



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

**PATOGEENISTEN VIBRIOBAKTEERIEN MÄÄRITTÄMINEN ELINTARVIKKEISTA RE-
AALIAIKAISELLA PCR-MENETELMÄLLÄ**

Työn tekijä: Harri Pantsar

**Työn ohjaajat: Jarmo Palm
Anu Kallinen**

Työ hyväksytty: 21.10. 2012

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Harri Pantsar	
Työn nimi: Patogeenisten vibriobakteerien määrittäminen elintarvikkeista reaaliaikaisella PCR-menetelmällä	
Päivämäärä: 16.10.2012	Sivumäärä: 30 + 1 Liite
Koulutusohjelma: Laboratorioala	Suuntautumisvaihtoehto:
Työn ohjaaja: Jarmo Palm Työn ohjaaja: Anu Kallinen	
<p>Tämä opinnäytetyö suoritettiin tullilaboratoriolle, ja sen tavoitteena oli kehittää reaaliaikainen PCR-menetelmä, jolla kyettäisiin tunnistamaan patogeenisiä vibriobakteereja elintarvikematriisista. Vibriot ovat gram-negatiivisia muodoltaan suoria tai jyrkästi kaartuvia sauvabakteereja. Ne ovat motiileja ja useimmat lajikkeet omaavat yksittäisen polaarisen flagellan liikkumista varten. Useimmat lajikkeet ovat oksidaasi- ja katalaasipositiivisia, sekä fermentoivat glukoosia tuottamatta kaasua. Tunnetuista lajeista <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ja <i>Vibrio vulnificus</i> ovat tunnettuja ihmispatogeenijä.</p> <p>Työn pohjana käytettiin FDA:n geelipohjaista PCR-menetelmäehdotusta. Kehitettävä menetelmä oli reaaliaikainen PCR-menetelmä, joten menetelmään jouduttiin tekemään muutoksia alukkeiden ja koettimien suhteen. Uuden menetelmän etu perinteiseen maljausmenetelmään verrattuna on sen nopeus ja korkeampi herkkyys. Menetelmän testaamisessa käytettiin kala-, kasvis- ja liha-matriiseja.</p> <p>Työtä varten eri <i>Vibrio</i>-bakteerikannoista valittiin patogeeniset <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ja <i>Vibrio vulnificus</i>, mutta menetelmä kattaa myös <i>Vibrio mimicuksen</i>, joka kyetään havainnoimaan <i>Vibrio choleraen</i> alukkeilla. Työ jakautui seuraaviin vaiheisiin: Rikastuksen optimointi, DNA-eristys, alukkeiden ja koettimien valinta, PCR-ajo ja PCR-ohjelman optimointi.</p> <p>Moninaisten ongelmien johdosta menetelmän testausta ei ehditty toistamaan riittävän useita kertoja validointia varten, mutta saatujen tulosten pohjalta menetelmän kehitystä voidaan jatkaa</p>	
Avainsanat: Patogeeniset vibriobakteerit, Reaaliaikainen PCR	

ABSTRACT

Name: Harri Pantsar	
Title: Real-time PCR-method for detection of pathogenic Vibrio-bacteria in foodstuffs	
Date: 16.10.2012	Number of pages: 30 + 1 attachment
Degree programme: Laboratory Sciences	Specialisation option:
Instructor: Jarmo Palm	
Supervisor: Anu Kallinen	
<p>This thesis project was made for Finnish customs laboratory, to develop a Real time PCR-method for detection of pathogenic Vibrio-bacteria in foodstuffs. Vibrios are gram-negative straight or rigidly curved rod-bacteria. They are motile, most having a single polar flagellum. Most produce oxidase and catalase and ferment glucose without producing gas. Of the known species, <i>Vibrio.cholerae</i>,<i>Vibrio.parahemolyticus</i> and <i>Vibrio.vulnificus</i> are well-reported human pathogens</p> <p>FDA: s Gel-based PCR-method was used as a foundation for the project. The developed method was a real-time PCR method and changes were required to primers and probes in relation to the gel-based method. The advantage of the new method in comparison to the basic vase methods is its increased speed and accuracy. Matrices used in testing the method were fish, plant and meat.</p> <p>For the purpose of this project, the pathogenic strains <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Vibrio parahemolyticus</i> and <i>Vibrio vulnificus</i> were chosen, but the method also covers <i>Vibrio mimicus</i> due to its similarity with <i>Vibrio cholerae</i>. The project was divided in the following sections: Enrichment, DNA isolation, primer and probe selection, PCR run and program optimization.</p>	
Keywords: Pathogenic vibrios, Real-time PCR	

