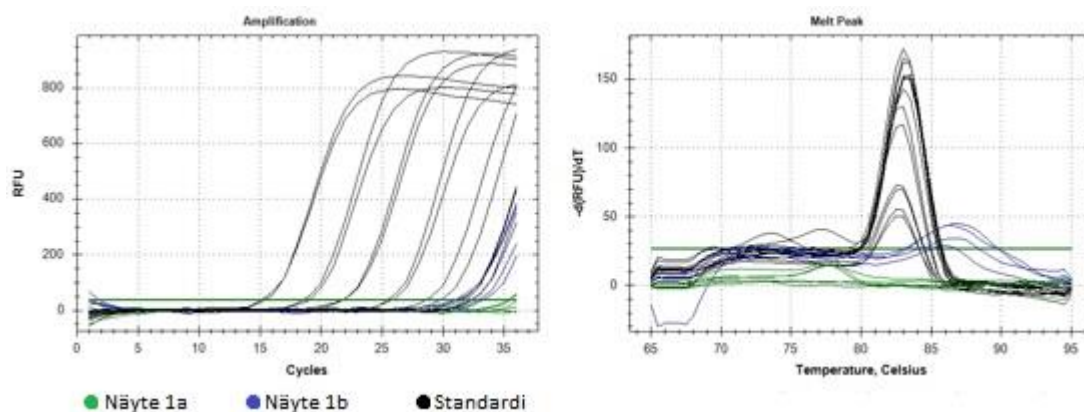
Kuva 1. Ensimmäisen ajon monistuskäyrä, sulamispistekäyrä ja standardisuora. Mustat käyrät ovat standardeja ja vihreät kliinisiä näytteitä. Standardisuoralta voidaan nähdä kliinisten näytteiden monistustuotteiden sijoittuminen suoralle.



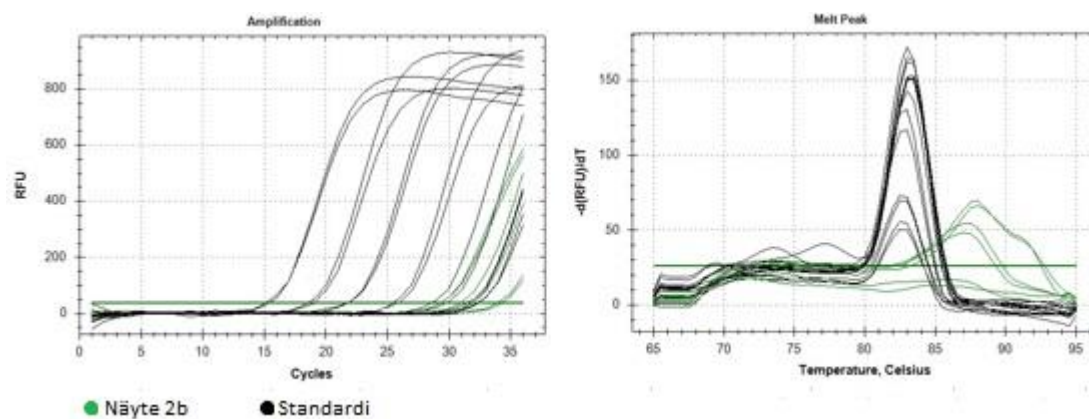
Kuva 2. Toisen ajon monistuskäyrä, sulamispistekäyrä ja standardisuora. Mustat käyrät ovat standardeja ja vihreät kliinisiä näytteitä. Standardisuoralta voidaan nähdä kliinisten näytteiden monistustuotteiden sijoittuminen suoralle.



