

Jussi Jokisalo

***Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyypien 1,7,12  
ja 3,6,8 PCR-menetelmien validointi**

Opinnäytetyö

Kevät 2017

SeAMK Elintarvike ja maatalous

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU  
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

## Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Elintarvike- ja maatalous

Tutkinto-ohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Yleinen elintarviketeknologia

Tekijä: Jussi Jokisalo

Työn nimi: *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyypin 1,7,12 ja 3,6,8 PCR-menetelmien validointi

Ohjaaja: Pekka Maijala

Vuosi: 2017

Sivumäärä: 37

Liitteiden lukumäärä: 2

---

Työ suoritettiin Eviran Seinäjoen toimipisteessä heidän käyttöönsä. Työn tarkoitus oli pystyttää ja validoida toimivat multiplex-PCR -menetelmät *Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteerin serotyypeille 1,7,12 ja 3,6,8. Työssä tutustutaan kyseisen bakteerin ominaisuuksiin ja serotyyppeihin, sen aiheuttamaan tautiin sekä sen hoitamiseen ja kontrolloimiseen käytettäviä keinoja. Perehdytään myös PCR:n perusteisiin, reagensseihin sekä käyttötarkoituksiin ja -sovelluksiin, PCR:ää hyödynnetään muun muassa patogeeneiden DNA:n havaitsemiseen näytteestä. PCR tulosten lukemisessa hyödynnettiin agarosielektroforeesi-ajolaitetta, jolla PCR tuotteet saadaan eroteltua toisistaan. Työssä kuvataan tapahtunut validointi, perehdytään ongelmiin ja esitetään näille saadut ratkaisut. Lopuksi esitetään menetelmän kuvaus ja työn kulku, mitä tehtiin ja miten tehtiin, sekä saatuja tyyppituloksia validoituja menetelmiä käytettäessä. Validoinnissa onnistuttiin ja menetelmä saatiin käyttöön työnantajalle. Ylimääräisiä tuotteita kuitenkin esiintyi, mutta näiden ei kuitenkaan katsottu häiritsevän tulosten lukua ja tyyppittämistä, koska ne eivät olleet päällekkäin haluttujen tuotteiden kanssa ja esiintyivät vain tietyillä serotyypeillä. Työn aikana valmistetut validointiraportit ovat liitteinä 1 ja 2.

Asiasanat: APP, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotyyppi, PCR, polymeerasiketjureaktio, validointi

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## Thesis abstract

Faculty: School of Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: General Food Technology

Author/s: Jussi Jokisalo

Title of thesis: Validation of PCR tests for serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1,7,12 and serotypes 3,6,8

Supervisor(s): Pekka Maijala

Year: 2017

Number of pages: 37

Number of appendices: 2

---

Thesis was made at and for Evira Seinäjoki regional office. The objective was to set up and validate multiplex-PCR method to detect serotypes 1,7,12 and serotypes 3,6,8 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. This thesis includes basic information of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, APPs serotypes, the disease APP causes, controlling spreading of APP and the methods to treat the disease APP causes. Thesis includes also basics of PCR, reagents in PCR and some applications of PCR, for example detection of a pathogen DNA from a sample. How to read PCR-results has also been told. Validation process has been presented, and some problems that occurred during project are explained more deeply. Validation reports have been added as appendices 1 and 2.

Keywords: APP, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype, PCR, polymerase chain reaction, validation

## SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo.....	5
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	6
1 Johdanto.....	7
2 Teoria.....	8
2.1 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	8
2.1.1 Bakteeri.....	8
2.1.2 Tauti.....	11
2.1.3 Hoito ja kontrollointi.....	15
2.2 PCR.....	16
2.2.1 Yleistä.....	16
2.2.2 Toimintaperiaate.....	17
2.2.3 Reaktion ohjaaminen.....	18
2.2.4 PCR-reaktiotuotteiden analysointi.....	20
2.2.5 Reagenssit.....	22
2.2.6 Multiplex.....	25
3 APP:n serotyypityksessä käytetyn PCR-menetelmän validointi.....	26
4 Menetelmän kuvaus.....	31
5 Yhteenveto.....	34
LÄHTEET.....	35
LIITTEET.....	37

## Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Gram-värjättyjä APP-bakteereja. ....	9
Kuva 2. Terveet sian keuhkot.....	13
Kuva 3. Krooninen APP sian keuhkoissa. ....	14
Kuva 4. Krooninen APP sian keuhkoissa, paise avattuna.....	14
Kuva 5. PCR:n kolme eri lämmitysvaihetta. ....	19
Kuva 6. Esimerkki PCR-kierroksista ja näiden lämpötilojen vaihteluista. ....	20
Kuva 7. Serotyypin 1,7,12 PCR-ajo. ....	21
Kuva. 8 Serotyyppi 3 kolmalle eri alukekonsentraatiolla. ....	27
Kuva 9. Serotyypin 3,6,8 PCR-ajo annealing lämpötilan ollessa 61 °C.....	27
Kuva 10. Serotyypin 3,6,8 PCR-ajot, 100 bp ladderin vasemmalla puolella annealing lämpötila oli 60 °C ja 100 bp ladderin oikealla puolella annealing lämpötila oli 63 °C.....	28
Kuva 11. Serotyypin 1,7,12 PCR-ajo. ....	29
Kuva 12. Serotyypin 3,6,8 PCR-ajo. ....	30
Kuva 13. Thermal Cycler, jolla suoritettiin PCR-ajot. ....	31
Kuva 14. Agaroosielektroforeesi-ajolaite PCR-tuotteiden havaitsemiseksi. ....	32
Kuva 15. Serotyypin 1,7,12 PCR-ajo. ....	33
Kuva 16. Serotyypin 3,6,8 PCR-ajo. ....	33
Taulukko 1 Käytetyt alukeparit.....	28

## Käytetyt termit ja lyhenteet

<b>APP</b>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<b>NAD</b>	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi, koentsyymi, joka osallistuu katabolisiin reaktioihin
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polymeraasiketjureaktio)
<b>RTX</b>	Repeats in toxin (Rakenteellisesti toistuva toksini)
<b>LPS</b>	Lipopolysakkaridi
<b>Cem</b>	Contagious equine metritis
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>EtBr.</b>	Ethidium Bromide

## 1 Johdanto

Opinnäytetyön aiheena on *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) serotyyppien 1,7,12 ja 3,6,8 PCR-menetelmien validointi. Kyseessä on sikojen keuhkojen märkäistä tulehdusta aiheuttava bakteeri. Työn tein Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) Seinäjoen toimipisteessä, ja tarkoituksena oli validoida PCR-menetelmät Eviran Seinäjoen toimipisteen käyttöön, sekä tyyppittää Eviran Seinäjoen toimipisteessä olevia tutkimattomia APP-kantoja.

Tavoitteena oli pystyttää menetelmä APP:n serotyyppien tutkimiseksi, vastaavaa menetelmää ei ole Suomessa missään muualla käytössä. Serotyyppijä tutkimalla saadaan kartoitettuja serotyyppien levinneisyyttä, sekä selvitettyä, mitä serotyyppiä esiintyy milläkin tiloilla. Näiden tietojen avulla voidaan valmistaa rokotteet suojaamaan sikoja, sekä hallita APP:n leviämistä.

Opiskelujeni laboratoriotöistä oli hyötyä opinnäytetyön kanssa, esimerkiksi eräällä laboratoriotunnilla teimme agarosigeelielektroforeesi-ajon, joka on erittäin tärkeä osa PCR-menetelmää. Vastaavasti opinnäytetyö vahvisti omia laboratoriossa työskentelytaitoja.

Kerron opinnäytetyössäni tarkemmin APP:stä, sekä teoriaa käyttämistäni menetelmistä ja laitteista. Tärkeimpiä lähteitäni on materiaali, jonka sain käyttööni Eviran Seinäjoen toimipisteen kirjastosta.

Liitteinä työssäni on Eviran Seinäjoen toimipisteelle valmistelemani validointi raportit, jotka ovat olennainen osa työni tulosta.

## 2 Teoria

### 2.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

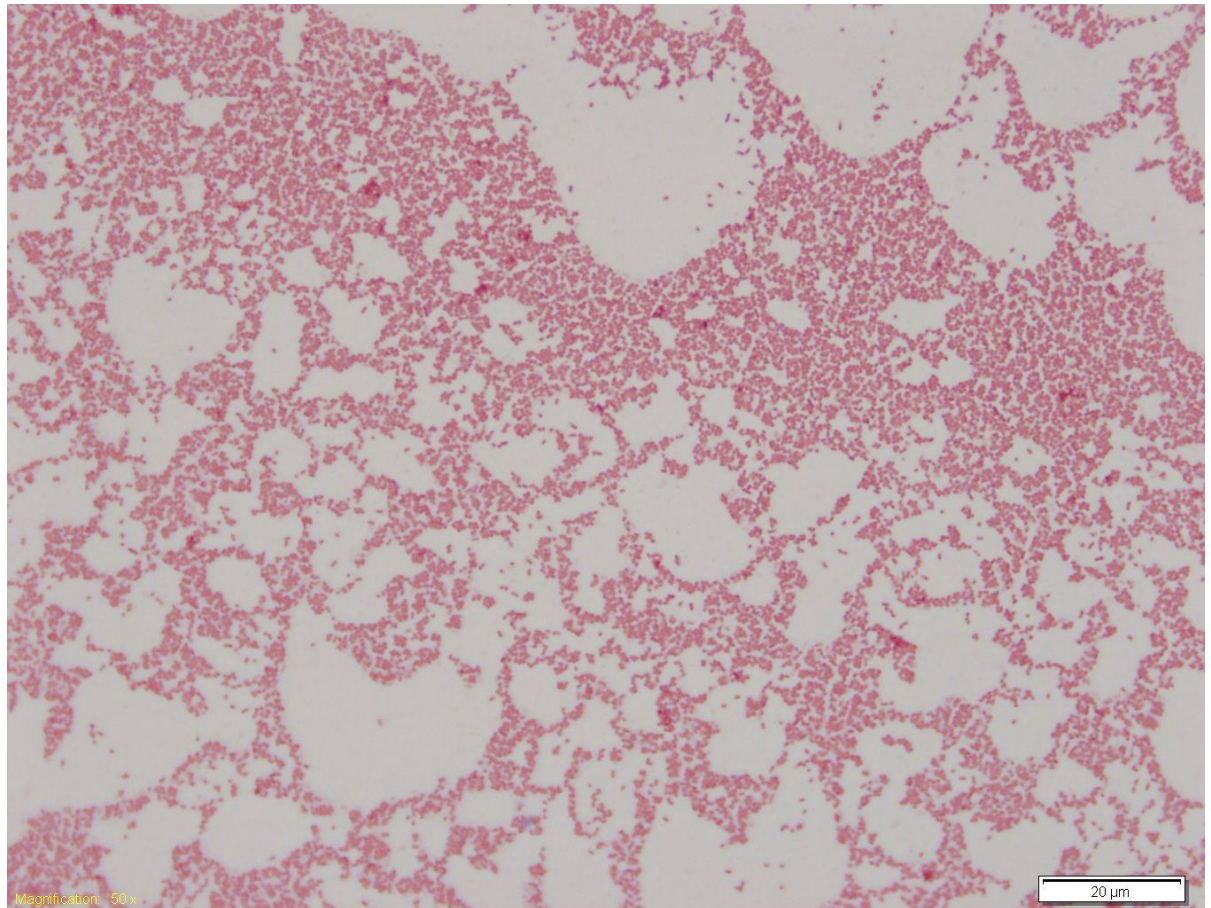
*Actinobacillus pleuropneumoniae* on vain sikoihin tarttuva bakteeri, joka aiheuttaa sioille paiseisen keuhko- ja keuhkokalvontulehduksen (Gottschalk 2012; Taylor 1999, 211). APP aiheuttaa akuutin keuhko- ja keuhkokalvontulehduksen lisäksi kasvun hidastumista, ja kroonisia kiinnikkeitä keuhkokalvoille ja sydänpussiin (Gottschalk 2012; Quinn ym. 2011, 296; Radostits ym. 2007, 1055; Taylor 1999, 211, 213). APP:n virulenssi vaihtelee – se voi mennä ohi huomaamatta kannasta riippuen, tai virulentit kannat voivat olla tappavia (Gottschalk 2012). Kohonneen kuolleisuuden ja hidastuneen kasvun takia APP aiheuttaa merkittäviä taloudellisia tappioita. Teurastamalla APP havaitaan lisääntyneinä keuhkokalvontulehduksina ja kiinnikkeinä rintaontelossa. (Gottschalk 2012; Radostits ym. 2007, 1055; Taylor 1999, 213.)

APP:tä ja sen aiheuttamaa tautia on tutkittu melko paljon, ja saatua tietoa on käytetty hyväksi diagnostiikan, rokotteiden ja APP:n kontrolloinnin kehittelyssä. Koska APP aiheuttaa taloudellisia menetyksiä, sen kontrolloimiseksi tehdään edelleen paljon työtä. (Gottschalk 2012.)

#### 2.1.1 Bakteeri

APP itsessään on hyvin pieni, gram-negatiivinen kapseloitunut kokkoidi sauvabakteeri (kuva 1) (Caswell & Williams 2007, 587). APP on herkkä lämpimille ja kuiville olotiloille, mutta voi selvitä useita päiviä limaeritteissä tai muissa orgaanisissa materiaaleissa, sekä puhtaassa vedessä melko matalassa lämpötilassa jopa 30 päivää. Normaalit desinfiointiaineet tehoavat APP:hen, kun orgaaninen materiaali on ensin poistettu. (Gottschalk 2012; Taylor 1999, 211, 214.)





Kuva 1. Gram-värjättyjä APP-bakteereja.

APP kannat voidaan jakaa kahteen biotyypin: biotyyppi I, joka tarvitsee ulkoisen nikotiiniamidiadeniinidinukleotidiyhdisteen (NAD) lähteen kasvaakseen, ja biotyyppi II, joka ei tarvitse ulkoista NAD-yhdisteen lähdeä (Caswell & Williams 2007, 587; Gottschalk 2012; Quinn ym. 2011, 297). Biotyyppin I kannat eivät kasva veriagarilla, jollei siihen ole lisätty NAD-yhdistettä, tai jos esimerkiksi stafylokokki ei ole tuottamassa sitä APP:n käyttöön (Gottschalk; Quinn ym. 2011, 297; Taylor 1999, 211).

Biotyyppien lisäksi APP kannat voidaan jakaa 15 eri serotyyppiin bakteerin kapselin ja seinämän rakenteiden perusteella. Näiden eroavaisuuksien avulla serotyypit voidaan tyypittää muun muassa polymeerasiketjureaktio-menetelmällä (PCR). Serotyypit 1–12 ja 15 kuuluvat biotyypin I, kun taas serotyypit 13 ja 14 kuuluvat biotyypin II. (Gottschalk 2012; Quinn ym. 2011, 297; Radostits ym. 2007, 1053.) Serotyypeillä on kuitenkin yhtäläisyyksiä, ja yhden kattavan PCR-menetelmän

määrittäminen on vaikeaa. Tästä syystä käytetäänkin muutamalle serotyypille tarkoitettuja PCR-menetelmiä. (Gottschalk; Radostits ym., 1054.) Tyypittäminen on tärkeää, sillä nykyiset rokotteet ovat serotyypispesifejä. Rokotteita pyritään kuitenkin kehittämään yleispäteväksi tehoamaan jokaiseen serotyyppiin, mutta tässä ei olla vielä onnistuttu. (Quinn ym., 297; Radostits ym., 1055, 1058.)

Vuoden 2017 alussa löydettiin uusi serotyyppi, serotyyppi 16. Sen kapselirakenteen polysakkaridin biosynteesin genomista löytyi uniikki alue, jota ei tavata muilla serotyypeillä. (Bossé ym. 2017)

Kasvatusalustoilla APP muodostaa pieniä, 0,5–1 mm kokoisia pesäkkeitä. APP:n inkubointi kestää noin 24 tuntia. (Gottschalk 2012.) APP on hemolyyttinen, eli se tuhoaa punasoluja saadakseen kasvuun tarvittavaa rautaa (Gottschalk; Quinn ym. 2011, 293; Taylor 1999, 211).