SISÄLLYS

ALKULAUSE TIIVISTELMÄ ABSTRACT

1	JOHDANTO	1
2	VIBRIOBAKTEERIT	1
2.1	<i>Vibrio vulnificus</i>	2
2.1.1	<i>Patogeenisyys</i>	2
2.1.2	<i>Levinneisyys</i>	3
2.2	<i>Vibrio cholerae</i>	4
2.2.1	<i>Patogeenisyys</i>	4
2.2.2	<i>Levinneisyys</i>	5
2.3	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	6
2.3.1	<i>Patogeenisyys</i>	6
2.3.2	<i>Levinneisyys</i>	7
3	VALIDOINTI	7
3.1.1	<i>Selektiivisyys</i>	8
3.1.2	<i>Suhteellinen oikeellisuus</i>	8
3.1.3	<i>Spesifisyys ja täsmällisyys</i>	8
3.1.4	<i>Herkkyys ja toteamisraja</i>	8
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	9
4.1	Reaaliaikainen PCR-menetelmä	9
4.2	Alukkeet ja koettimet	9
4.3	Ajo-ohjelman optimointi	11
4.4	Percoll™-liuos DNA-eristykseen	12
5	TYÖN TOTEUTUS	14
5.1	Kantojen elvytys	15
5.1.1	<i>Vibrio cholerae</i>	15
5.1.2	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	15
5.1.3	<i>Vibrio vulnificus</i>	16
5.1.4	<i>Kasvatus</i>	16
5.2	Ympyrien valmistus	17
5.2.1	<i>Matriisit</i>	17
5.2.2	<i>Ympyrien vahvuuden määrittäminen</i>	18
5.3	DNA-eristys	18
5.4	PCR	19
5.4.1	<i>Alukkeet ja koettimet</i>	20
5.4.2	<i>Reaktio-olosuhteet</i>	22
5.4.3	<i>Ajo-ohjelma</i>	23

6	TULOKSIEN TARKASTELU	23
6.1	Ajotulokset.....	23
6.2	Negatiiviset kontrollit	27
7	YHTEENVETO JA POHDINTA	27
	VIITELUETTELO	30
	LIITTEET	

1.Reseptit

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää menetelmä patogeenisten vibriobakteerien havaitsemiseen erilaisista elintarvikematriiseista. Tavoitteena oli kehittää PCR-menetelmä laboratorion rutiinianalyysiin. Työn pohjana käytettiin FDA:n geelipohjaisen PCR:n menetelmäohjetta. Ohjeesta poikettiin tarpeen mukaan mm. alukkeita ja koettimia suunniteltaessa. Perinteiseen maljausmenetelmään verrattuna reaaliaikainen PCR-menetelmä omaa selkeän edun sekä nopeudessa että herkkyydessä. PCR-monistusta optimoitaessa tarkoituksena oli löytää asetukset, joita voitaisiin käyttää kaikkien analysoitavien kantojen yhtäaikaiseen analyysiin.

Lopullinen käyttötarkoitus menetelmälle olisi kala- ja äyriäisnäytteiden analysointi, mutta testaus suoritettiin kalamatriisiin lisäksi kasvis- ja lihamatriiseilla. Erilaisia matriiseja testaamalla haluttiin varmentaa menetelmän toimivuus erilaisten taustamateriaalien aiheuttamien häiriötekijöiden läsnä ollessa.

2 VIBRIOBAKTEERIT

Vibrio-suvun bakteerit määritellään gram-negatiivisiksi, sauvabakteereiksi, jotka ovat muodoltaan joko suoria tai jyrkästi kaartuvia. Ne ovat motiileja ja useimmat lajikkeet omaavat yksittäisen polaarisen flagellan, jonka avulla ne kykenevät liikkumaan nesteessä. Useimmat suvut ovat oksidaasipositiivisia, katalysoivat ja fermentoivat glukoosia tuottamatta kaasua [1.]. Yleisimmät patogeeneiksi tunnistetut suvut ovat *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus* sekä *Vibrio mimicus*.