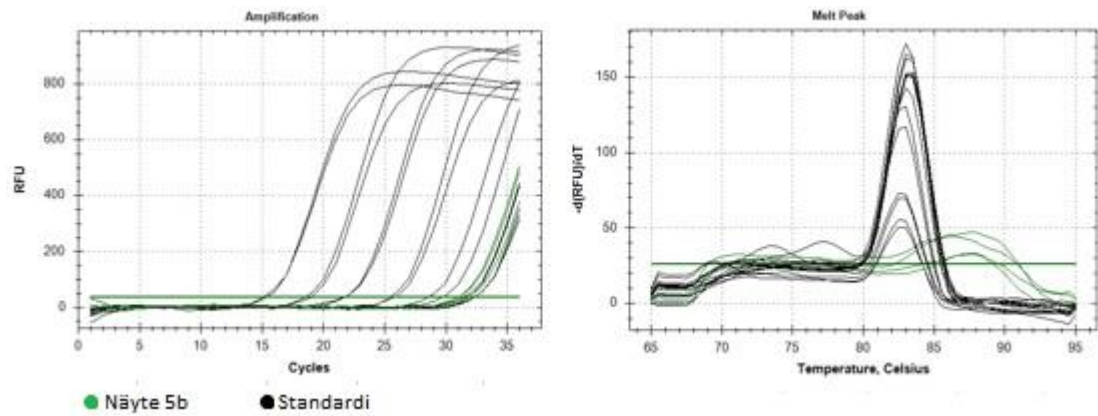
Kuva 3. Kolmannen ajon monistuskäyrä, sulamispistekäyrä ja standardisuora. Mustat käyrät ovat standardeja ja vihreät kliinisiä näytteitä.



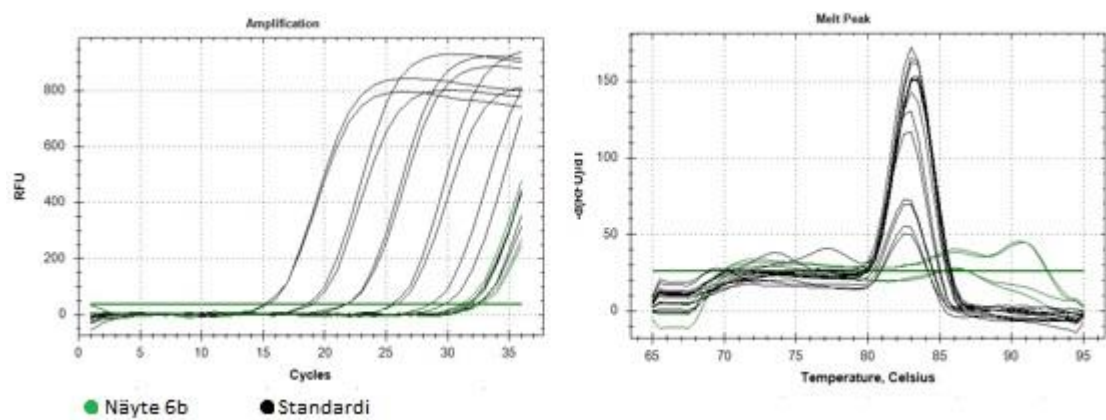
Kuva 4. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteistä 1a ja 1b. Käyristä voidaan nähdä näytteen 1b monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



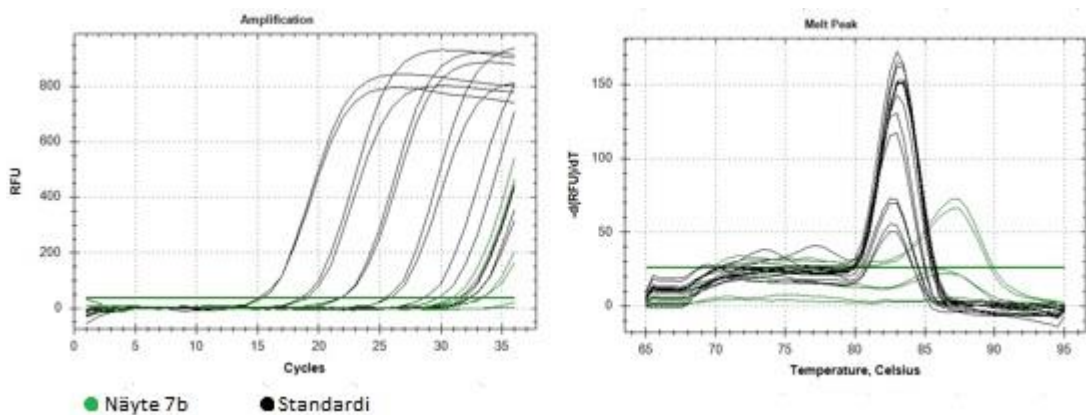
Kuva 5. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 2b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