APP:llä on todettu neljää eri rakenteellisesti toistuvaa toksiinia (RTX), jotka ovat ApxI, ApxII, ApxIII ja ApxIV (Caswell & Williams 2007, 587; Gottschalk 2012; Quinn ym. 2011, 296; Radostits ym. 2007, 1054; Taylor 1999, 211). ApxI on vahvasti hemolyyttinen, ja lähteestä riippuen joko heikosti tai kohtalaisesti sytotoksinen. ApxII on heikosti hemolyyttinen ja kohtalaisesti sytotoksinen. ApxIII ei ole lainkaan hemolyyttinen, mutta voimakkaasti sytotoksinen. Serotyypit 1, 5a, 5b, 9 ja 11 tuottavat ApxI:stä ja ApxII:sta, serotyypit 2, 3, 4, 6, 8 ja 15 tuottavat ApxII:sta ja ApxIII:sta, serotyypit 7, 12 ja 13 tuottavat vain ApxII:sta ja serotyypit 10 ja 14 tuottavat vain ApxI:stä. Lisäksi kaikki APP:n serotyypit tuottavat ApxIV:stä. (Gottschalk; Radostits ym., 1054.)

APP on hyvin yleinen ja levinnyt ympäri maapallon, ja tartuttaa lähinnä kasvatettuja sikoja, mutta sitä on todettu myös villisioissa (Gottschalk 2012). Vaikka APP on levinnyt kaikkialle, usein jokin serotyypeistä on alueellisesti vallitsevana kantana. On kuitenkin muistettava, että vaikka jokin serotyyppi olisi erittäin virulentti jollain alueella, se saattaa olla melkein vaaraton toisaalla. (Gottschalk; Radostits ym. 2007, 1053; Taylor 1999, 214.) Serotyypit 1 ja 5 ovat Pohjois-Amerikassa yleisimpiä, serotyyppi 2 suurimmassa osassa Eurooppaa ja serotyyppi 15 on Australiassa yleisin (Gottschalk; Radostits ym., 1053). Epäillään, että Apx-toksiinit, bakteerikapselin rakenne, lipopolysakkaridikoostumus (LPS) ja hemolyysin tyypin yhdis-

telmä vaikuttaa kannan virulenssiin, mutta tästä ei ole täyttä varmuutta (Caswell & Williams 2007, 587; Gottschalk; Quinn ym. 2011. 296; Radostits ym., 1054).

### 2.1.2 Tauti

APP leviää hengitysteihin, mutta Taylor (1999, 212) mainitsee sen pystyvän kolonisoimaan myös välikorvan (Gottschalk 2012; Taylor 1999, 212). On tärkeä huomata, että APP:n kantajalla voi olla äärimmäisen virulentti APP-kanta, vaikka kyseinen yksilö olisi pysynyt terveenä (Gottschalk). APP:n aiheuttaman taudin kliininen kulku voi olla perakuutti, akuutti ja subkliininen. Näiden lisäksi Radostits ym. (2007) mainitsee myös kroonisen muodon. (ETT, [viitattu 6.2.2017]; Radostits ym. 2007, 1056.)

Kulkeutumista laumojen välillä tapahtuu, kun APP:tä kantava sika tuodaan terveeseen populaatioon (Gottschalk 2012; Radostits ym. 2007, 1053; Taylor 1999, 214). APP leviää pääasiallisesti kärsä-kärsä-kosketuksen välityksellä tai hengitystie-eritteiden kuljettamana lyhyitä välimatkoja (Caswell & Williams 2007, 588; Gottschalk; Quinn ym. 2011, 296; Radostits ym., 1053; Taylor, 212, 213). Sikojen liikkuminen ja sekoittaminen lisäävät sairastumisriskiä (Gottschalk; Radostits ym., 1055). Tyypillisesti tartunnan saaneissa laumoissa emakko levittää taudin porsailleen läheisen kontaktin kautta (Gottschalk). Linnut ja pienet jyrsijät ovat epätodennäköisiä taudin levittäjiä, sillä vaikka laboratorio-olosuhteissa APP on saatu tartutettua hiireen, ei niillä luonnossa ole tavattu APP:tä (Gottschalk; Taylor, 214).

Mikäli sikatila saa APP-tartunnan, siitä on äärimmäisen vaikea päästä eroon (Gottschalk 2012). Taudista parantuneet siat voivat kantaa APP:tä hengitysteissä, nielurisissa tai kroonisissa keuhkomuutoksissa, ja näin levittää APP:tä vielä terveisiin sikoihin. Myös subkliiniset tapaukset toimivat tällä tavoin kantajina. (Caswell & Williams 2007, 588; Gottschalk; Quinn ym. 2011, 296; Radostits ym. 2007, 1057.) Tautitapaukset saattavat olla harvassa, vaikka lauma kantaisi virulenssia kantaa. Vastaavasti äkillisesti saattaa puhjeta useita sairastumisia. (Gottschalk.) Terveiltä näyttävät siat voivat löytyä kuolleina seuraavana päivänä (Quinn ym.; Radostits ym., 1056). Yleensä taudin puhkeaminen tapahtuu jonkin muutoksen, stressin tai toisen taudinaiheuttajan, yhteydessä (Gottschalk; Quinn ym.,

296). Yksittäisten kantajien löytäminen ja tunnistaminen on erittäin vaikeaa (Gottschalk; Radostits ym., 1058).

Sioilla, jotka kantavat virulenssia kantaa nielurisoissaan, hengitysteiden mukosiliaarinen puhdistuminen pystyy normaalisti poistamaan sisään hengitettyt bakteerit (Gottschalk 2012). Mikäli tartuntapaine on suuri tai mukosiliaarinen puhdistuminen on toimintakyvyltään heikentynyt, tarvittava määrä APP:tä voi päästä keuhkorakkuloihin aiheuttamaan tautia (Gottschalk; Radostits ym. 2007, 1055). Tämä tapahtuu yleensä akuuteissa taudin puhkeamisissa, kun sairastuneet siat levittävät suu- rissa määrin APP:tä tai kun värekarvat ovat vahingoittuneet toisen patogeenin ta- kia. Muita värekarvojen toimintaan vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi vilustuminen tai suuret ammoniakki-pitoisuudet ympäristössä. Keuhkorakkuloissa taistelu isännän immunitietin ja APP:n virulenssi-tekijöiden välillä ratkaisee, saadaanko APP nujerrettua vai aiheutuuko keuhkoihin tulehdus. (Gottschalk.)

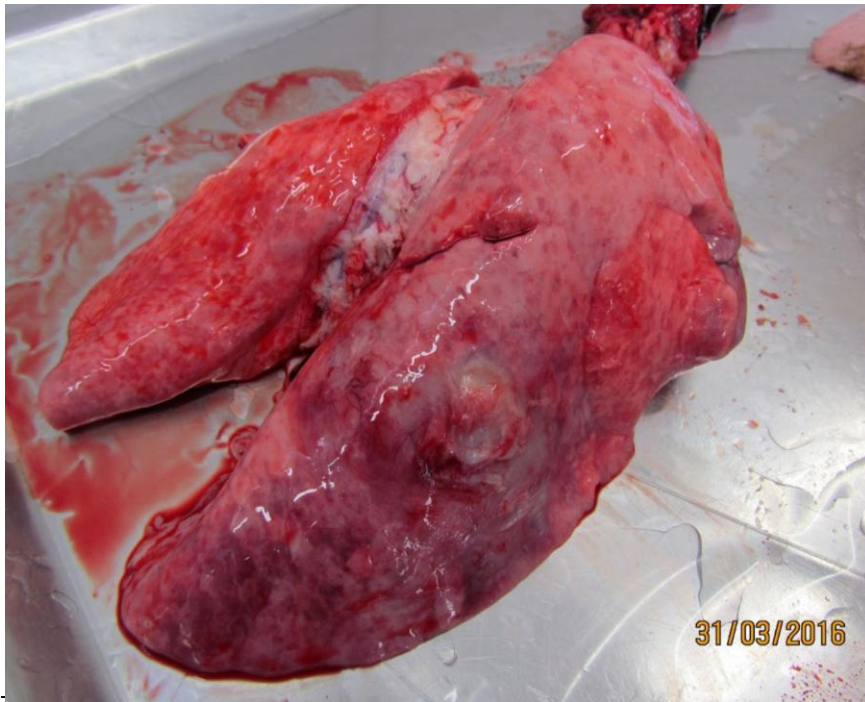
Taudin inkubaatioaika sioissa vaihtelee hyvin paljon, ja altistuminen suurelle mää- rälle virulenttia APP-kantaa voi johtaa kuolettavaan märkäiseen keuhkotulehduk- seen vain kolmessa tunnissa (Gottschalk 2012).

Sairastapauksissa APP:tä löytyy keuhkojen lisäksi myös sierainten eritteissä (Gottschalk 2012). Sairastuneet siat ovat yleensä haluttomia liikkumaan ja syö- mään, ja tyypillistä on myös jopa 41°C kuume. Oireisiin liittyy veriset eritteet sie- raimista ja suusta, hengästymisen häiriöiden ja aktiviteetin jälkeen ja myös kes- kenmenot ovat mahdollisia. (Caswell & Williams 2007, 587; Radostits ym. 2007, 1056; Taylor 1999, 212, 213.) Perakuuteissa tapauksissa taudinkulku voi olla vain muutaman tunnin mittainen, mutta suurimmassa osassa tapauksista yhdestä kah- teen päivään (Radostits ym., 1056). Kroonisesti sairastuneet siat ovat kuumeisia ja ha- luttomia syömään, hengitystieoireet eivät ole niin vakavia, mutta sitkeää yskää voi kehittyä. Taylor (1999, 213) mainitsee samat oireet subakuuttiin muotoon kuulu- viksi. (Caswell & Williams, 587; Radostits ym., 1056; Taylor, 213.) Ruumiinavauk- sissa sikojen keuhkoista löytyy akuutissa muodossa voimakasta verekkyyttä, ödeemaa, fibriiniä ja kuolioita tai kroonisessa muodossa paiseita ja kiinnikkeitä keuhkokalvoilla (Caswell & Williams, 588; Gottschalk; Radostits ym., 1057; Taylor, 213). Kuvassa 2 on terveet sian keuhkot, joihin vertaamalla kuvissa 3 ja 4 näh- dään krooniseen APP:hen liittyviä muutoksia: suuri kapseloitunut paise, jonka alu-

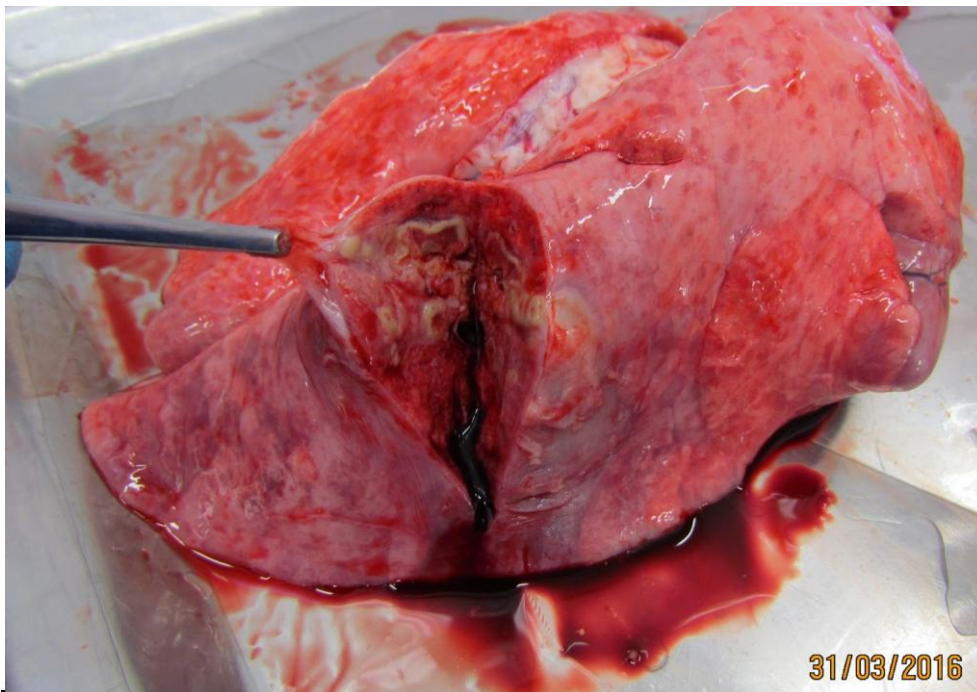
eella keuhkokalvolla on paksuuntumaa eli ruumiinavauksen yhteydessä irrottujen kiinnikkeiden jäänteitä. Kuvassa 4 keuhkoissa oleva paise on avattu, ja sen voidaan nähdä kehittyneen syvälle keuhkoihin. (Marin 2017.)



Kuva 2. Terveet sian keuhkot.



Kuva 3. Krooninen APP sian keuhkoissa.



Kuva 4. Krooninen APP sian keuhkoissa, paise avattuna.

### 2.1.3 Hoito ja kontrollointi

APP:tä voidaan hoitaa antibiooteilla, mutta myös antibioottiresistenssiä on todettu (Quinn ym. 2011, 297; Radostits ym. 2007, 1057; Taylor 1999, 211). Antibioottihoidon tehoa parhaiten taudin alkuvaiheessa, jolloin se voi laskea kuolleisuutta (Quinn ym., 297). Antibioottihoidot voivat kuitenkin vaikuttaa eläimen vastustuskykyyn, sillä tehokkaat antibiootit voivat estää vasta-aineiden kehittymistä, jättäen eläimen alttiiksi mahdolliselle taudin uusiutumiselle. Toisaalta, jos hoidon aloittamista hidastellaan, eläin voi saada kroonisia vaurioita keuhkoihin, vaikka se selviäisi taudista. Hoidon onnistuminen riippuu diagnostisoinnista taudin alkuvaiheessa ja nopeasta hoidon aloittamisesta. (Gottschalk 2012.)

APP:n kontrolloimiseksi voidaan suorittaa myös seuranta tilan APP statuksesta. Jos tilalla ei ole lainkaan APP:tä, kannattaa uusia sikoja hankkia vain tiloilta, jotka ovat APP-vapaita. Saapuvat siat on hyvä laittaa karanteeniin tartuntavapauden varmistamiseksi ennen laumaan yhdistämistä. (Gottschalk 2012; Radostits ym. 2007, 1058.) Laumat voidaan jaotella kolmeen eri kategoriaan riippuen APP-tartunnan tasosta:

- Katgoria 1, joka on vasta-aineellisesti APP positiivinen, mutta historiassa ei ole tiedossa tautitapauksia
- Katgoria 2, joka on täysin APP vapaa
- Katgoria 3, jonka historiassa on ruumiinavauksissa ja mikrobiologisesti todistettuja APP tapauksia (Radostits ym., 1058).

Suomessa näitä kategorioita ei käytetä, mutta Eläinten terveys ry (ETT) vaatii kliinisen APP-vapauden sikatiloilta, jotta ne pääsevät Sikavan erityistasolle (ETT, [viitattu 4.5.2017]).

Eräs suosittu, ja suositeltu, hallintamenetelmä on all-in/all-out systeemi, jossa sikoja käsitellään suurina laumoina, eikä yksittäisiä sikoja liitetä laumaan. Laumat ostetaan ja myydään kokonaisina, jolloin laumoilla on mahdollisesti vasta-aineita yhdelle serotyypille, ja koska uusia mahdollisia kantajasikoja ei liitetä laumaan, lauma ei altistu toisille serotyypeille. Tähän menetelmään kuuluu myös tilojen läpikotainen siivoaminen myynnin ja ostamisen välissä. (Radostits ym. 2007, 1058.)