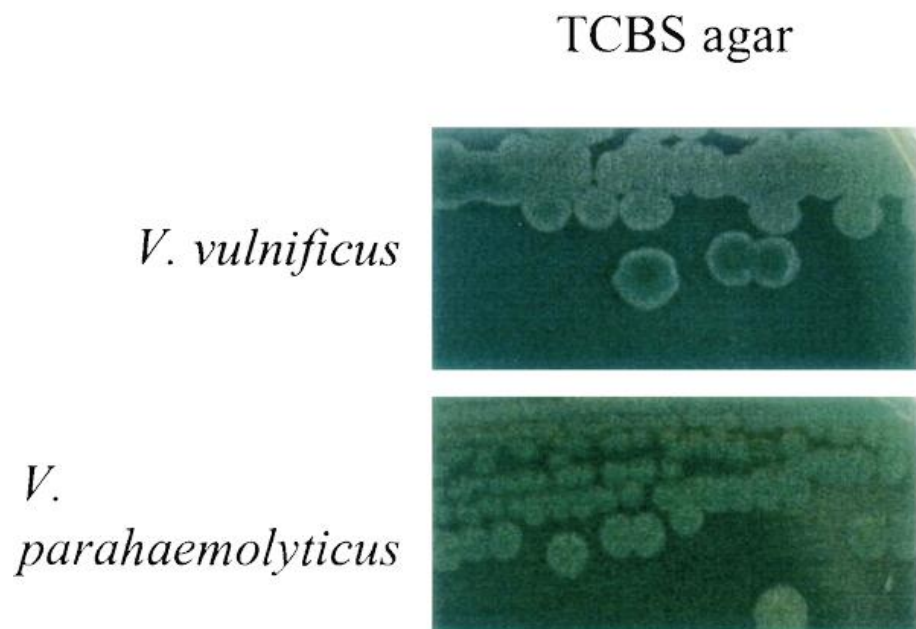
Suurin osa raa'an tai huonosti keitetyn simpukan aiheuttamista ruokamyrkytyksistä johtuu vibriobakteereista. Useimmat vibriot ovatkin meriympäristön johdosta halofiilisiä.

Vibriot ovat herkkiä kuumuudelle ja melko herkkiä happamuudelle. Vibrioita pidetään myös herkkinä kylmälle, mutta osa kannoista säilyy hyvin kylmäsäilytyksessäkin.

2.1 *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 1976. *V. vulnificus* aiheuttaa kaikista vibriobakteereista vakavimmat sairastumiset, ja Yhdysvalloissa 95 % kaikista merenelävistä johtuvista ruokamyrkytyskuolemista on sen aiheuttamia. Tartuntatapauksissa kuolleisuus on ollut n. 60 %, joka on korkein kaikkien ruokamyrkytystä aiheuttavien bakteereiden kohdalla. [10.]

V. vulnificus muistuttaa TCBS (Thiosulphate-citrate-bile salt) -agarilla *Vibrio parahaemolyticus* (kuva 1), mutta voidaan erottaa biokemiallisten reaktioidensa perusteella mm. β -galaktosidaasiaktiivisuudesta. Kliinisten tutkimusten mukaan *V. vulnificus*-tartunnan aiheuttaa joko kontaminoituneen ruoan syöminen tai meriympäristöstä avohaavan kautta elimistöön päässeet bakteerit.



Kuva 1: *Vibrio parahaemolyticus* ja *Vibrio vulnificus* TCBS-agarilla [muk.7]

2.1.1 Patogeenisyys

V. vulnificus patogeenisyyttä ei vielä toistaiseksi ymmärretä täysin, mutta monia hydrolyyttisiä entsyymejä on tunnistettu patogeenisyyteen mahdollisesti liittyviksi. Morenon ja Landgrafin tutkimuksessa todettiin, että kaikki 45 tutkitusta näytteestä eristetyt kannat tuottivat lesitiinaasia ja lipaasia, 99,2 %

tuotti kaseinolyttistä proteaasia, 96,9 % tuotti DNAasia ja 96 % eristetyistä kannoista olivat hemolyttisiä lampaanveriagarilla testattaessa. [1.]

V. vulnificuksella on kolme merkittävää virulenssiin vaikuttavaa tekijää. Ensimmäinen on polysakkaridikapseli, jota ilman infektio ei kykenisi alkamaan. Kapselilliset solut kykenevät vastustamaan fagosytoosia ja käyttämään transferriniiniin sidottua rautaa. Rauta onkin todettu merkittäväksi tekijäksi *vulnificuksen* virulenssissa. Hiirikokeissa LD50-arvo laski 10^6 solusta yhteen soluun, kun hiiriin injektointiin 16 µg rautaa. Seerumin rautapitoisuuden tulee olla kohonnut, jotta infektio voi alkaa.[2.]

Vibrio vulnificus tuottaa endotoksiini lipopolysakkaridia (LPS). Koe-eläimille suonensisäisesti annettuna sen on todettu laskevan verenpainetta nopeasti, johtaen sydämen vajaatoimintaan ja kuolemaan n. 30 - 60 minuutissa. LPS indusoi typpioksidisyntaasia, joka aiheuttaa kudonvaurioita isännälle. Entsyymien toiminnan estämisen on todettu auttavan sokkiin, ja vähentävän näin kuolleisuutta. [2.]