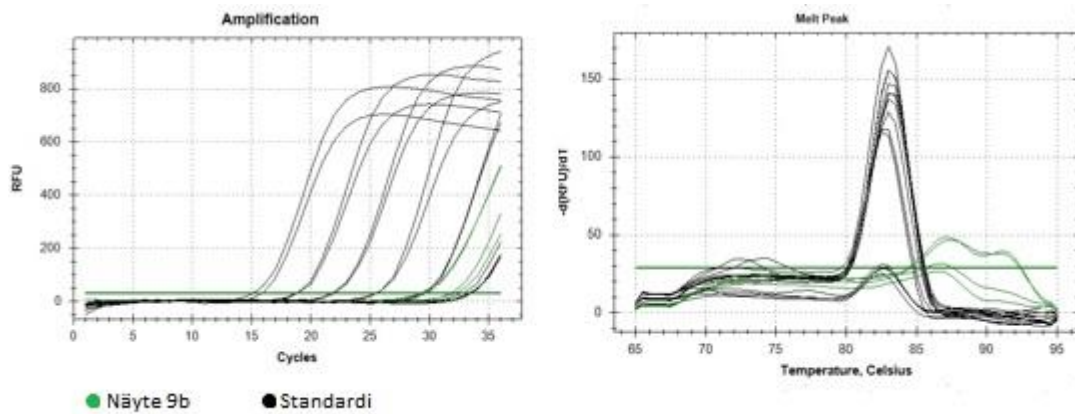
Kuva 6. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 5b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



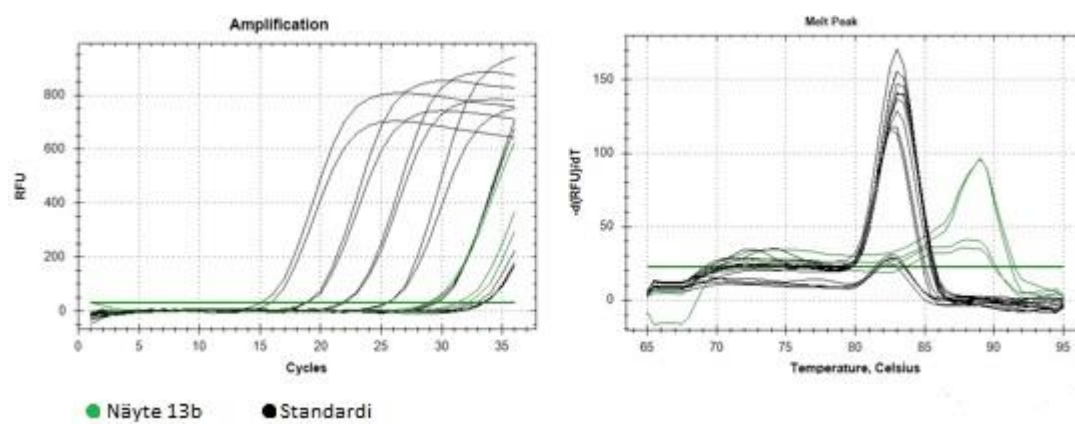
Kuva 7. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 6b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