## 2.2 PCR

### 2.2.1 Yleistä

PCR:ää kutsutaan "DNA:n kopiokoneeksi". Vaikka se vaikuttaa yksinkertaiselta prosessilta, se on hyvin monimutkainen. (McPherson & Møller 2000, 1.) PCR:ä on nopeuttanut biologisen ja lääketieteellisen geenitutkimuksen edistymistä, koska PCR:n avulla voidaan eristää ja tutkia geenejä kaikista DNA-ketjuista, ja näitä eristettyjä geenejä voidaan muokata tarpeiden mukaan (Harris & Kadir 1998, 27–29; McPherson & Møller, 1).

PCR:n tarkoitus on DNA:n monistaminen (Harris & Kadir 1998, 9; McPherson & Møller 2000, 4). Elävissä soluissa DNA:n monistamiseen osallistuu useita eri proteiineja. Yksinkertaistettuna tässä prosessissa DNA-ketju avautuu korkeassa lämpötilassa kahdeksi DNA-säikeeksi, ja lämpöstabiiili DNA-polymeraasientsyymi lukee molemmat säikeet DNA:n monistamiseen. (McPherson & Møller, 4.)

PCR:n hyviä puolia ovat sen:

- Nopeus. Tulokset saadaan yhdessä päivässä, eikä tarvitse esimerkiksi kasvattaa bakteereja useita päiviä, jopa viikkoja.
- Herkkyys. Yhdestä DNA molekyylistä saadaan monistettua useita tuotteita.
- Spesifisyys. Näytteestä voidaan tunnistaa yksittäisen organismin DNA.
- Monipuolisuus. Melkein samoilla reagensseilla voidaan monistaa mitä vain DNA:ta.
- Hinta. Se on yllättävän halpa tutkimusmenetelmä monipuolisuutensa ansiosta.
- Geneettinen informaatio. PCR:n avulla saadaan tärkeää tietoa tutkittavasta organismista. Spesifien alukkeiden ansiosta PCR:llä voidaan tutkia näytettä lajin tarkkuudella.
- Näytteiden saatavuus. Kliinisten näytteiden lisäksi voidaan käyttää esimerkiksi hyönteisiä niiden sisällä olevan patogeenin löytämiseksi.
- Standardit tulokset. PCR antaa joko kyllä tai ei vastaukset riippuen löytyykö haluttua DNA-ketjun osuutta vai ei.



- Turvallisuus. PCR ei tarvitse eläviä soluja, joten käsiteltävien elävien patogeenien määrä on pieni.
- Nopea opittavuus. PCR:n toimintaperiaate on sama riippumatta siitä, mitä DNA:ta monistetaan, se on nopeasti opittavissa ja helposti sovellettavissa muille näytteille. (Harris & Kadir 1998, 12–14.)

PCR:n huonoja puolia ovat sen:

- Risti-kontaminaatiot. Sen herkkyyden takia yksikin molekyyli aikaisemmista näytteistä voi aiheuttaa virheellisen tuloksen.
- Reagenssien instabiilisuus. Väärin säilytettynä ne pilaantuvat herkästi.
- Tehottomuus. Vaikka PCR on hyödyllinen moniin sovelluksiin, se ei ole ideaali suurelle määrälle näytteitä.
- Laaja osaaminen. Sen perusperiaatteet ovat helposti opittavissa, mutta laajan tietämyksen oppiminen vaatii aikaa.
- Toistettavuus. PCR voi epäonnistua; huonotasoinen näyte, entsyymien inhibiittori, reagenssit, huono veden laatu, sähkökatkokset, entsyymien toimintakyvyttömyys ja monet muut tekniset vaikeudet voivat aiheuttaa ongelmia. (Harris & Kadir 1998, 14, 15.)

## 2.2.2 Toimintaperiaate

PCR:ssä käytetään elävissä soluissa tapahtuvan DNA-synteesin perusteita. Yksinkertaisissa puskuriliuoksissa osa templaatti-DNA molekyylistä kopioidaan uusiksi säikeiksi, jotka rakennetaan deoksinukleotideista DNA-synteesin avulla. Kun halutaan monistaa tietty osa DNA-ketjua, käytetään sekvenssi-spesifisiä oligonukleotidialukkeita. (McPherson & Møller 2000, 5.)

Oligonukleotidialukkeita tarvitaan aina kaksi, DNA-ketjun molempia säikeitä varten. Nämä alukkeet toimivat DNA-polymeraasientsyymien kiinnittymispaikkoina. DNA-polymeraasientsyymi jatkaa aluketta neljällä deoksinukleotidilla; dATP, dGTP, dCTP ja dTTP, spesifissä puskuri olosuhteessa DNA-synteesin onnistumiseksi. Alukkeiden ansiosta voidaan määrätä kopioitava alue DNA-templaattista ja monistaa kyseistä aluetta tutkimuksia varten. (McPherson & Møller 2000, 9, 10.)

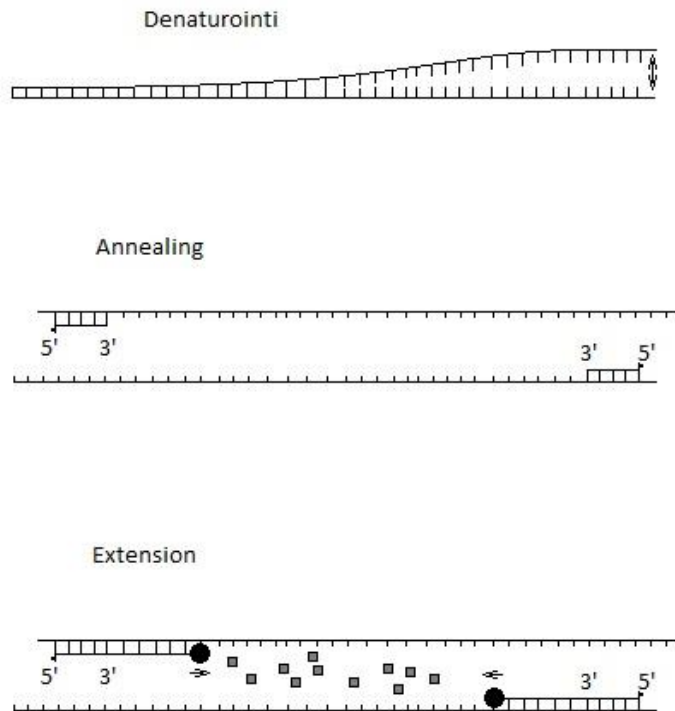
DNA-polymeraasientsyymi jatkaa DNA-synteesiä niin pitkään kuin kopioitavaa DNA-ketjua riittää. Tämän johdosta ensimmäiset PCR-tuotteet ovat huomattavasti pidempiä kuin halutut tuotteet. Liian pitkä tuote sisältää myös toisen alukkeen vastaparin, johon seuraavalla kierroksella toinen aluke liittyy. (McPherson & Møller, 11.) Toisen alukkeen paikan ansiosta tulevat PCR kierrokset tuottavat halutun mittaisia tuotteita (Harris & Kadir 1998, 10; McPherson & Møller, 11, 12).

PCR-tuotteiden eksponentiaalisen monistumisen ansiosta virheellisen mittaiset tuotteet eivät pääse häiritsemään tuloksia. Teoriassa 20:n PCR kierroksen jälkeen yhden templaattimolekyylin tuottamasta yli miljoonasta tuotteesta vain 42 on virheellistä, alkuperäiset kaksi säiettä mukaan luettuna. Saadun spesifin tuotteen pituus tunnetaan, ja suuren lukumäärän ansiosta tulosten havaitseminen helpottuu. (Harris & Kadir 1998, 10; McPherson & Møller 2000, 12.)

### 2.2.3 Reaktion ohjaaminen

PCR:ää ohjataan lämmittämällä ja jäädyttämällä, ja se koostuu kolmesta vaiheesta - denaturation, annealing ja extension (Harris & Kadir 1998, 9). Aluksi PCR lämmitetään korkeaan lämpötilaan, yleensä 94–95 °C:seen, jossa DNA-ketju denaturoidaan ja DNA-säikeet erotetaan toisistaan. Seuraavaksi annealing-vaiheessa näyteputkea jäädytetään hieman, 40–72 °C:een, jotta alukkeet löytävät täydentävän sekvenssin ja kiinnittyvät niihin. DNA-polymeraasientsyymi toimii jo annealing-vaiheessa, mikä saattaa johtaa spesifisyysongelmiin, myös matala annealing-lämpötila aiheuttaa helposti alukkeiden virheellisiä kiinnittymisiä templaattiin. (Harris & Kadir, 9, 19; McPherson & Møller 2000, 4, 5, 9, 10.) DNA-synteesiä varten näyteputken lämpötila säädetään DNA-polymeraasientsyymiä varten optimaaliseksi, esimerkiksi Taq DNA polymeraasille käytetään yleensä lämpötilaa 72 °C. Extension vaiheessa DNA-polymeraasientsyymi lukee templaattia alukkeen kohdasta, ja lisää siihen deoksinukleotideja tuottaen vastakkaisen kopion säikeestä. (McPherson & Møller, 4, 5.) Näitä lämpötilan vaihteluja toistetaan useamman kerran, jotta uutta DNA-säiettä saataisiin tuotettua mahdollisimman paljon (Harris & Kadir, 9, 19; McPherson & Møller, 5, 10). Kuvassa 5 on ensin kuvattuna denaturointi vaiheen DNA-säikeiden erottuminen, annealing-vaiheen

alukkeiden kiinnittyminen ja lopuksi ekstension vaiheessa DNA-polymeraasientsyymien DNA-säikeen lukeminen ja siihen deoksinukleotidien liittäminen, joka muodostaa uuden DNA-säikeen.



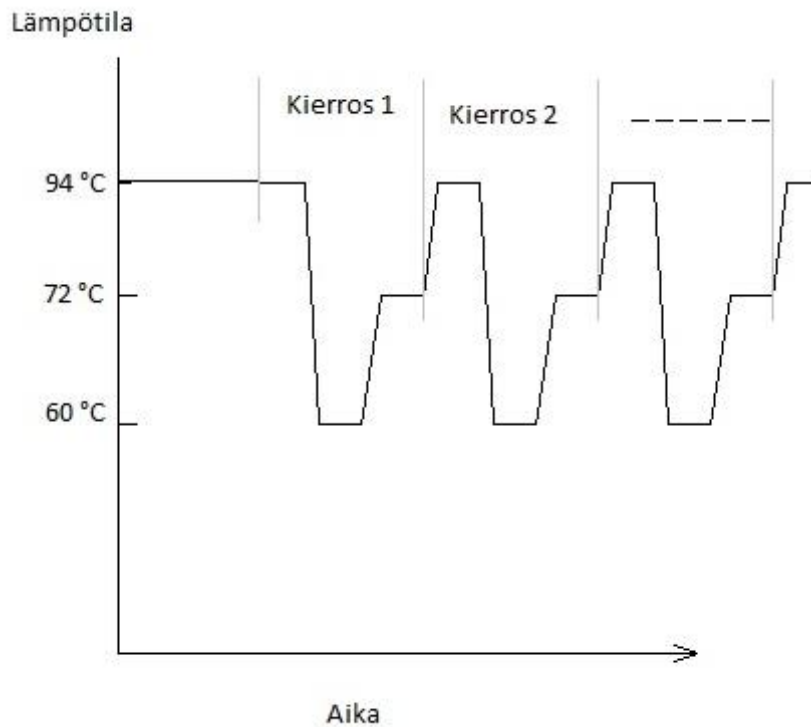
Kuva 5. PCR:n kolme eri lämmitysvaihetta.

Seuraava lämmitysvaihe hyödyntää edellisellä kierroksella valmistuneita tuotteita denaturoimalla ja avaamalla ne, mikä luo lisää pohjia alukkeille DNA synteesiä varten (Harris & Kadir 1998, 10).

Lopuksi reaktion annetaan jäähtyä joko huoneen lämpöön tai 4 °C, riippuen soveluksen kohteesta ja käytettävästä PCR-laitteesta (McPherson & Møller 2000, 10).

Ihanteellisessa tapauksessa halutun sekvenssin määrä kaksinkertaistuu jokaisella PCR-kierroksella, joten olisi mahdollista tuottaa  $10^6$  uutta säiettä vain 20:llä PCR-kierroksella. Mutta koska prosessin tehokkuus on noin 60–80%, tarvitaan usein 25–40 PCR-kierrosta tuottamaan haluttu määrä tiettyä sekvenssiä. (Harris & Kadir 1998, 10; McPherson & Møller 2000, 4, 5, 9, 13.) Kuvassa 6 on esimerkki PCR-

kierroksesta ja sen lämpötilan vaihtelusta, sekä esitetty lämpötilan vaihteluiden toistuvuus PCR-ohjelmassa.



Kuva 6. Esimerkki PCR-kierroksista ja näiden lämpötilojen vaihteluista.

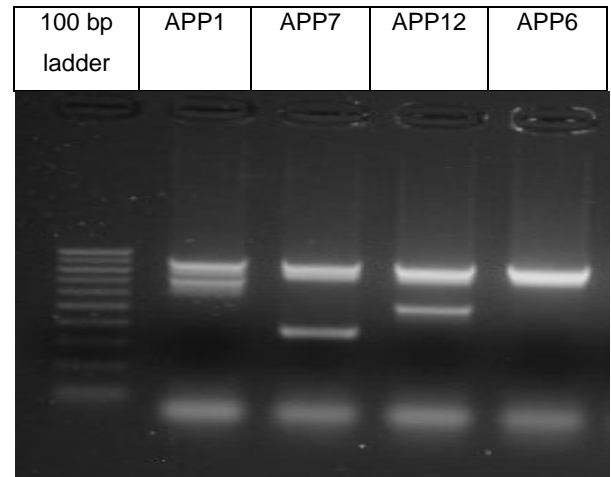
PCR:n optimoimiseksi reagenssien pitoisuuksia täytyy usein muuttaa, kuten myös annealing ja extension lämpötiloja ja aikoja (Harris & Kadir 1998, 22).

Prosessin helpottamiseksi käytetään PCR-laitetta, johon voidaan ohjelmoida useita PCR-ohjelmia nopean ja automatisoidun lämpötilan vaihtelun suorittamiseksi. Ennen PCR-laitteita, lämpötilan vaihtelut suoritettiin vesihauteilla, joissa kierrätettiin näytteitä manuaalisesti PCR:n aktivoitumiseksi. (Harris & Kadir 1998, 20; McPherson & Møller 2000, 5, 6.)

#### 2.2.4 PCR-reaktiotuotteiden analysointi

PCR:ssä tuotteiden pituudet esitetään muodossa bp, joka tulee sanoista base pair, suomeksi emäspari. Yksi bp tarkoittaa siis Watson-Crick-säännön mukaan kahta emäsosista toisiinsa liittynyttä nukleotidia, emäsparia.

Suorin tapa havaita PCR-tuotteita on erotella ne sähkövirran avulla, jossa negatiivisesti varautuneet DNA-molekyylit liikkuvat agarosigeelissä kohti positiivista päätä. Lyhyemmät DNA-ketjut liikkuvat nopeammin kuin pitkät osuudet. Kun näytteen viereen laitetaan DNA-markkeri, jonka DNA-molekyylien pituudet tiedetään, tuloksen lukeminen on helposti suoritettavissa. (Harris & Kadir 1998, 25; Zan-



Kuva 7. Serotyypien 1,7,12 PCR-ajo.

genberg ym. 1999, 73.) Kuvassa 7 vasemmassa reunassa on ensimmäisenä 100 bp ladder ("tikapuuasteikko"), jossa viivojen väli on aina 100 bp, tämän tiedon avulla voidaan laskea PCR-tuotteiden pituudet. Ladderin alin viiva on 100 bp:n mittainen, toinen viiva 200 bp:n mittainen ja lopulta ylin, eli kymmenes viiva on 1000 bp:n mittainen. Ladderista seuraavana ovat serotyypit 1, 7, 12 ja negatiivinen kontrolli tässä järjestyksessä. Jokaisessa näistä neljästä näkyy HP alukeparin tuottama 950 bp:n mittainen tuote ylimmäisenä, millä voidaan todeta, että kyseessä on APP, jos tätä viivaa ei ilmene, kyseessä ei ole APP. Ladderin avulla laskettuna ylin tuote vaikuttaa olevan yhdeksännen viivan kohdalla, eli voidaan päätellä tämän olevan oikein. Heti ladderin jälkeen on serotyyppi 1, jonka AP1 alukeparin tuottama 754 bp:n mittainen tuote näkyy hieman HP-tuotteiden alla, ladderin avulla laskettuna tämä tuote on seitsemännen viivan kohdalla. Seuraavana on serotyyppi 7 ja alukeparin AP7 tuottama 396 bp:n mittainen tuote, ladderissa se näkyy neljännen viivan kohdalla. Kolmantena on serotyyppi 12 ja alukeparin AP12 tuottama 559 bp:n mittainen tuote, joka pituudeltaan jää AP1:n ja AP7:n väliin, näkyy viidennen viivan kohdalla. Viimeisenä on negatiivinen kontrolli, jossa kuuluu olla vain HP alukeparin tuottama 950 bp:n mittainen tuote. Negatiivisena kontrollina käytetään kantaa, jonka serotyyppi ei ole tutkittavana oleva serotyyppi.