2.1.2 Levinneisyys

V. vulnificuksen yleisin esiintymisalue on merenrannikkoalueet. Yleisin kontaminaation kantaja on simpukka. *V. vulnificus* on absoluuttinen halofiili ja kasvualustaksi suositeltu minimi NaCl-pitoisuus on 0,5 %. Optimaalinen NaCl-pitoisuus 1 - 3 % ja kasvualustan pH 5 - 10. Optimikasvulämpötilana 37°C, mistä syystä *V. vulnificusta* ei esiinny kylmissä vesissä.

2.2 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae on koleraa aiheuttava *Vibrio*-laji. Sen karakterisointiin voidaan käyttää lukuisia biokemiallisia ominaisuuksia ja antigeenityyppejä. Se voidaan erottaa muista vibrioista, koska sen natrium-ionin vaativuus täyttyy tavallisistakin kasvatusaineista löytyvillä NaCl-määrillä. Tähän erottelumetodiin poikkeuksena on *Vibrio mimicus*, joka on muiltakin biokemiallisilta ominaisuuksiltaan identtinen *V. cholerae* kanssa, mutta erotettavissa sakkarosin fermentointiominaisuudeltaan. [5.]

V. cholerae tunnetaan lähes 200 O-seroryhmää joista O1, sekä O139 ovat tunnistettuja epidemian aiheuttajia. Muita patogeenisiä seroryhmiä on myös tavattu. Niiden aiheuttama tauti on koleran kaltainen, mutta lievempi vaikutuksiltaan.

O1-seroryhmä jaetaan fenotyypisten ominaisuuksiensa perusteella ns. klassiseen ja El toro-biotyyppihin, joista klassista tavataan enää harvoin. Sekä klassinen että El toro-biotyytit voidaan vielä lisäksi jakaa kolmeen serotyyppiin: Ogawa, Inaba ja Hikojima, joista Hikojima on harvinainen ja epästabiili. [2.]

Seroryhmää O139 pidetään Intiassa syntyneenä O1-ryhmän El toro variantin muunnoksena. Tähän viittaisi se, että O139:n genomi muistuttaa rakenteeltaan huomattavasti O1-ryhmän El toro varianttia, mutta on selkeästi erilainen ns. non-O1-ryhmiin verrattaessa. [5.]

2.2.1 Patogeenisyys

V. cholerae seroryhmät O1, sekä O139 erittävät voimakasta, koleratoksiiniksi (CT) nimettyä enterotoksiinia, joka toimii taudinaiheuttajana. Koleratoksiini on rakenteensa puolesta samankaltainen *Escherichia coli* LT-enterotoksiinin kanssa. [2.]

Kolera enterotoksiini (CT) on *V. cholerae* pääasiallinen patogeenisyyden aiheuttaja. CT:n tuotantoa säätelevien geenien on todettu löytyvän VPI:ksi (*Vibrio pathogenicity island*) nimetystä genomien alueesta. Useimmat epide-

mia-alueilta eristetyt *V. cholerae*-kannat sisältävät yhteisen somaattisen antigeenin sekä seroryhmän O1. Inaban tai Ogawan O1 antiseerumeilla agglutinoitavat kannat ovat tunnistettuja ihmispatogeenejä.

Seroryhmien O1 ja O139 aiheuttamat taudin oireet ovat samanlaiset, ja infektoivat annokset yleensä suuria n. miljoona solua. Itämisaika vaihtelee välillä 6 h – 6 vrk. Oireet alkavat useimmiten äkillisellä ja kivuttomalla ripulilla. Uloste muuttuu nopeasti vesimäiseksi ja bakteerit, tulehdussolut ja lima antavat sille ominaisen vaalean samennuksen. Yleisesti käytetty termi ilmiölle on ”riisinkeitto vesi” (”Rice water”). Akuutissa kolerassa potilas voi menettää jopa litran nestettä ja elektrolyyttejä tunnissa. Taudin muut oireet ovatkin seurausta nopeasta nestehukasta. Sairaus voi pahimmillaan johtaa hypovolemiaan, sokkiin ja asidoosiin jo parissa tunnissa. [10.]

V. cholerae ei muodosta pitkäaikaisia kantajia, vaan bakteerien erittämistä tapahtuu taudin aikana ja jopa kaksi viikkoa sen jälkeen, ja oireettomissa tapauksissa alle viikon. Akuuteissa tapauksissa potilaat erittävät jopa 10^8 – 10^9 bakteeria ulostegrammaa kohden.

Nykyään suurin osa tapauksista on lieviä ja itsestään rauhoittuvia. Hoitamattomana klassisen koleran kuolleisuus on ollut n. 50 %. Kolera on luokiteltu kansainväliseksi karanteenitautiksi, ja se on Suomen tartuntatautiasetuksessa luokiteltu yleisvaaralliseksi tartuntataudiksi. [14.]