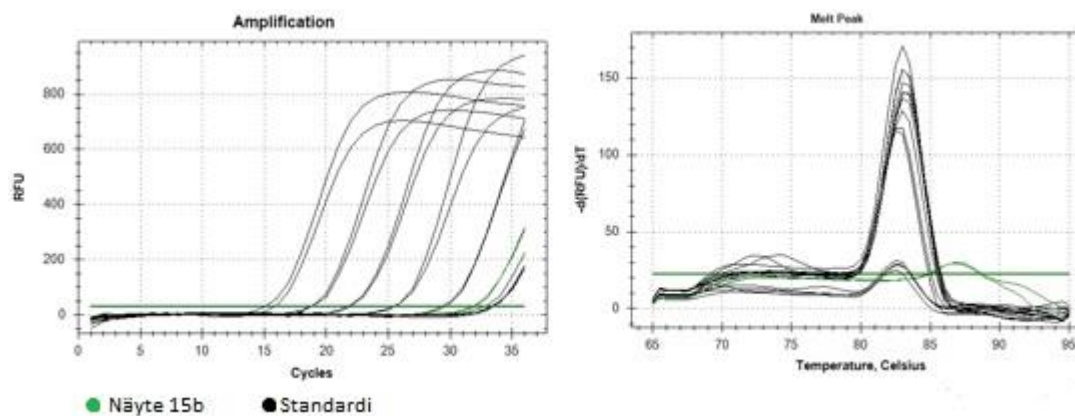
Kuva 8. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 7b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



Kuva 9. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 9b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



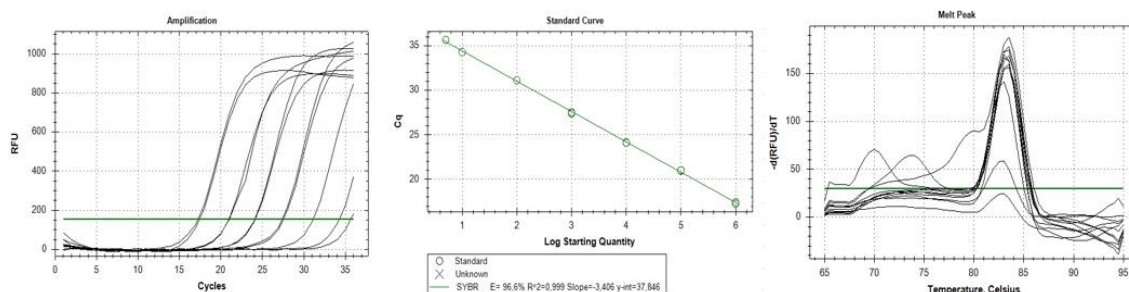
Kuva 10. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 13b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla ja 1:10 laimennetuilla näytteillä.



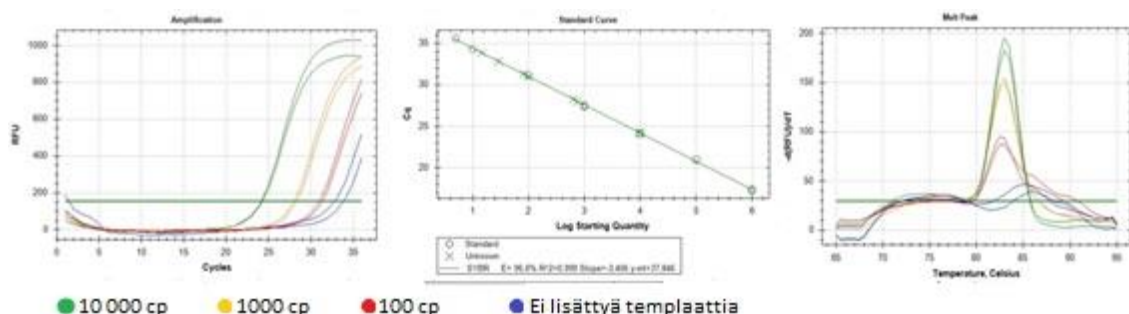
Kuva 11. Monistuskäyrä ja sulamispistekäyrä näytteestä 15b. Käyristä voidaan nähdä näytteen monistuminen laimentamattomilla näytteillä.