### 2.2.5 Reagenssit

PCR-reaktioseos sisältää ainakin puskuriliuoksen, magnesiumkloridin; joka sisältyy usein puskuriliuokseen, alukkeet, deoksinukleotidejä, polymeerasientsyymien ja DNA-templaatin (Harris & Kadir 1998, 15).

Reagenssit on hyvä sulattaa huolella ja sekoittaa kunnolla, mieluiten vortex-laitteella, jotta reagenssien konsentraatiot olisivat oikeat. Reagenssit tulee säilyttää tarpeeksi kylmissä olosuhteissa, jotta ne säilyisivät mahdollisimman hyvin. (McPherson & Møller 2000, 23.)

Puskuriliuos on yleensä kehitetty tietylle DNA-polymeerasientsyymille sen toiminnan optimoimiseksi. Voidaan myös käyttää yleistä puskuriliuosta tuottamaan hyviä tuloksia DNA-polymeerasientsyymien kanssa, tämä liuos sisältää; Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, gelatiini, Tween-20 ja NP-40. (Harris & Kadir 1998, 15, 16; McPherson & Møller 2000, 23, 24.)

Tris-HCl:n tarkoitus on pitää PCR-reaktioseoksen pH hallinnassa, jotta pH olisi mahdollisimman sopiva DNA-polymeerasientsyymeille. Tris -puskurin pH vaihtelee lämpötilan mukaan PCR:ssä 6.8 ja 8.3 välillä. (Harris & Kadir 1998, 16; McPherson & Møller 2000, 24.) pH 7.0–7.5 pidetään optimaalisena pH:na Taq polymeerasientsyymille (Harris & Kadir, 16).

KCl auttaa alukkeita ja templaatteja kiinnittymään toisiinsa, mutta liian suurissa pitoisuuksissa se voi toimia liian tehokkaasti aiheuttaen virheellisiä alukkeiden ja templaattien kiinnittymisiä, johtuen virheellisiin tuotteisiin (McPherson & Møller 2000, 24).

Magnesium (Mg) on yksi tärkeimmistä komponenteista PCR:ssä, sillä sen pitoisuus vaikuttaa reaktion spesifisyyteen ja tehokkuuteen. DNA-polymeerasientsyymien toiminta on riippuvaista Mg<sup>2+</sup>:sta. DNA-polymeerasientsyymien tuottajat valmistavat usein puskuriliuoksen jossa on liian vähän magnesiumia, jotta puskuriliuoksen käyttäjä voi optimoida magnesiumipitoisuuden sopivaksi käyttötarkoitukseen. (Harris & Kadir 1998, 16; McPherson & Møller 2000, 24, 25.)

Gelatiinia käytetään stabiloimaan polymeroitumisreaktiota (Harris & Kadir 1998, 18).

Nukleotidiseosten tulisi sisältää jokaista dNTP:tä yhtä paljon, muuten PCR:n tarkkuus kärsii. Mikäli dNTP-konsentraatiot on liian korkeat, DNA-polymeraasientsyymi tekee todennäköisemmin virheitä, jos taas konsentraatio on liian matala, PCR:n tehokkuus heikkenee. (Harris & Kadir 1998, 17; McPherson & Møller 2000, 26.)

Oligonukleotidialukkeet täytyy suunnitella hyvin tarkasti. Näitä tarvitaan kaksi samasta DNA-säikeestä. Ensin on tunnettava kohteen genomi, ja etsittävä siitä ainutlaatuinen nukleotidien järjestys. Alukkeen olisi hyvä olla noin 20–30 nukleotidia pitkä, sekä sisältää lähes saman verran eri nukleotideja. On myös tärkeää varmistaa, ettei siinä ole toistuvia osuuksia, koska ne voivat aiheuttaa väärin liittymistä tai liikkumista. Toinen aluke on suunniteltava samasta säikeestä hieman eri sijainnista, jotta monistumista tapahtuu näiden kahden alukkeen välisellä alueella. Lopuksi se ei saa liittyä muiden, toisista DNA-ketjuista rakennettujen, alukkeiden kanssa, joita käytetään samassa PCR:ssä. (Harris & Kadir 1998, 16, 17; McPherson & Møller 2000, 9, 26, 27.)

Alukkeiden konsentraatiot eivät saa olla liian korkeita, koska silloin virheitä tapahtuu todennäköisemmin (McPherson & Møller 2000, 32).

Polymeraasin pohjana toimii DNA-templaatti, josta otetaan malli polymeraasientsyymillä tuottamalle DNA-säikeelle. (Harris & Kadir 1998, 19)

DNA-synteesin aikana DNA-polymeraasientsyymi lisää oikeita nukleotideja alukkeeseen, vastassa olevan alkuperäisen ketjun mukaisesti, rakentaen näin uuden DNA-säikeen. Joissain DNA-polymeraasientsyymeissä on rakentamisen lisäksi myös "oikoluku", jolloin DNA-polymeraasientsyymi liikkuu kirjoittamansa ketjun takaisin alkuun päin "tarkistaen" rakenteen oikeellisuuden. Mikäli väärää nukleotideja löytyy, entsyymi poistaa virheellisen nukleotidin ketjusta ja lisää oikean virheellisen tilalle. (McPherson & Møller 2000, 34.)

Kun DNA-polymeraasientsyymejä vertaillaan keskenään, tarkastellaan yleensä tarkkuutta ja tehokkuutta. Tehokkuudessa taas katsotaan kuinka hyvin entsyymi

pysyy kiinni kopioitavassa ketjussa ja montako nukleotidia se pystyy liittämään sekunnissa. (McPherson & Møller 2000, 35.)

Ensimmäinen termostabiili DNA-polymeraasientsyymi on Taq DNA-polymeraasientsyymi, joka on saatu termofiilisestä bakteerista *Thermus aquaticus* (Harris & Kadir 1998, 8; McPherson & Møller 2000, 35, 37). Tämä Taq DNA-polymeraasientsyymi on nykyään yleisessä käytössä sen korkean toimintalämpötilan takia; sen optimaalinen toiminta-alue on 72–75 °C, minkä ansiosta voidaan käyttää korkeita lämpötiloja annealing vaiheessa. Korkean annealing lämpötilan avulla saadaan alukkeet liittymään tarkemmin oikeisiin kohteisiin. (Harris & Kadir, 17; McPherson & Møller, 35, 37.)

Taq DNA-polymeraasientsyymi on hyvä yleisentsyymi PCR-sovelluksiin, ja se pysyy monistamaan tuotteita melko tehokkaasti (Harris & Kadir 1998, 17; McPherson & Møller 2000, 37).

Taq DNA-polymeraasientsyymissä ei ole "oikoluku" toimintoa, joten mahdolliset virheet jäävät (Harris & Kadir 1998, 18; McPherson & Møller 2000, 39). Tutkimusten mukaan tämä ei kuitenkaan aiheuta juurikaan ongelmia. Samoissa tutkimuksissa on laskettu virheellisen nukleotidin esiintyvän noin  $10^4$  nukleotidin välein. Jos ajatellaan 400 bp mittaista kohde osuutta, joka monistetaan  $10^6$ -kertaiseksi, niin teoriassa joka kolmannessa tuotoksessa on yksi virheellinen nukleotidi. Mutta kun tarkoitus on saada tietyn mittaista tuotetta, nämä virheet eivät aiheuta ongelmia tulosten saamisessa. (McPherson & Møller, 39, 40.)

Sopivan DNA-polymeraasientsyymien löytäminen saattaa olla hankalaa, sillä entsyymien ei tulisi inaktivoitua korkeissa lämpötiloissa, joita käytetään denaturoitumiseen. Toiseksi sen olisi hyvä toimia tarpeeksi korkeassa lämpötilassa halutun tuotteen tuottamiseksi, koska matalissa lämpötiloissa alukkeet menevät helpommin väärin aloituskohtiin, ja tuottavat siten virheellisiä tuotteita. (McPherson & Møller 2000, 6.)



### 2.2.6 Multiplex

Multiplex PCR:ssä tutkitaan useita eri DNA-alueita näytteestä. Työskentely nopeutuu ja kontaminaatioiden riski pienenee, kun jokaiselle tutkittavalle DNA-alueelle ei tarvita omaa PCR-reaktioseosta. (Zangenberg ym. 1999, 73.)

Multiplex PCR:n optimointi on melkein sama kuin yksittäisen kohteen PCR. Alukkeet on valittava tarkkaan, jotta ne eivät yhdisty toistensa kanssa, tai jotta niiden tuotteet eivät mene ristiin. Näiden välttämiseksi käytetään sekvenssin samankaltaisuushakua (BLAST), joka auttaa samankaltaisuuksien löytämisessä ja käytettävien alukkeiden valinnassa. Alukkeiden tuotteilla pitäisi kuitenkin olla tarpeeksi pituuseroja, jotta ne ovat helppo lukea elektroforeesigeeliltä. (Zangenberg ym. 1999, 74–76.)

PCR-ohjelmassa lämpötilat täytyy säätää niin, että ne sopivat jokaiselle alukkeelle ja käytettävälle DNA-polymeraasientsyymille. Annealing -vaiheessa jokaisen alukkeen tulee pystyä liittymään oikeaan kohtaan, jotkut alukkeet tarvitsevat enemmän aikaa liittymiseen kuin toiset, riippuen alukkeen pituudesta. (Zangenberg ym. 1999, 81, 82.)

Extension -vaiheessa ajalla on suurin vaikutus, jos PCR-tuote on pitkä, se tarvitsee enemmän aikaa suoristua kuin lyhyet PCR-tuotteet. Myös käytettävän DNA-polymeraasientsyymien tehokkuus vaikuttaa tarvittavaan aikaan DNA-synteesin valmiiksi saattamisessa. (Zangenberg ym. 1999, 82.)

### 3 APP:n serotyypityksessä käytetyn PCR-menetelmän validointi

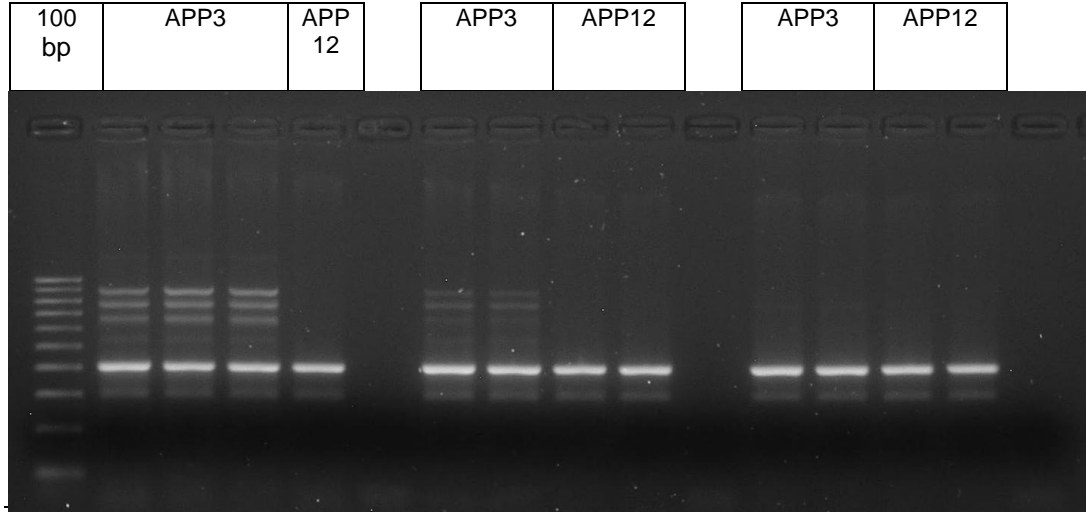
Validointi tarkoittaa prosessin vahvistamista niin, että se täyttää ennalta määrätyt kriteerit. Tässä tapauksessa pystytettiin menetelmä, jolla saadaan kontrollikannoille toimiva ja toistettava PCR-menetelmä. Kontrollikannat oli tilattu paikasta, jossa on validi menetelmä APP:n serotyyppien määrittämiseen.

APP:n serotyyppien 1,7,12 ja 3,6,8 PCR-menetelmien validoinnista tiedettiin haluttu tulos ja tarvittavat alukkeet, joiden selvittämisessä oltiin hyödynnetty julkaisuja Angen ym. (2003) ja Zhou ym. (2008). Vaikka menetelmän pääpiirteet olivat selvillä, se täytyi kuitenkin saada toimivaksi Eviran Seinäjoen toimipisteen laitteilla, jotta menetelmä olisi validi.

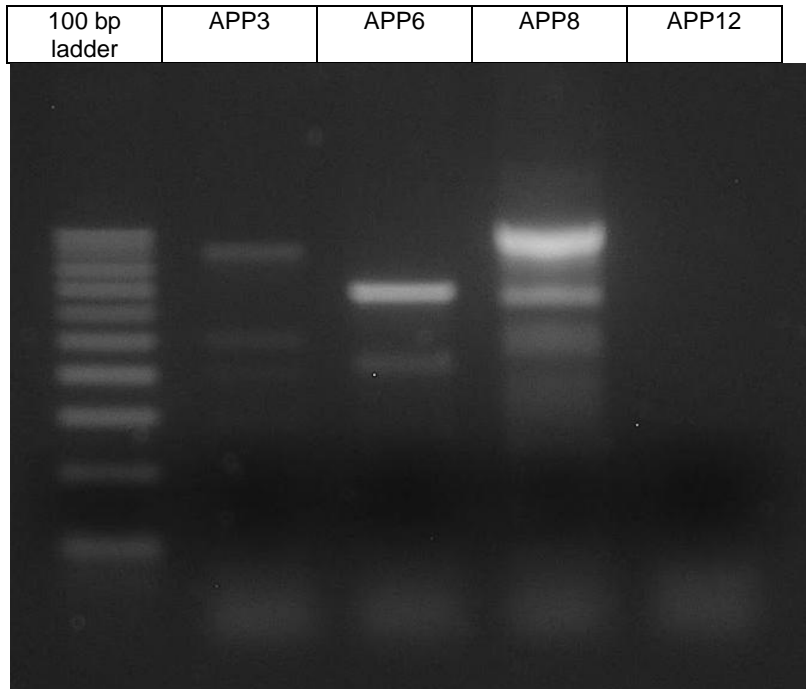
Työskentelyn alussa hyödynnettiin Eviran Seinäjoen toimipisteen aikaisempaa APP:n serotyyppien 2, 5 ja 6 validointia, jonka pohjalta osattiin arvioida tarvittavia alukekonsentraatioita ja PCR-ohjelmaa. Matriisina käytettiin bakteerin puhdasviljelmiä Cem-1-agarilla (contagious equine metritis -agar). Kokeilemalla haettiin, millä asetuksella saadaan tarkimmat tulokset. Testeissä huomattiin, että serotyypeille 2,5,6 käytettävä PCR-ohjelma toimi myös serotyypeille 1,7,12 ja serotyypeille 3,6,8 tuottaen halutut PCR-tuotteet. Ensimmäisen PCR-ajon jälkeen saatiin selville, pitääkö alukekonsentraatiota nostaa, tai jopa laskea, sekä täytyykö käyttää eri PCR-ohjelmaa.