Tärkein hoitomuoto koleraan on nesteytys. Nykyään nesteytykseen käytetään WHO:n suosituksesta ORS:a (oraalinen rehydraatioliuos). Tetrasykliinin on osoitettu edistävän paranemista ja lyhentävän bakteerien eritystä sairauden aikana ja jälkeen. Resistenttien kantojen kohdalla käytetään pääasiallisesti fluorokinoleita. [3.]

2.2.2 Levinneisyys

V. cholerae O1-tyyppiä löytyy suurissa määrissä kolerapotilaiden ja toipilaiden ulosteesta. Pääasiallinen leviämistapa on feko-oraalista reittiä ja epäsuoraan kontaminoituneen juomaveden kautta. Ruokatuotteet voivat kontaminoitua, mikäli kasvatuksessa on käytetty ihmisulostetta lannoitteena, tai kasvien tapauksessa pesuun on käytetty kontaminoitunutta vettä. Suora ihmisestä-ihmiseen levinneisyys on harvinaista. Koleraepidemioiden lähteeksi on arveltu raakoja, huonostikeitettyjä, kontaminoituneita tai uudelleen-

kontaminoituneita mereneläviä. [5.] *V. choleraella* ei ole invaasiotaipumuksia, vaan oireet johtuvat koleratoksiinista.

2.3 *Vibrio parahemolyticus*

Ensimmäinen *Vibrio parahemolyticuksen* aiheuttama laajempi tautiepidemia todettiin vuonna 1950. *V. parahemolyticus* voidaan serotyypittää K- ja O-antigeenien avulla, ja ainakin 12 O-antigeeniä ja 59 kapselin polysakkariidiantigeeniä on kuvannettu. Serotyypin ei ole kuitenkaan todettu korreloivan virulenssin kanssa, mutta hiljattain kuvatun O3K6-serotyypin on kuitenkin todettu liittyvän useaan epidemiaan eri maissa. [5.]

V. parahemolyticus on veriripulia ja toisinaan verenmyrkytyksenkin aiheuttava *vibrio*-laji. Se on halofiilinen, joensuistoista ja merenrannoilta löytyvä lämpimien vesien ihmispatogeeni. *V. parahemolyticus*-bakteereja esiintyy kausittain simpukoissa, ja ihmistartunnat keskittyvätkin enimmäkseen vuoden lämpimimpiin kuukausiin. Trooppisilla alueilla tartuntariski on ympärivuotinen.

2.3.1 Patogeenisyys

Useimmat kliinisesti eristetyt kannat ovat tunnistettavissa ja erotettavissa luonnossa esiintyvistä kannoista niiden *tdh-geenin* tuottaman TDH-toksiinin (thermostable direct hemolysin) perusteella. Suolistosairauksia aiheuttavien kantojen omaama TRH:a (Thermostable related hemolysin) tuottava *trh-geeni* on 60 %:sesti homologinen *tdh:n* kanssa. Kaikki tunnetuista *V. parahemolyticu*-kannoista sisältävät *tlh-geenin* ja tuottavat TLH:ta (thermolabile hemolysin), jota muut *Vibrio*-lajit eivät tuota. [5.]

V. parahemolyticuksen aiheuttamaa sairautta kutsutaan vibriosisiksi. Parahemolyticuksen aiheuttama sairaus on gastroenteriteetti, jonka pääoireet ovat vatsakrampit ja ripuli. Sivuoireina voi ilmetä myös oksentelua, pahoinvointia ja kuumetta. Sairaalahoido voi olla tarpeellista osassa tapauksia. Vibriosisin itämisaika vaihtelee välillä 4 - 96h ja paraneminen kestää yleensä 1 - 8 päivää. Infektioannos on n. 10^5 – 10^7 solua [3.]

V. parahemolyticus ei muodosta pitkäaikaisia kantajia, mutta bakteereja voi esiintyä ulosteessa vielä kaksi viikkoa taudin laantumisen jälkeen.

2.3.2 Levinneisyys

V. parahemolyticusta löydetään useimmiten lämpimistä olosuhteista ranta-alueilta ja merenelävistä. Se on yleisin ruokamyrkytyksen aiheuttaja Japannissa, jossa raa'an kalan syönti on yleistä. Muiksi tartunnan aiheuttajiksi on arvioitu rapuja, katkoja ja hummereita. Myrkytys voi tapahtua ruokatarvikkeiden keittämisestä huolimatta, mikäli keittäminen ei ole ollut riittävä tai hygieniasta ei ole huolehdittu. Ristiinkontaminaatio ja uudelleenkontaminaatio pesemättömien tai keittämättömien tuotteiden vuoksi voi myös aiheuttaa myrkytyksen keittämisestä huolimatta. [5.]