Osa II

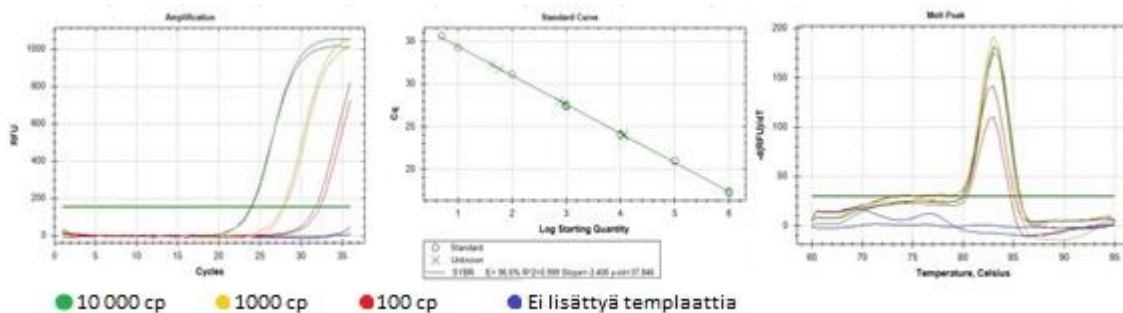
Liitteen toisessa osassa on esitetty PCR-ajotiedostot kliinistä näyteteistä, joiden joukkoon oli lisätty laimennossarjana *Y.enterocolitica*-positiivista *Y.enterocolitica* 6471/76 (1B) -templaattia. Näyte 10a on negatiivinen kliininen näyte, näyte 1b oli todettu Rida®Gene Bacterial Stool Panel (R-Biopharm) -reagenssipakkauksella *Y.enterocolitica*-positiiviseksi, mutta sitemmin negatiiviseksi näytteeksi. Näyte 13b oli myös todettu Rida®Gene Bacterial Stool Panel -testillä *Y.enterocolitica*- ja *Salmonella*-positiiviseksi, mutta sitemmin vain *Salmonella*-positiiviseksi. Standardina on käytetty *Y.enterocolitica*-templaatin laimennossarjaa 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 ja 5 kopiota.



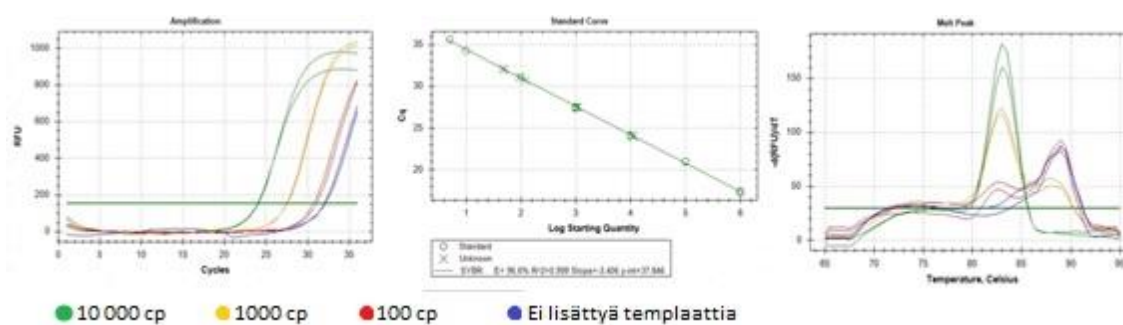
Kuva 1. Standardien monistuskäyrä, standardisuora ja sulamispistekäyrä



Kuva 2. Näytteen 1b monistuskäyrä, sijoittuminen standardisuoralle ja sulamispistekäyrä, kun näytteeseen on lisätty *Y.enterocolitica*-templaattia. Näytteeseen lisätyt templaattimäärät on merkitty kuvaan.



Kuva 3. Näytteen 10a monistuskäyrä, sijoittuminen standardisuoralle ja sulamispistekäyrä, kun näytteeseen on lisätty *Y. enterocolitica*-templaattia. Näytteeseen lisätyt templaattimäärät on merkitty kuvaan.



Kuva 4. Näytteen 13b monistuskäyrä, sijoittuminen standardisuoralle ja sulamispistekäyrä, kun näytteeseen on lisätty *Y. enterocolitica*-templaattia. Näytteeseen lisätyt templaattimäärät on merkitty kuvaan.