Serotyypeille 2,5,6 käytössä oleva PCR-ohjelma toimi myös serotyypeille 1,7,12 moitteettomasti. Kaikki kohde-DNA:t monistuivat, eikä epäspesifistä monistumista havaittu. Serotyyppien 3,6,8 PCR-ohjelman optimointi kohtasi vaikeuksia. Serotyyppi 3 tuotti ylimääräistä reaktiotuotetta, jota ei saatu poistettua alukekonsentraation tai PCR-ohjelman lämpötilojen muutoksilla. Alukekonsentraation muutokset vaikuttivat vain tuotteiden vahvuuteen, mutta ylimääräisiä 700 – 800 bp:n mittaisia tuotteita ei saatu poistettua, kuvassa 8 näkyy selvästi tuotteiden vahvuuden heikkeneminen alukekonsentraation laskiessa. Myös annealing lämpötilaa yritettiin muokata, mutta jo annealing lämpötilan nostaminen 60 °C:sta 61 °C:een esti APX:n tuotteen muodostumisen, tämä voidaan nähdä vertaamalla kuvan 9 annealing lämpötilan ollessa 61 °C kuvan 10 100 bp ladderin vasemmalla puolella olevaan 60 °C annealing lämpötilaan. Vastaavasti serotyyppi 8 tuotti ylimääräisiä

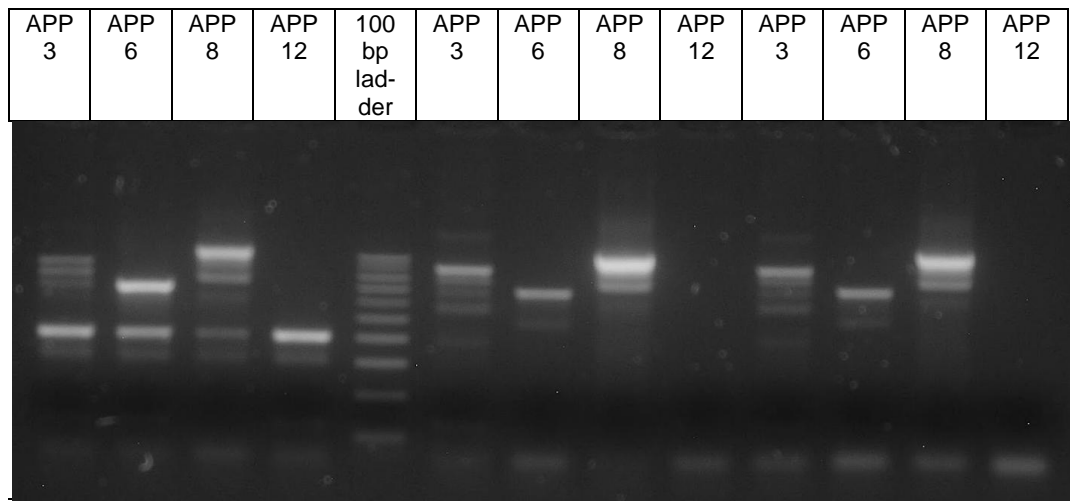
800 – 1000 bp:n mittaisia tuotteita, näistäkään ei päästy eroon. Eviran Seinäjoen toimipisteessä kuitenkin todettiin, ettei se vaikuta tulosten lukuun, koska se ei ole päällekkäin minkään halutun reaktiotuotteen kanssa, ja serotyyppi 3 on ainut joka tuottaa kyseistä ylimääräistä reaktiotuotetta.



Kuva. 8 Serotyyppi 3 kolmalle eri alukekonsentraatiolla.



Kuva 9. Serotyyppien 3,6,8 PCR-ajo annealing lämpötilan ollessa 61 °C.



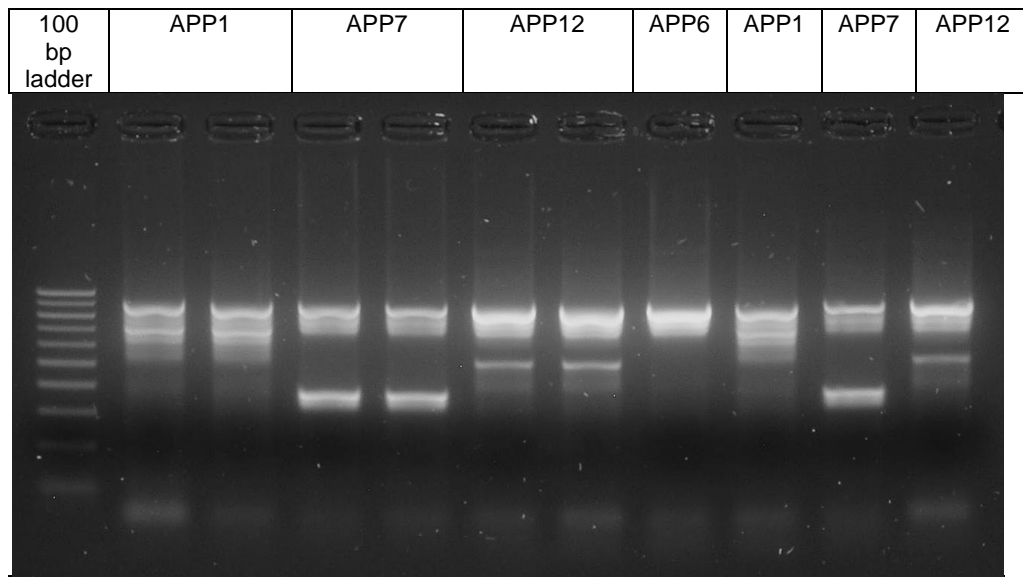
Kuva 10. Serotyyppien 3,6,8 PCR-ajot, 100 bp ladderin vasemmalla puolella annealing lämpötila oli 60 °C ja 100 bp ladderin oikealla puolella annealing lämpötila oli 63 °C.

Reaktioseoksen optimoinnissa aiemmin validoidun 2,5,6-menetelmän PCR-reaktioseos näytti toimivan hyvin näissäkin tapauksissa. Templaattina käytettiin kuitenkin 2 µl:n tilavuutta 1 µl:n sijasta, koska suuremmalla templaatti määrällä PCR:t tuottivat voimakkaammat ja helpommin luettavat tulokset. Serotyypeille 3 ja 8 kokeiltiin useampia alukekonsentraatioita ylimääräisten tuotteiden takia. Serotyypin 3:n kohdalla myös oikeiden tuotteiden määrä väheni alukekonsentraation laskiessa, mikä teki tulosten lukemisesta vaikeaa. Serotyypin 8:n kohdalla kokeiltiin kahta eri alukekonsentraatiota, mutta suurta eroa tuotteiden monistumisessa ei havaittu.

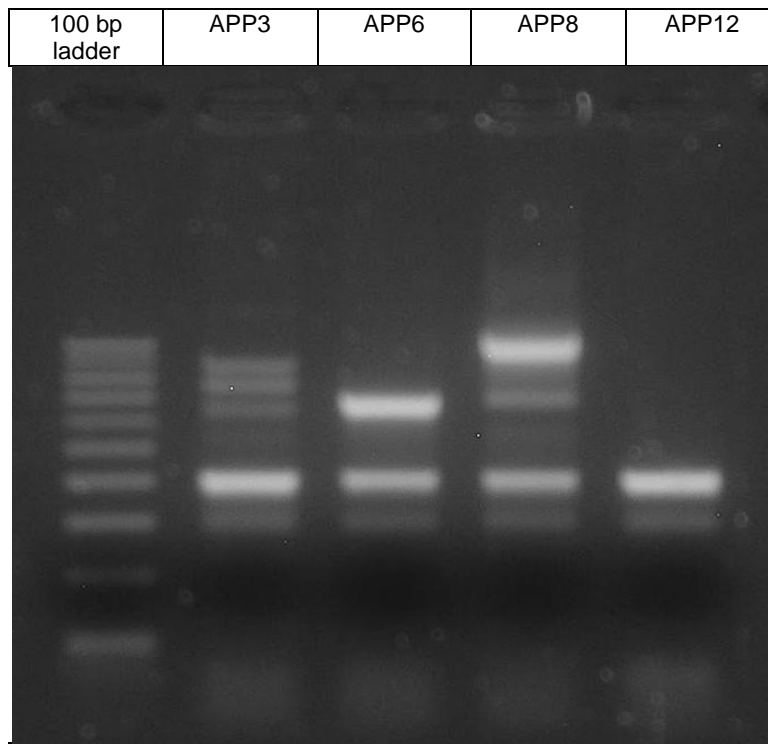
Taulukko 1. Käytetyt alukeparit.

Alukeparin nimi	Mitä sillä tunnistetaan	PCR-tuotteen pituus
HP	APP-bakteeri	950 bp
AP1	serotyyppi 1	754 bp
AP7	serotyyppi 7	396 bp
AP12	serotyyppi 12	559 bp
APX	APP-bakteeri	417 bp
AP3	serotyyppi 3	921 bp
AP6	serotyyppi 6	718 bp
AP8	serotyyppi 8	1106 bp

Käytettävien alukkeiden spesifisyys tarkastettiin National Center for Biotechnology Informationin (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool -ohjelmalla (BLAST), joka vertaa alukkeiden sekvenssejä geenipankista löytyneisiin sekvensseihin. Alukepari AP1 voi mahdollisesti monistaa myös ihmisen proteiineja tuottavia geenejä, näiden tuotteiden pituudet olisivat kuitenkin pituudeltaan 1057 bp, joten sekaannusta tulosten luennassa ei synny. Sekvenssivertailussa ilmeni, että kahdessa Japanissa havaitussa serotyypin 6:n isolaatissa on spesifiset sitoutumispaikat myös AP3-alukkeille, ja tästä monistuva tuote olisi pituudeltaan 921 bp. Kuitenkin pelkästään AP3-alukkeita käytettäessä näyte voitaisiin todeta väärin APP:n serotyypiksi 3, mutta multiplex-tyyppisessä 3,6,8-tyyppauksessa näytteestä monistuu myös serotyypin 6 tuote (718 bp). Lisäksi näytteet testataan ensin 2,5,6-tyyppauksella, joten sekaannusta ei tässä pääse tapahtumaan. Kuvassa 11 näkyy selvästi serotyypin 1 tuottama 754 bp:n mittainen tuote, serotyypin 7 tuottama 396 bp:n mittainen tuote, serotyypin 12 tuottama 559 bp:n mittainen tuote sekä APP:n tuottama 950 bp:n mittainen tuote. Kuvassa 12 näkyy APP:n tuottama 417 bp:n mittainen tuote, serotyypin 3 tuottama 921 bp:n mittainen tuote ja ylimääräiset 700 – 800 bp:n mittaiset tuotteet, serotyypin 6 tuottama 718 bp:n mittainen tuote sekä serotyypin 8 tuottama 1106 bp:n mittainen tuote ja ylimääräiset 800 – 1000 bp:n mittaiset tuotteet.



Kuva 11. Serotyyppien 1,7,12 PCR-ajo.



Kuva 12. Serotyypien 3,6,8 PCR-ajo.

Menetelmän toistettavuuden testaamiseksi kaksi eri henkilöä suoritti testit Eviran Seinäjoen toimipaikassa lyhyen ajan sisällä. Sekä serotyypien 1,7,12 ja serotyypien 3,6,8 testeistä saatiin kaikista tutkituista referenssikannoista keskenään yhtenäiset oikeat tulokset.

Menetelmän uusittavuuden tarkistamiseksi kontrollikantojen PCR-ajot suoritettiin serotyypeille 1,7,12 ja serotyypeille 3,6,8 lyhyen ajan sisällä kahteen kertaan. Uu-sinnassa tulokset olivat oikeita ja yhteneväiset aiempiin tuloksiin verrattuna.

Opinnäytetyössä laaditut validointiraportit ovat liitteinä 1 ja 2.

## 4 Menetelmän kuvaus

Työskentelyssä noudatettiin Eviran ohjeita, ja käytettiin asianmukaisia varusteita ja desinfiointiaineita. Työskentely aloitettiin kasvattamalla APP-kantoja CEM-1 -maljoilla yhden vuorokauden ajan 37°C lämpöisessä inkubointikaapissa, kannat haettiin syväjäädästä. Kasvatuksen jälkeen tehtiin ultrapuhtaaseen veteen bakteerivesisuspensio, jonka sakeus oli McFarland-sakeusmittarilla mitattuna 4–5 McFarlandia. Saatua bakteerivesisuspensiota käytettiin templaattina, joka voidaan laittaa pakkaseen odottamaan käyttöä.

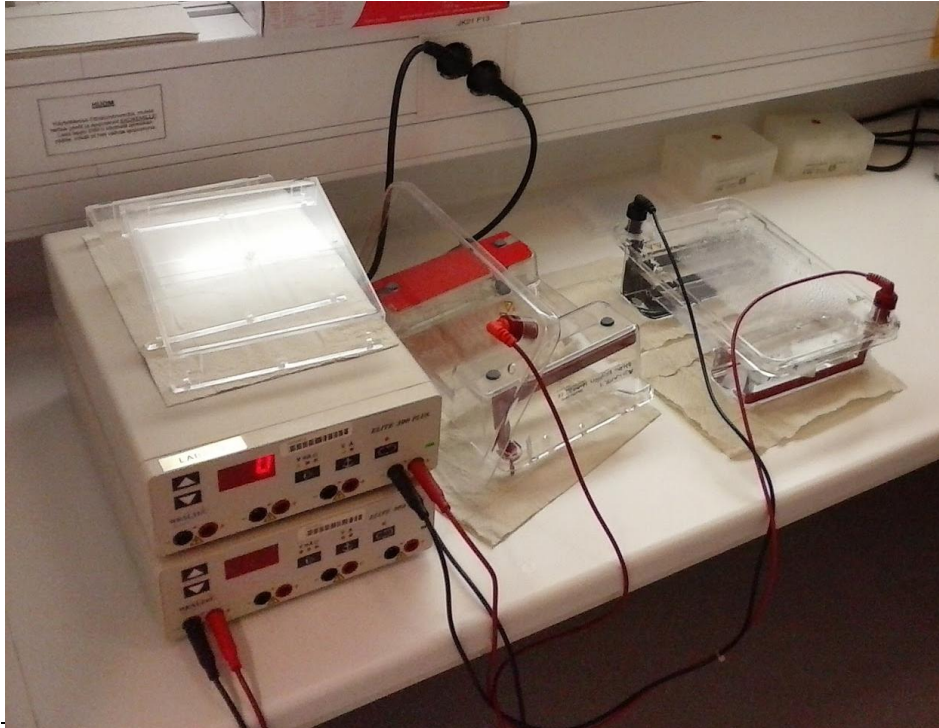
PCR-reaktioseosta tehdessä otettiin ensin sulamaan tarvittavat kontrollinäytteet ja tutkittavat kannat. Erillisessä PCR-tilassa tehtiin reaktioseos, johon lisättiin nukleasivapaata vettä, puskuriliuosta DyNAzymelle, dNTP:tä, alukeseosta tai alukkeita, ja DyNAzyme II DNA polymeraasi entsyymiä. Reaktioseoksen ollessa valmis, siihen lisättiin templaatti, joka oli joko kontrollikanta, kontrollivesi tai tutkittava kanta. Tämän seos vietiin PCR-laitteelle (kuva 13) ja ajettiin ohjelma, jolla saatiin monistettua haluttuja PCR-tuotteita.

PCR-laitteen ajo kestää noin 2 tuntia ja 30 minuuttia, PCR-ajon ollessa käynnissä valmistettiin 2% geeli elektroforeesiin, johon lisättiin SYBR Safe DNA Gel Stain

värjäysainetta. Valmiiseen reaktiotuotteeseen lisättiin Blue Juice väriainetta. Geelin ja reaktiotuotteen ollessa valmiita suoritettiin agarosigeelielektroforeesi-ajo (Kuva 14). Geelin ajo tapahtui 100 voltin jännitteellä 45 minuutin ajan.