V. parahemolyticus on halofiilinen, joten se vaatii suolaa kasvaakseen. Optimaalinen NaCl-pitoisuus kasvatuksessa on n. 2 - 4 %, ja lämpötila 5 – 44 °C. Kasvatukseen soveltuva pH-alue on 4,8 – 11, mutta bakteerit kasvavat parhaiten neutraalissa tai lievästi emäksessä pH:ssa. *V. parahemolyticuksen* generaatioaika on hyvin lyhyt: optimi olosuhteissa vain 8 - 9 minuuttia ja merenelävistä löydettävissä kannoissakin 12 – 18 minuuttia. [6.]

3 VALIDOINTI

Validointi on vertaileva tutkimus, joka suoritetaan uutta menetelmää käyttöönotettaessa. Sen tarkoituksena on selvittää uuden menetelmän antamien tuloksien oikeellisuus ja toimivuus. Uutta menetelmää valittaessa validoinnilla selvitetään, ovatko sen antamat tulokset yhtäpitäviä tai tarkempia kuin käytössä olevan menetelmän tulokset.

Mikäli validoitava menetelmä on täysin uusi, tai se perustuu huonosti tunnettuun menetelmään, on tarpeellista suorittaa täydellinen validointi, verifiointin lisäksi. Verifiointilla tarkoitetaan laboratorion kykenevän osoittamaan, että se pystyy tuottamaan yhdenmukaisia tuloksia kollaboratiiviseen tutkimukseen verrattaessa. Täydellinen validointi kvalitatiivisessa tutkimuksessa jakautuu seuraaviin osioihin: selektiivisyys, suhteellinen oikeellisuus, täsmällisyys, spesifisyys, herkkyys ja toteamisraja. [13.]

3.1.1 *Selektiivisyys*

Selektiivisyys tarkoittaa menetelmän erottelukykä: kuinka tarkasti menetelmä kykenee määrittämään analysoitavan bakteerin näytteen muista, häiriötä aiheuttavista komponenteista.

3.1.2 *Suhteellinen oikeellisuus*

Suhteellisella oikeellisuudella tarkoitetaan menetelmän antamien tuloksien tarkkuutta, kun tutkittavan näytteen pitoisuus on tunnettu. Lisätään tunnettu määrä analysoitavaa lajia näytteeseen, ja verrataan menetelmän antamia tuloksia tunnettuun määrään.

3.1.3 *Spesifisyys ja täsmällisyys*

Spesifisyys tarkoittaa menetelmän tarkkuutta tutkittavan lajin suhteen. Täsmällisyys liittyy menetelmän toistettavuuteen ja uusittavuuteen. Toistettavuudella tarkoitetaan sitä, kuinka lähekkäisiä tuloksia menetelmä antaa perättäisillä toistoilla, kun tutkitaan identtisiä näytteitä. Uusittavuus taas tarkoittaa yksittäisten analyysitulosten läheisyyttä eri henkilöiden suorittamaa tutkimus identtisistä näytteistä, käyttäen samaa menetelmää.

3.1.4 *Herkkyys ja toteamisraja*

Herkkyydellä tarkoitetaan kvalitatiivisessa mikrobiologisessa menetelmässä sitä, että kuinka hyvin menetelmä havaitsee kohdemikrobin näytteestä. Herkkyys määritetään menetelmän antamien oikeiden positiivisten määrästä ja ilmoitetaan yleensä prosenttiosuutena.

Toteamisrajalla tarkoitetaan pienintä menetelmällä luotettavasti todettavissa olevaa mikrobimäärää. Toteamisraja tulee määrittää erikseen jokaiselle matriisille, koska matriisi voi vaikuttaa menetelmän kykyyn havaita kohdemikrobia. [13.]; [17.]

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Reaaliaikainen PCR-menetelmä

Perinteiseen geelipohjaiseen PCR-menetelmään verrattaessa reaaliaikaisen PCR-tekniikan isoimpia eroja on se, että reaktiota voidaan seurata reaaliajassa. Perinteisessä menetelmässä näytettä monistetaan ensiksi, minkä jälkeen se siirretään esim. agarosigeelielektroforeesiin jatko-analyysiä varten. reaaliaikaista PCR:ää käytettäessä ristikontaminaation riski pienenee ja prosessi nopeutuu, koska lopputuotetta ei erikseen tarvitse analysoida [3].