Kuva 13. Thermal Cycler, jolla suoritettiin PCR-ajot.

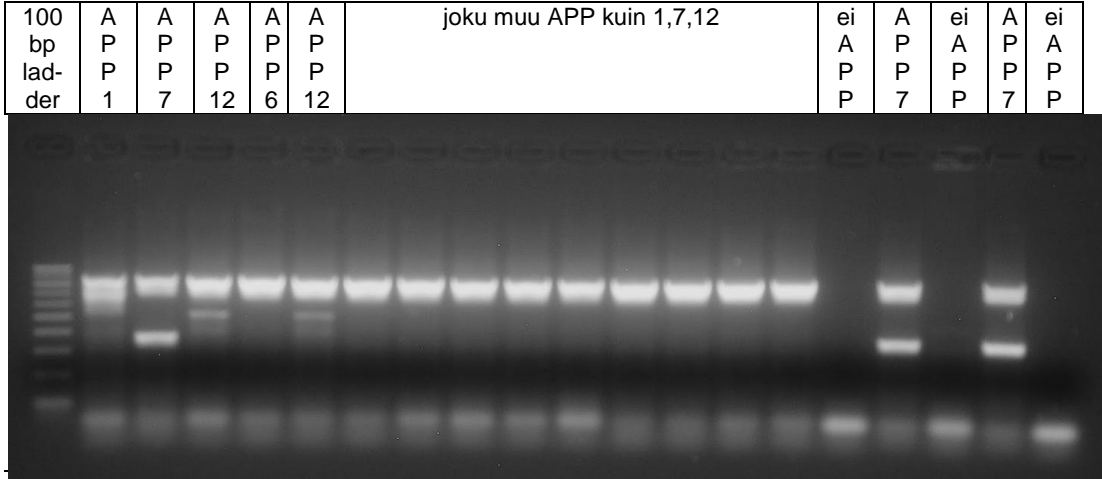


Kuva 14. Agaroosielektroforeesi-ajolaite PCR-tuotteiden havaitsemiseksi.

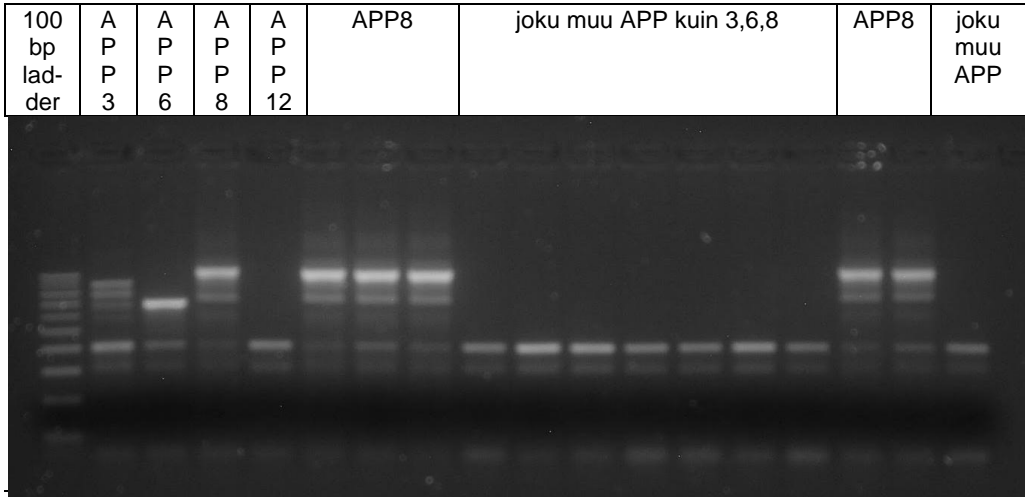
Ajon jälkeen geeli siirrettiin kuvantamiskaappiin, johon valittiin Ethidium Bromide (EtBr.) Colormetric suodatin ja läpivalaiseva UV -valo. Kuvantamiskaapissa olevasta geelistä otettiin kuva, jota pystyttiin tarkastelemaan tietokoneelta ja jonka pystyttiin tulostamaan. Kuvassa kontrollikantojen ja kontrolliveden täytyi antaa oikeat tulokset, jotta tutkittavat kannat pystyttiin lukemaan oikein. Mikäli kontrolleissa on virheitä, PCR-ajo täytyy suorittaa uudelleen. Saatujen reaktiotuotteiden perusteella pystyttiin katsomaan, mitä serotyyppiä tutkittava kanta oli.

Validoinnin jälkeen tutkittiin syväjäässä olevia tyypittämättömiä kantoja, kuvassa 15 onnistuneiden kolmen positiivisen ja yhden negatiivisen kontrollin jälkeen näkyy serotyyppiä 12 oleva kanta, geelin oikeassa reunassa taas näkyy kaksi serotyyppiä 7 olevaa kantaa sekä kolme kantaa, jotka eivät olleetkaan APP:tä. Kuvassa 16 onnistuneiden kontrollien jälkeen näkyy kolme serotyyppiä 8 olevaa kantaa, ja geelin oikeassa reunassa kaksi serotyyppiä 8 olevaa kantaa. Kuvissa 15 ja 16 olleiden ajojen, sekä aikaisemman serotyyppien 2,5,6 ajon, perusteella tyypittämättömät kannat ovat joko serotyyppiä 4, 9, 10, 11, 13, 14 tai 15.





Kuva 15. Serotyyppien 1,7,12 PCR-ajo.



Kuva 16. Serotyyppien 3,6,8 PCR-ajo.

## 5 Yhteenveto

PCR menetelmät saatiin pystytettyä ja validoitua vaaditulla tavalla. Menetelmien avulla voidaan tyypittää APP-kantoja Eviran Seinäjoen toimipisteessä, tyypittämisen avulla voidaan saada tietoa taudin epidemiologiasta.

Eviran Seinäjoen toimipisteessä olevilla menetelmillä ei saada kaikkia serotyyppejä tutkittua, vaan osa jää tyypittämättömiksi. Työtä voisi jatkaa tutkimalla näiden serotyyppien PCR-menetelmiä ja mahdollisuuksia muihin multiplex-PCR-menetelmiin tyypittämisen mahdollistamiseksi.

## LÄHTEET

- Angen, Ø., Ahrens, P. & Jessing, S.G. 2003. Development of multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. [Verkkolehtiartikkeli]. *Veterinary Microbiology*. 132 (3–4), 312–318. [Viitattu 4.5.2017]. Saatavana: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.010>
- Bossé, J. T., Li, Y., Sárközi, R., Gottschalk, M., Angen, Ø., Nedbalcova, K., Rycroft, A. N., Fodor, L. & Langford, P. R. 2017. A Unique Capsule Locus in the Newly Designated *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovat 16 and Development of a Diagnostic PCR Assay. [Verkkolehtiartikkeli]. *Journal of Clinical Microbiology*. 55 (3), 902–907. [Viitattu 4.5.2017]. Saatavana: <https://doi.org/10.1128/JCM.02166-16>
- Caswell, J. L. & Williams, K. J. 2007. Respiratory system: Bacterial diseases: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Maxie, G. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals: Volume 2. Fifth edition. United States of America: Elsevier Limited, 587–589.
- ETT (Eläinten terveyst ETT ry). Ei päiväystä. Paiseinen keuhkokalvontulehdus (App.). [Verkkosivu]. Seinäjoki: Eläinten terveyst ETT ry. [Viitattu 6.2.2017]. Saatavana: [http://www.ett.fi/tarttuvat\\_taudit/sikojen\\_tarttuvat\\_taudit/paiseinen\\_keuhkokalvontulehdus](http://www.ett.fi/tarttuvat_taudit/sikojen_tarttuvat_taudit/paiseinen_keuhkokalvontulehdus)
- Gottschalk, M. 2012. Actinobacillosis: ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE. In: Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. Diseases of swine: 10th edition. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 653–665.
- Harris, E., Kadir, N. 1998. A Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York: Oxford University Press.
- Marin, S. 2017. Tutkija. Evira. [Henkilökohtainen sähköpostiviesti]. Vastaanottaja: Jussi Jokisalo. [Viitattu 10.5.2017].
- McPherson, M.J., Møller, S.G. 2000. PCR. United Kingdom: CRC Press.
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E., Fanning, S., Hartigan, P. 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*: 2nd edition. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., Constable, P. 2007. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10th edition. United States of America: Saunders Elsevier.

- Taylor, D. J. 1999. Pig diseases: Seventh edition. Great Britain: Dr. D. J. Taylor.
- Zangenberg, G., Saiki, R. K. & Reynolds, R. 1999. MULTIPLEX PCR: OPTIMIZATION GUIDELINES. In: Gelfand, D. H., Innis, M. A., Sninsky, J. J. PCR Applications: Protocols for Functional Genomics. San Diego, California: Academic Press, 73–94.
- Zhou, L., Jones, S. C. P., Angen, Ø., Bossé, J. T., Nash, J. H. E., Frey, J., Zhou, R., Chen, H. C., Kroll, J. S., Rycroft, A. N. & Langford, P. R. 2008. Multiplex PCR That Can Distinguish between Immunologically Cross- Reactive Serovats 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains. [Verkkolehtiartikkeli]. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (2), 800–803. [Viitattu 4.5.2017]. Saatavana: <https://doi.org/10.1128/JCM.01787-07>

## LIITTEET

Liite 1. Validointiraportti: *Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteerin tyypitys multiplex PCR –menetelmällä serotyypeille 1, 7 ja 12

Liite 2. Validointiraportti: *Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteerin tyypitys multiplex PCR –menetelmällä serotyypeille 3,6 ja 8

## Liite 1. VALIDOINTIRAPORTTI

### *Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteerin tyypitys multiplex PCR –menetelmällä serotyypeille 1, 7 ja 12

Laatijat: Jussi Jokisalo, Petra Heikkinen ja Mirja Raunio-Saarnisto  
Aika: 10.10.2016  
Paikka: TUVI, Oulu ja Seinäjoki

#### 1. Testin tarkoitus, matriisi, validointitarpeen arviointi ja aikataulu

Testin tarkoituksena on tyypittää PCR-menetelmällä siasta eristettyjä *Actinobacillus pleuropneumoniae* -kantoja. Bakteeri aiheuttaa siolla märkiviä keuhkojen ja keuhkokalvon tulehduksia. Tyypitystä tehdään tällä hetkellä projektiluontoisesti. Kantojen tyypittämisellä voidaan saada tietoa taudin epidemiologiasta.

Matriisina käytettiin bakteerin puhtasviljelmiä Cem-1-agarilla. Tutkimuksessa käytettiin yliyön kasvustosta tehtyä bakteerin vesisuspensiota.

Validointitarve arvioitiin luokaksi 2 (tunnettu, mutta ei kollaboratiivisesti testattu menetelmä).

Menetelmä on kuvattu seuraavassa julkaisussa:

Angen Ø., Ahrens P. and Jessing S.G., (2003) Development of multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Veterinary Microbiology*. 132: 312-318, doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.010

Aikataulu: Menetelmän testausta tehtiin keväällä 2016 ja raportti valmistui syksyllä 2016.

#### 2. Materiaalit

Testauksessa käytettiin seuraavia laitteita ja kemikaaleja:

- sentrifuugi
- vortex
- PCR-laite
- mikroaaltouuni
- elektroforeesiajolaite
- geelin kuvantamislaitte ja –ohjelma
- Water Nuclease Free
- DyNAzyme II DNA Polymerase 2 U/μL + 10x puskuri
- 10 mM dNTP
- agarooosi
- TAE-puskuri
- SYBR Safe DNA Gel Stain
- kokostandardi, 100 bp DNA-ladder
- 10x Blue Juice, Gel Loading Buffer

Taulukko1. Käytetyt alukkeet ja niiden spesifisyys

Aluke:	Spesifisyys:	Sekvenssi: 5´ - 3´-suunta	PCR-tuote: (emästä)
HPF HPR	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	AAGGTTGATATGTCCGCACC CACCGATTACGCCTTGCCA	950
AP1F AP1R	serovar 1	GGGCAAGCCTCTGCTCGTAA GAAAGAACCAAGCTCCTGCAAT	754
AP7F AP7R	serovar 7	GGTGACTGGCGTACGCCAAA GGGCTGCAGACTGACGTAA	396
AP12F AP12R	serovar 12	GGTTCTCCAGATGACTCTGAAA GCTATTGGATGAAGATGACTCAT	559

Lisäksi käytettiin tavallisia laboratoriokemikaaleja (kuten: etanoli ja ddH<sub>2</sub>O) ja -materiaaleja (esim. pipetinkärjet ja eppendorf-putket).

Referenssimateriaalina käytettiin kolmea vertailukantaa, jotka edustavat serotyyppejä 1, 7 ja 12. Referenssikannat on lähettänyt Angen Øystein, Senior scientist, Division of Veterinary Diagnostics and Research, DTU Veterinary, Technical University of Denmark. Kantoja on säilytetty Eviran Kuopion toimipaikassa.

### 3. Arvioitavat tekijät

- 3.1. Alukkeiden spesifisyyden tarkastus NCBI/blast-ohjelmalla.
- 3.2. Reaktioseoksen ja PCR-ohjelman toimivuus
- 3.3. Menetelmän toistettavuus
- 3.4. Menetelmän uusittavuus

### 4. Tulokset

Validoinnin positiivisina kontrolleina käytettiin *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyyppejä 1,7 ja 12. Negatiivisina kontrolleina käytettiin *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyyppiä 6, sekä vesinäytettä.

#### 4.1 Alukkeiden spesifisyyden tarkastus NCBI/blast-ohjelmalla.

Alukkeiden spesifisyydet tarkastettiin NCBI/blast-ohjelmalla vertaamalla alukkeiden sekvenssejä geenipankista löytyneisiin sekvensseihin.

Vertailutulokset löytyvät taulukosta ja liitteistä:

[App sekvenssivert.xlsx](#)

[BlastAppHP.docx](#)

[BlastAppAP1.docx](#)

[BlastAppAP7.docx](#)

[BlastAppAP12.docx](#)

APP, APP7 ja APP12-alukeparit ovat geenipankin vertailun mukaan spesifisiä vastaaville App-serotyypille, monistaen vain serotyypille ominaisen PCR-tuotteen, joiden koot ovat taulukon 1 mukaisia. Alukepari APP1, joka monistaa 754 bp:n kokoisen tuotteen serotyyppistään, on mahdollista monistaa myös ihmisen proteiineja tuottavia geenejä. Tästä syntyvät tuotteet olisivat kuitenkin suurempia (1057 bp), joten sekaannusta tulosten tulkinnassa ei voi syntyä.

## 4.2. Reaktioseoksen ja PCR-ohjelman toimivuus

Testauksessa käytettiin hyväksi aikaisemmin validoidusta APP 2,5,6-menetelmästä saatuja tietoja templaattisuspension vahvuudesta.

[\\evira.local\evira\TUTO\TUVI\TUVIn\\_Yhteiset\PCR-suunnitelmat\Actinobacillus\\_pleuropneumoniae\Validointiraportti\\_PCR\\_Actinobacillus.docx](\\evira.local\evira\TUTO\TUVI\TUVIn_Yhteiset\PCR-suunnitelmat\Actinobacillus_pleuropneumoniae\Validointiraportti_PCR_Actinobacillus.docx)

Tämän johdosta käytimme heti sakeaa, 4-5 McF-vahvuista, bakteerisuspensiota templaattina.

### 4.2.1. PCR-ohjelman optimointi

PCR-ohjelmana käytettiin APP 2,5,6-ohjelmaa, joka toimi hyvin myös tässä serotyypin 1, 7 ja 12 erottelussa. Kaikki kohde-DNA:t monistuivat, eikä epäspesifistä monistumista havaittu.