Reaktion reaaliaikainen seuranta on mahdollista fluoresoivaan väriaineeseen perustuvan tekniikan ansiosta. Signaali voimistuu väriaineen sitoutumisen kaksijuosteiseen PCR-tuotteeseen. Signaali ilmoitetaan laitekohtaisella RFU-arvolla (relative fluorescence unit), mistä johtuen eri laitteilla saadut absoluuttiset fluoresenssiarvot voivat olla hyvinkin erilaisia samalle näytteelle. Menetelmän herkkyyttä voidaan arvioida lähdemateriaalista tehdyillä laimennoksilla. Nykyisillä laitteilla on mahdollista seurata kuutta väriä yhtäaikaaisesti.

4.2 Alukkeet ja koettimet

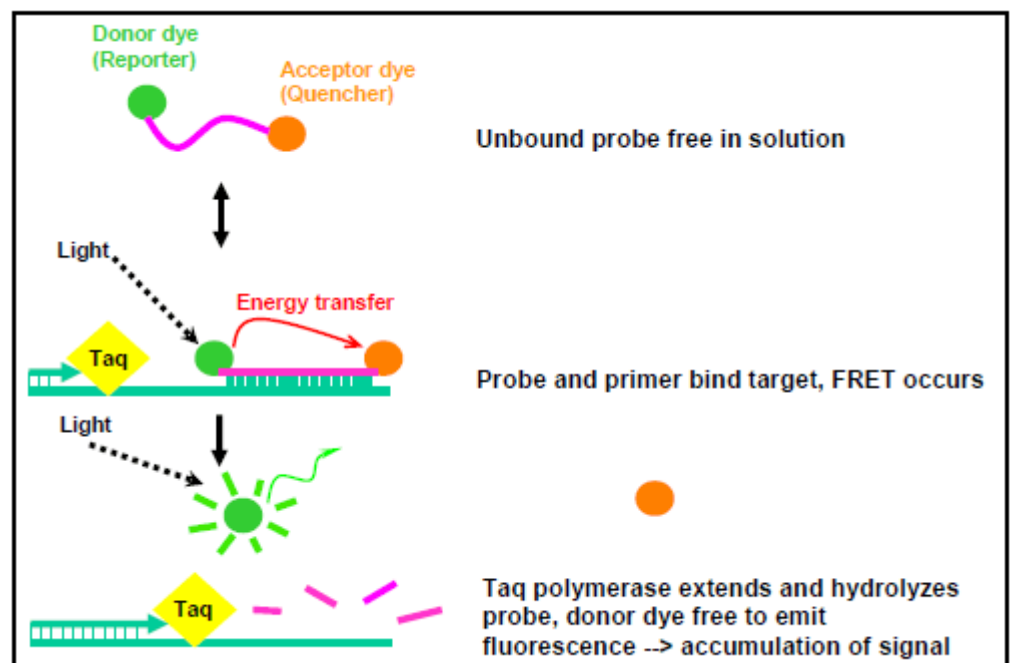
Alukkeiden kiinnittymistä kuvaa T_m lämpötila, eli lämpötila jossa puolet alukkeista on kiinnittyneinä templaattiin ja puolet on vapaina liuoksessa. Sitoutumislämpötilan arviointiin voidaan käyttää ns. Wallacen yhtälöä. Yhtälön mukaan $T_m[^\circ\text{C}] = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$. Wallacen yhtälö soveltuu käytettäväksi lyhyiden alukkeiden kanssa.

Alukeparien T_m -arvojen tulisi olla noin 2°C :n päässä toisistaan, mikä tulisi ottaa huomioon jo suunnitteluvaiheessa. Tämä takaa alukeparien samankaltaisen sitoutumisen. Sitoutumislämpötilaa (T_a) optimoitaessa hyvänä lähtökohtana suositellaan $T_m - 5^\circ\text{C}$. Mikäli alukeparien T_m poikkeaa toisistaan, niin lämpötila tulisi suunnitella alemman T_m :n mukaan, eli vähennetään 5°C alhaisemmasta lämpötilasta. Sopiva sitoutumislämpötila löytyy yleensä väliltä $55 - 72^\circ\text{C}$, mutta poikkeuksiakin on.

Tyypillinen alukepitoisuus ajo-ohjelmassa on 0,2 mM. Tällaisilla pitoisuuksilla alukkeiden kiinnittyminen kestää muutamia sekunteja, mutta sitoutumisvaihe ohjelmoidaan yleensä kestämään 0,5 - 2 minuuttia. Sitoutumisvaiheen aikana DNA-polymeraasi aloittaa nukleotidien kiinnittämisen alukkeiden 3' päihin. Seuraavaksi vuorossa olevan polymerointivaiheen kannalta tämä on tärkeää, koska lämpötilan muuttuessa pidentyneet alukkeet pysyvät tiukemmin sidoksissa paikoillaan. Tiukemman sidoksen vuoksi syntyy myös vähemmän epäspesifisiä tuotteita.