Ohjelman nimi: APP 2,5,6, ohjelman kesto n. 2h 35min

5 min 95°C	} x35
1 min 94°C	
1 min 60°C	
1 min 72°C	
5 min 72°C	
pito 10°C	

### 4.2.2. PCR-reaktioseoksen optimointi

Aiemmin validoidun 2,5,6-menetelmän PCR-reaktiomix näytti toimivan hyvin tässäkin tapauksessa. Ensimmäisillä kerroilla PCR-tuotteiden monistuvuudessa oli hieman vaihtelua, mutta työn rutinoituessa myös tulokset vakiintuivat. Templaattina päätettiin käyttää 2 µl:n tilavuutta 1 µl:n sijasta, koska alusta alkaen suuremmalla määrällä tehdyt PCR:t tuottivat voimakkaammat tuotteet. Pipetointia helpottamaan yhdistettiin käytettävistä alukkeista seos seuraavasti:

#### App 1,7,12 -alukeseos:

H <sub>2</sub> O	900 µl	
HPF	10 µl kantaliuosta (100 µM)	
HPR	10 µl kantaliuosta (100 µM)	
AP1F	10 µl kantaliuosta (100 µM)	
AP1R	10 µl kantaliuosta (100 µM)	
AP7F	20 µl kantaliuosta (100 µM)	
AP7R	20 µl kantaliuosta (100 µM)	
AP12F	10 µl kantaliuosta (100 µM)	
AP12R	10 µl kantaliuosta (100 µM)	Yht. 1 ml

App 1,7,12 -seoksessa alukkeiden konsentraatiot ovat seuraavat:

HP (F ja R): 1 µM

AP1 (F ja R): 1 µM

AP7 (F ja R): 2 µM

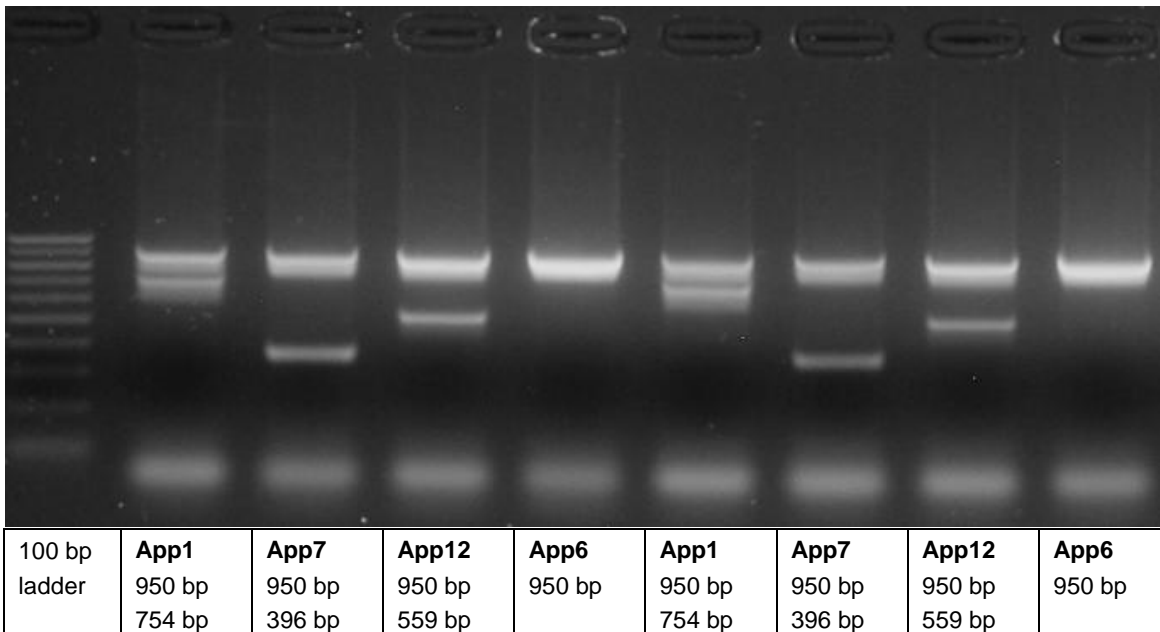
AP12 (F ja R): 1 µM



App 1,7,12 -reaktiomix on seuraava:

reagenssi	µl / reaktio	pitoisuus lopullisessa PCR-reaktiossa
H <sub>2</sub> O	6,875	
10 x puskuri, sis 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> (Dynazyme II)	2,5	1x
10 mM dNTP	0,5	0,2 mM
App 1,7,12-alukeseos	12,5	HP: 0,5 µM AP1: 0,5 µM AP7: 1 µM AP12: 0,5 µM
Dynazyme II (2U/µl)	0,625	1,25 U
näyte (bakteerisuspensio)	2	
Lopputilavuus	25	

Tällä reaktiomixillä ja PCR-ohjelmalla kontrollikannoista saatiin ilmentymään oikeat serotyypispesifiset tuotteet, eikä ylimääräistä epäspesifistä monistumista tapahtunut (kuva 1).



Kuva1. *Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteerikantojen serotyypien 1, 7 ja 12 monistuvat tuotteet App1,7,12 –PCR:ssa.

#### 4.2.3. Menetelmän toistettavuus

Kaksi eri henkilöä on tehnyt testin lyhyen ajan sisällä Seinäjoen toimipaikassa:

24.2.2016 Jussi Jokisalo suoritti PCR-testin, tulokuva: 160224.tif

2.3.2016 Mirva Inkiläinen suoritti PCR-testin, tulokuva: 160302.tif

Henkilöiden suorittamissa testauksissa kaikista tutkituista referenssikannoista saatiin keskenään yhtenäiset oikeat tulokset.

#### 4.2.4 Menetelmän uusittavuus

Jussi Jokisalo on suorittanut kontrollikantojen PCR-ajon tällä menetelmällä 24.2.2016 ja 15.3.2016. Uusinnassa tulokset olivat oikeat ja yhteneväiset aiempiin tuloksiin verrattuna.

### 4.3. Dokumentointi

Validoinnin ongelmien selvittely, ohjeistus ja pipetointikaaviot löytyvät kansiossa:

[..\Actinobacillus pleuropneumoniae](#)

Pipetointitaulukot on kerätty mappiin Seinäjoen laboratoriossa ja kuvat testauksesta löytyvät kansiossa:

[\\evira.local\evira\TUTO\TUVI\Seinäjoen\\_Yhteiset\Kuvat\PCR\APP](#)

### 5. Yhteenveto

Menetelmä pystytettiin kahden toimipaikan yhteistyöllä. Petra Heikkinen Oulusta vastasi ohjeistuksesta ja ongelmatilanteiden selvittelyssä, ja työn toteutuksesta vastasi Jussi Jokisalo Seinäjoella.

Menetelmää tarvitaan Seinäjoelle kerättyjen *Actinobacillus pleuropneumoniae* -kantojen tyyppitykseen. Menetelmällä saadaan tunnistettua spesifisesti App serotyypit 1, 7 ja 12 bakteerisuspensioista. Tutkimuksessa käytetään edullista perinteistä PCR:ta, eikä templaattina käytetylle bakteerille tarvitse tehdä aikaa vievää ja kallista dna:n eristystä kaupallisella kitillä.

Alukkeet monistavat tässä multiplex-PCR-menetelmässä spesifisesti *Actinobacillus pleuropneumoniae* -serotyyppejä, joille ne on suunniteltu. Menetelmän toimivuuden kannalta on tärkeää, että käytetty bakteerisuspensio on vähintään 4 McF. PCR-tuotteiden monistustehokkuus saattaa vaihdella hieman rinnakkaisten määritysten välillä.

Testi on hyväksytty, jos PCR antaa kaikille *Actinobacillus pleuropneumoniae* -kannoille 950 emäksen kokoiset tuotteet, sekä lisäksi serotyypeille 1,7 ja 12 vastaavasti 754, 396 ja 559 emäksen kokoiset tuotteet. Negatiivisen kontrollin (App6) tulee tuottaa vain 950 emäksen tuote ja vesinäytteenä monistumista ei saa tapahtua.

Testi on uusittava jos jokin positiivisista kontrolleista ei ole toiminut. Samoin tulee toimia, jos negatiivinen kontrolli on antanut positiivisen signaalin. Mikäli kontrollit antavat väärä tuloksia myös uusinnassa, tulee virhelähde selvittää ennen jatkamista.

Testi voi antaa väärän positiivisen tuloksen, jos ympäristö tai reagenssit ovat kontaminoituneet kohde-DNA:lla tai jos reaktiolämpötilat tai -ajat eivät ole ohjeen mukaiset.

Testi voi antaa väärän negatiivisen tuloksen, jos reagenssit ovat vanhentuneet tai inaktivoituneet, jos jonkin reagenssin pitoisuus reaktioseoksessa ei ole oikea tai reagenssi puuttuu kokonaan (pipetointi- tai laskentavirhe) tai jos reaktiolämpötilat tai -ajat eivät ole ohjeen mukaiset.

Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus on testattu Seinäjoen toimipaikassa Jussi Jokisalon ja Mirva Inkiläisen toimesta. Tulokset olivat yhteneväiset ja oikeat kaikkien testattujen näytteiden suhteen.

Menetelmän toimivuutta seurataan kirjaamalla tyyppitettyjen kontrollinäytteiden toiminta jokaisella testauksella PCR-ajojen kontrollien seurantalomakkeelle (LAB 3097). Myös kaikki muutokset ohjeesta dokumentoidaan PCR-pipetointilomakkeeseen. Laitteiden ylläpidossa noudatetaan kalibrointi- ja laatuohjeistusta.

Menetelmän työohje:

LAB 2021: *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiplex-PCR, serotyypit 1, 7 ja 12

Validointimateriaali löytyy kansiossa:

[..\Actinobacillus pleuropneumoniae](#)

**6. Validointiraportin käsittely ja hyväksyntä**

Missä/millä kokoonpanolla käsitelty?

Yksikönjohtajan / jaostopäällikön hyväksyntä

---

pp.kk.vvvv

## Liite 2. VALIDOINTIRAPORTTI

### *Actinobacillus pleuropneumoniae* -bakteerin tyypitys multiplex PCR -menetelmällä serotyypeille 3,6 ja 8

Laatijat: Jussi Jokisalo, Petra Heikkinen ja Mirja Raunio-Saarnisto  
 Aika: 10.10.2016  
 Paikka: TUVI, Oulu ja Seinäjoki

#### 1. Testin tarkoitus, matriisi, validointitarpeen arviointi ja aikataulu

Testin tarkoituksena on tyypittää PCR-menetelmällä siasta eristettyjä *Actinobacillus pleuropneumoniae* -kantoja. Bakteeri aiheuttaa sioilla märkiviä keuhkojen ja keuhkokalvon tulehduksia. Tyypitystä tehdään tällä hetkellä projektiluontoisesti. Kantojen tyypittämisellä voidaan saada tietoa taudin epidemiologiasta.

Matriisina käytettiin bakteerin puhdasviljelmiä Cem-1-agarilla. Tutkimuksessa käytettiin yliyön kasvustosta tehtyä bakteerin vesisuspensiota.

Validointitarve arvioitiin luokaksi 2 (tunnettu, mutta ei kollaboratiivisesti testattu menetelmä).

Menetelmä on kuvattu seuraavassa julkaisussa:

Zhou L., Jones S. C. P., Angen Ø., Bossé J. T., Nash J. H. E., Frey J., Zhou R., Chen H. C., Kroll J. S., Rycroft A. N. and Langford P. R., (2008) Multiplex PCR That Can Distinguish between Immunologically Cross- Reactive Serovats 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains. J. Clin. Microbiol. 46(2): 800-803, DOI: 10.1128/JCM.01787-07

Aikataulu: Menetelmän testausta tehtiin alkuvuodesta 2016 ja raportti syksyllä 2016.

#### 2. Materiaalit

Testauksessa käytettiin seuraavia laitteita ja kemikaaleja:

- sentrifuugi
- vortex
- PCR-laite
- mikroaaltouuni
- elektroforeesilaitte
- geelin kuvantamislaitte ja -ohjelma
- Water Nuclease Free
- DyNAzyme II DNA Polymerase 2 U/μL + 10x puskuri
- 10 mM dNTP
- agaroosi
- TAE-puskuri
- SYBR Safe DNA Gel Stain
- kokostandardi, 100 bp DNA-ladder
- 10x Blue Juice, Gel Loading Buffer

Taulukko 1. Käytetyt alukkeet ja niiden spesifisyys

Aluke:	Spesifisyys:	Sekvenssi: 5'-3'-suunta	PCR-tuote: (emästä)
APXF APXR	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	TTATCCGAACTTTGGTTTAGC CATATTTGATAAAACCATCCGTC	417
AP3F AP3R	serovar 3	TTTGCGCTGTAGTGCTCCAAT AACAAATAAAGTTGCTCGAAAGTA	921
AP6A AP6B	serovar 6	AACCACTCACTTTCCACATTAG AATCGGAAGGTTTTGGTCTCGTG	718
AP8F AP8R	serovar 8	TTAGTTGCGCAAACGGCTTTTGAA GATTAACTGGTCCGTCGAAATG	1106

Lisäksi käytettiin tavallisia laboratoriokemikaaleja (kuten: etanoli ja ddH<sub>2</sub>O) ja -materiaaleja (esim. pipetinkärjet ja eppendorf-putket).

Taulukko 2. Validoinnissa käytetyt referenssikannat

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotyyppi 3
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotyyppi 6
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotyyppi 8
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotyyppi 12

Referenssikannat on lähettänyt Angen Øystein, Senior scientist, Division of Veterinary Diagnostics and Research, DTU Veterinary, Technical University of Denmark. Kantoja on säilytetty Eviran Kuopion toimipaikassa.

### 3. Arvioidut tekijät

- 3.1. Alukkeiden spesifisyyden tarkastus NCBI/blast-ohjelmalla.
- 3.2. Reaktioseoksen ja PCR-ohjelman toimivuus
- 3.3. Menetelmän toistettavuus
- 3.4. Menetelmän uusittavuus

### 4. Tulokset

Validoinnissa PCR:n positiivisina kontrolleina käytettiin *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyyppejä 3,6 ja 8. Negatiivisina kontrolleina käytettiin *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyyppiä 12, sekä vesinäytettä.

#### 4.1 Alukkeiden spesifisyyden tarkastus NCBI/blast-ohjelmalla.

Alukkeiden spesifisyydet tarkastettiin NCBI/blast-ohjelmalla vertaamalla alukkeiden sekvenssejä geenipankista löytyneisiin sekvensseihin.

Vertailutulokset löytyvät taulukosta ja liitteistä:

[App sekvenssivert.xlsx](#)

[BlastAppAPX.docx](#)

[BlastAppAP3.docx](#)

[BlastAppAPP6.docx](#)

[BlastAppAP8.docx](#)

Sekvenssivertailussa ilmeni, että kahdessa Japanissa havaitussa serotyyppi 6:n isolaatissa on spesifiset sitoutumispaikat myös AP3-alukkeille ja tästä monistuva tuote olisi: 921 bp. Vain AP3-alukkeita käytettäessä näyte voitaisiin todeta App3 serotyypiksi, mutta multiplex-tyyppisessä 3,6,8-tyyppauksessa näytteestä monistuu myös serotyypin 6 tuote (718 bp). Lisäksi näytteet testataan ensin 2,5,6-tyyppauksella, joten emme usko asian aiheuttavan sekaannusta tulosten tarkastelussa (Liite: BlastAppPP3).

## 4.2. Reaktioseoksen ja PCR-ohjelman toimivuus

Testauksessa käytettiin hyväksi aikaisemmin validoidusta APP 2,5,6-menetelmästä saatuja tietoja templaattisuspension vahvuudesta.

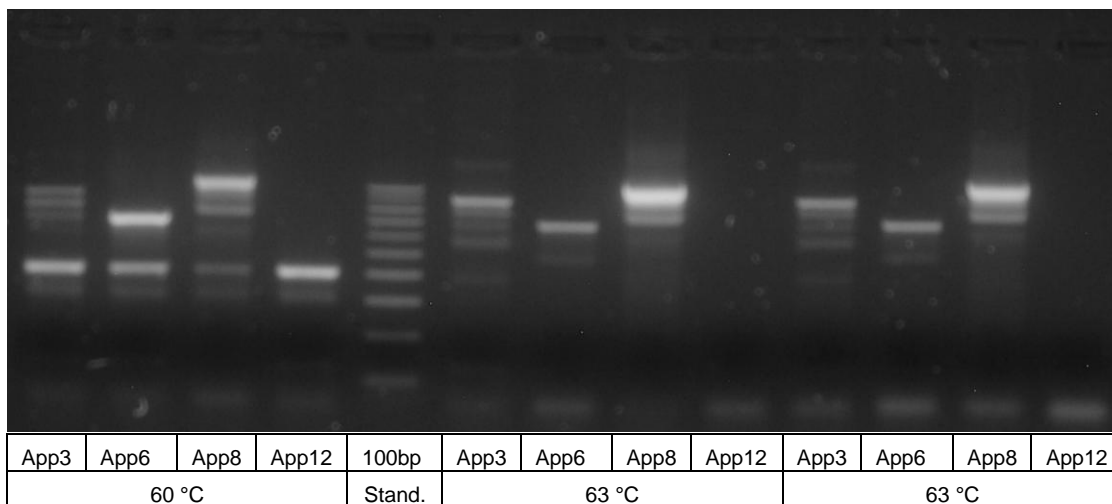
<\\evira.local\evira\TUTO\TUVI\TUVI\Yhteiset\PCR-suunnitelmat\Actinobacillus pleuropneumoniae\Validointiraportti PCR Actinobacillus.docx>

Tämän johdosta käytimme sakeaa, 4-5 McF-vahvuista, bakteerisuspensiota templaattina.

### 4.2.1. PCR-ohjelman optimointi

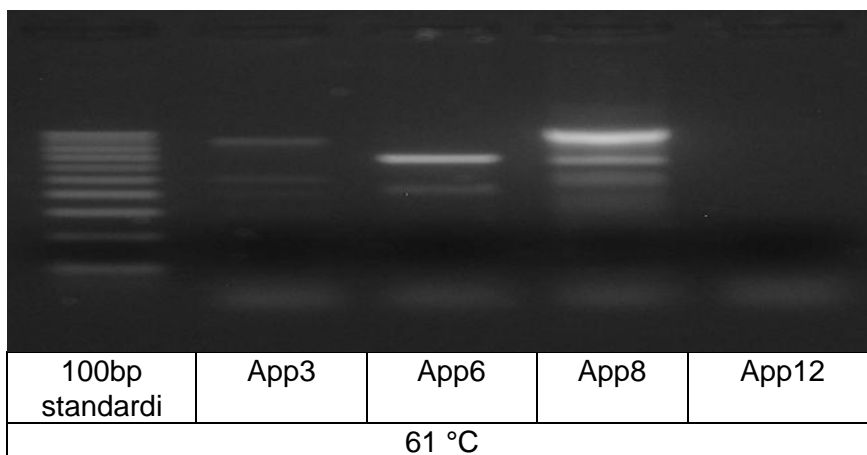
PCR-ohjelma muokattiin omalle laitteellemme sopivaksi, jotta kaikki kohde-DNA:t monistuivat ja epäspesifistä monistumista tapahtui mahdollisimman vähän. Kokeellisesti havaittiin, että APP 2,5,6-PCR-ohjelma toimi pääsääntöisesti hyvin. Epäspesifistä monistumista tapahtui App3-kannalla, jossa ilmeni ylimääräisiä 700 - 800 emäksen kokoisia tuotteita, sekä APP8-kannalla monistui ylimääräisiä 800 - 1000 emäksen kokoisia tuotteita.

Yritimme poistaa ylimääräistä monistumista nostamalla annealing-lämpötilaa, mutta se ei vähentänyt App3:n ylimääräisiä PCR-tuotteita ja lisäksi AppX:n tuote hävisi kokonaan (kuva 1).



Kuva 1. PCR-tuotteet serotyypeittäin annealing lämpötilan ollessa 60 °C ja 63 °C.

Jopa asteen nosto 60 °C:ta 61 °C:een annealing-lämpötilassa, sai aikaan AppX-tuotteen (417 ep) häviämisen (kuva 2).



Kuva 2. PCR-tuotteet serotyypeittäin annealing lämpötilan ollessa 61 °C.

Valitsimme alkuperäisen APP 2,5,6 -ohjelman (annealing 60 °C), koska tällä saatiin monistettua kaikki oikeat PCR-tuotteet, vaikka samalla monistuu App3- ja App8-kannoista heikkoja epäspesifisiä tuotteita.

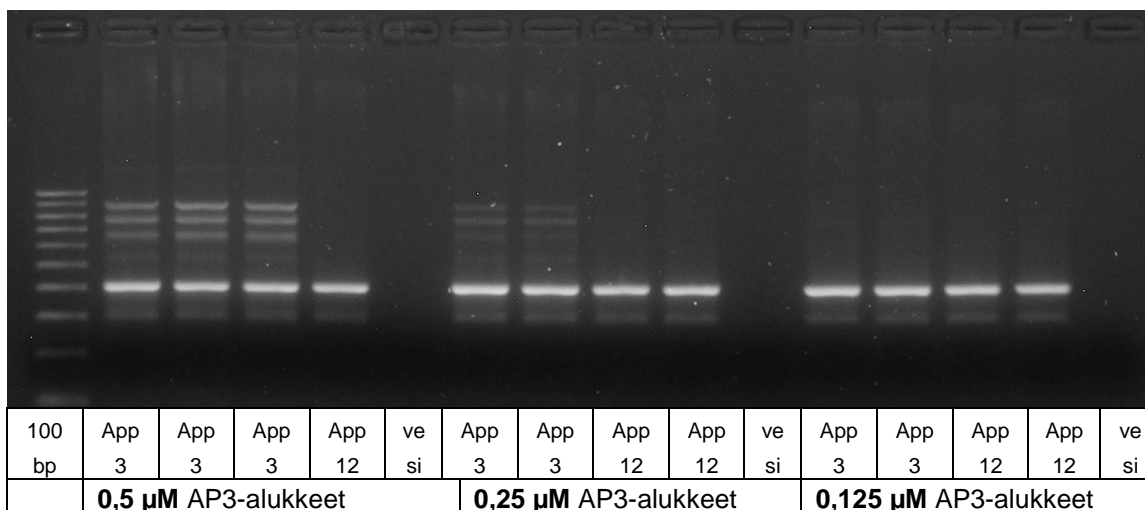
Ohjelman nimi: APP 2,5,6, ohjelman kesto n. 2h 35min

5 min 95°C	} x35
1 min 94°C	
1 min 60°C	
1 min 72°C	
5 min 72°C	
pito 10°C	

#### 4.2.2. PCR-reaktioseoksen optimointi

Päätimme testata monistumista erilaisilla reaktioseoksilla, vaihdellen aluke- ja templaattikonsentraatioita, tavoitteena vähentää epäspesifistä monistumista.

AP3-alukkeilla kokeiltiin kolmea eri konsentraatiota (kuva 3).



Kuva 3. AP3-alukkeiden testaus kolmella eri konsentraatioilla: 0,5 µM, 0,25 µM ja 0,125 µM

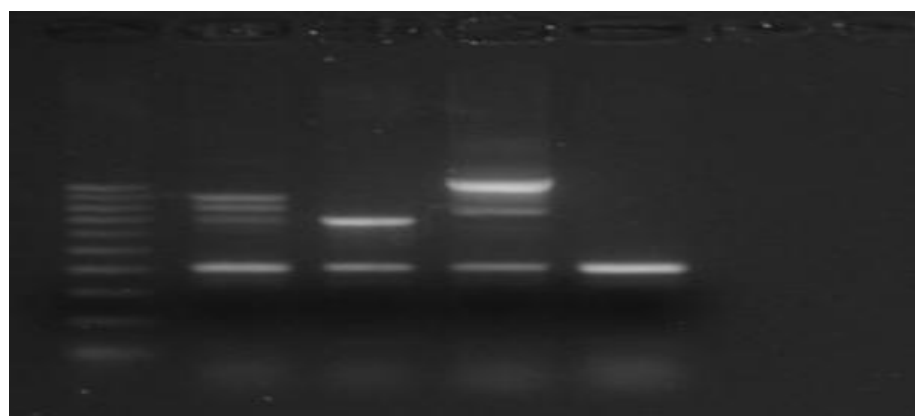
Geelikuvasta (kuva 3) havaittiin, että epäspesifisten PCR-tuotteiden vähentyessä myös oikeiden App3-tuotteiden määrä väheni yhtä varmasti. Totesimme, että alukekonsentraation muutoksilla emme saa epäspesifisiä tuotteita karsittua pois. Päätimme käyttää AP3-alukkeille 0,5 µM konsentraatiota.

Myös AP8-alukeparia kokeilimme 0,25 µM ja 0,5 µM loppukonsentraatioilla. Suurta eroa tuotteiden monistumisessa ei havaittu, mutta katsoimme 0,25 µM pitoisuuden soveltuvan paremmin.

Templaatin määrän vaikutusta monistustehokkuuteen testasimme kahdella eri tilavuudella. Kokeilimme 1 µl:n ja 2 µl:n määriä bakteerisuspensiota 25 µl:n reaktiutilavuudessa. Emme havainneet eroa monistumisessa näiden tilavuuksien välillä. Päätimme käyttää 2 µl:n bakteerisuspensiota templaattina.

PCR-reaktioseos App 3,6,8 -menetelmässä:

reagenssi	µl / reaktio	pitoisuus lopullisessa PCR-reaktiossa
H <sub>2</sub> O	13,75	
10 x Dynazyme II puskurii, sis. 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5	1x
dNTP	0,5	0,2 mM
aluke APXF (10 µM)	0,625	0,25 µM
aluke APXR (10 µM)	0,625	0,25 µM
aluke AP3F (10 µM)	1,25	0,5 µM
aluke AP3R (10 µM)	1,25	0,5 µM
aluke AP6F (10 µM)	0,3125	0,125 µM
aluke AP6R (10 µM)	0,3125	0,125 µM
aluke AP8F (10 µM)	0,625	0,25 µM
aluke AP8R (10 µM)	0,625	0,25 µM
Dynazyme II (2U/µl)	0,625	1,25 U
näyte (bakteerisuspensio)	2	
Lopputilavuus	25	



Standardi: 100 bp ladder	App 3	App 6	App 8	App 12 tai muu, kuin App-serotyyppi 3,6 tai 8
-----------------------------	-------	-------	-------	---

Kuva 4. App-kontrollikantojen monistamat PCR-tuotteet agarosigeelillä.



### 4.2.3. Menetelmän toistettavuus

Kaksi eri henkilöä on tehnyt testin lyhyen ajan sisällä Seinäjoen toimipaikassa:  
 22.4.2016 Jussi Jokisalo suoritti validoitavan PCR-testin, tuloskuva: 160422.tif  
 22.4.2016 Paula Puskala-Koivisto suoritti validoitavan PCR-testin, tuloskuva: 160422-2.tif  
 Henkilöiden suorittamissa testauksissa kaikista tutkituista referenssikannoista saatiin keskenään yhtenäiset oikeat tulokset.

### 4.2.4 Menetelmän uusittavuus

Jussi Jokisalo on suorittanut kontrollikantojen PCR-ajon tällä menetelmällä 12.4.2016 ja 25.4.2016. Uusinnassa tulokset olivat oikeat ja yhteneväiset aiempiin tuloksiin verrattuna.

### 4.3. Dokumentointi

Validoinnin sähköpostikeskustelu, ohjeistus ja pipetointikaaviot löytyvät kansioista:

[..\Actinobacillus pleuropneumoniae](#)

Pipetointitaulukot on lisäksi kerätty mappiin Seinäjoen laboratoriossa ja geelikuvat löytyvät kansiosista:

[\\evira.local\evira\TUTO\TUVI\Seinäjoen\\_Yhteiset\Kuvat\PCR\APP](#)

## 5. Yhteenveto

Menetelmä pystytettiin kahden toimipaikan yhteistyöllä. Petra Heikkinen Oulusta vastasi ohjeistuksesta ja ongelmatilanteiden selvittelystä, ja testauksen toteutuksesta vastasi Jussi Jokisalo Seinäjoella. Validointiraportti laadittiin yhdessä.

Menetelmä soveltuu *Actinobacillus pleuropneumoniae* –bakteerien tyypitykseen serotyypeistä 3,6 ja 8. Tutkimuksessa käytetään edullista perinteistä PCR:ta, eikä templaattina käytetylle bakteerille tarvitse tehdä aikaa vievää DNA:n eristystä kaupallisella kitillä. Tehokkainta PCR-tuotteiden monistuminen on, kun bakteerisuspensio on vähintään 4 McF. Lisäksi on tärkeää käyttää juuri valmistettuja PCR-reaktioita ja geelejä vakaan ja oikean tuloksen saamiseksi.

Geenipankissa tehdyn sekvenssivertailun perusteella menetelmässä käytettävät alukeparit monistavat spesifisesti *Actinobacillus pleuropneumoniae* -serotyyppejä, joille ne on suunniteltu. Käytännössä App3 alukepari tuotti myös n. 700 bp ja 800 bp kokoiset tuotteet, oikeiden (417 bp ja 921 bp) tuotteiden lisäksi. Menetelmän validoinnissa hyväksyttiin App3:n (700 ja 800 bp) ja App8:n (800 bp) monistamat ylimääräiset PCR-tuotteet. Emme nähneet tarvetta lisäoptimoinnille, koska epäspesifiset PCR-tuotteet eivät haittaa tulosten analysointia.

Testi on hyväksytty, jos PCR antaa kaikille *Actinobacillus pleuropneumoniae* -kannoille 417 emäksen kokoiset tuotteet, sekä lisäksi serotyypeille 3,6 ja 8 vastaavasti 921, 718 ja 1106 emäksen kokoiset tuotteet. Negatiivisen kontrollin (App12) tulee tuottaa vain 417 emäksen tuote ja vesinäytteessä monistumista ei saa tapahtua (kuva 4).

Testi on uusittava jos jokin positiivisista kontrolleista ei ole toiminut. Samoin tulee toimia, jos negatiivinen kontrolli on antanut positiivisen signaalin. Mikäli kontrollit antavat väärää tuloksia myös uusinnassa, tulee virhelähde selvittää ennen jatkamista.

Testi voi antaa väärän positiivisen tuloksen, jos ympäristö tai reagenssit ovat kontaminoituneet kohde-DNA:lla tai jos reaktiolämpötilat tai -ajat eivät ole ohjeen mukaiset.



Testi voi antaa väärän negatiivisen tuloksen, jos reagenssit ovat vanhentuneet tai inaktivoituneet, jos jonkin reagenssin pitoisuus reaktioseoksessa ei ole oikea tai reagenssi puuttuu kokonaan (pipetointi- tai laskentavirhe) tai jos reaktiolämpötilat tai -ajat eivät ole ohjeen mukaiset.

Menetelmän toimivuutta seurataan kirjaamalla tyypitettyjen kontrollinäytteiden toiminta jokaisella testauskerralla PCR-ajojen kontrollien seurantalomakkeelle (LAB 3097). Myös kaikki muutokset ohjeesta dokumentoidaan PCR-pipetointilomakkeeseen. Laitteiden ylläpidossa noudatetaan kalibrointi- ja laatuohjeistusta.

Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus on testattu Seinäjoen toimipaikassa Jussi Jokisalon ja Paula Puskala-Koiviston toimesta. Tulokset olivat yhteneväiset ja oikeat kaikkien testattujen näytteiden suhteen.

Menetelmän työohje:

LAB 2022: *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiplex-PCR, serotyypit 3, 6 ja 8

Validointimateriaali löytyy kansioista.

[..\Actinobacillus pleuropneumoniae](#)

## 6. Validointiraportin käsittely ja hyväksyntä

Missä/millä kokoonpanolla käsitelty?

Yksikönjohtajan / jaostopäällikön hyväksyntä

---

pp.kk.vvvv