Alukesuunnitteluohjelmat kykenevät laskemaan sitoutumis- ja sulamislämpötilojen lisäksi monia muitakin tärkeitä ominaisuuksia, kuten sen onko alukkeilla taipumusta sitoutua itsensä kanssa muodostaen hiusneula (hairpin)-muodostelmia. [4.]; [15.]

Dual-labeled-koettimet perustuvat Reporter-Vaimennin fluoresoiviin väriin. Koettimen 5'-päässä sijaitsee reportteriväri ja 3'-päässä vaimennin, joka estää reportteria vapauttamasta fluoresenssia. Polymeraasin kiinnittäessä nukleotideja juosteeseen se vapauttaa reportterin ja näytteen fluoresenssi kasvaa. Menetelmän etuna on herkkyys ja fluoresenssin suoraan verrattavuus kohde DNA:n määrään. [16.]; (kuva 2.)



Kuva 2. Dual-label havainnointimenetelmä [8.]

4.3 Ajo-ohjelman optimointi

PCR-reaktion suunnittelussa on otettava huomioon useita parametreja, jotka voivat muuttaa lopputulosta ja vaikuttaa menetelmän toimivuuteen. Tärkeimmät ovat entsyymien ja alukkeiden määrä, magnesiumipitoisuus, deoksinukleotidien määrä, alukkeiden kiinnityslämpötila, denaturointiaika, syklien määrä ja ekstensioaika.

Entsyymien määrä riippuu hyvin paljon käytettävästä entsyymityypistä, koska eri entsyymeillä on omat prosessointinopeutensa. Mikäli lisätään liian paljon entsyymiä, niin epäspesifisten tuotteiden määrä kasvaa. Mikäli entsyymiä taas lisätään liian vähän, niin tuotetta ei synny tarpeeksi.

Liiallista alukkeiden määrää tulisi välttää, koska se aiheuttaa mm. epäspesifisiä tuotteita alukkeiden kiinnittyessä väärin kohtiin templaatti-DNA:ssa. Sen lisäksi myös templaattista riippumattomien alukedimeerien todennäköisyys kasvaa. Alukedimeerit ja epäspesifiset tuotteet kilpailevat varsinaisen tuotteen kanssa saatavilla olevista deoksinukleotideista, entsyymistä ja alukkeista, mikä heikentää menetelmän tarkkuutta ja toimivuutta. Yleensä optimaalinen alukepitoisuus löytyy väliltä 0,1 – 0,5 μM .

Magnesiumipitoisuus vaikuttaa monessakin kohtaa reaktiota, mm. DNA-polymeraasi vaatii vapaita magnesiumioneja kiinnittyessään templaattiin, alukkeisiin ja nukleotideihin. Magnesiumin määrä vaikuttaa myös alukkeiden kiinnittymiseen, DNA-juosteiden denaturointilämpötilaan, tuotteen spesifisyyteen, sekä entsyymien aktiivisuuteen ja tarkkuuteen. Magnesiumipitoisuuden tulisi olla 0,5 – 2,5 nM yli kokonaisdeoksinukleotidimäärään.

Jokaista dNTP (deoksinukleotidi)-tyyppiä tulisi olla sama määrä reaktiossa. Suositeltavaa olisi määrittää pienin mahdollinen dNTP-määrä reaktiota varten. Kun dNTP:tä on vähän, niin epäspesifisten tuotteiden määrä ja todennäköisyys vähenee, koska pienemmällä pitoisuudella todennäköisyys väärän nukleotidin kiinnittymiseen syntyvään DNA-nauhaan pienenee. Pienikin määrä kuten 20 μM dNTP:tä 100 μl :n reaktiossa riittää teoriassa synteesiin, jolla tuotetaan 2,6 μg DNA:ta tai 100 pmol 400bp:n DNA-jaksoa. Optimaalinen dNTP-määrä löytyykin yleensä väliltä 20 - 200 μM .

Denaturaatiolämpötila on yksi suurimmista vaikuttavista tekijöistä PCR-reaktion kannalta, koska epätäydellisesti denaturoituneet DNA-juosteet ovat

yleisin reaktion epäonnistumisen syy. Yleensä suositellaankin, että alku-denaturaatio ajettaisiin pidennettynä. Normaali denaturaatioaika on yleensä 30 s 95 °C:ssa. Aikaa voidaan pidentää, mutta silloin myös entsyymin aktiivisuus vähenee nopeammin. Mikäli käytössä on yleisesti käytettyä Taq-polymeraasientsyymiä termostabiilimpi polymeraasi, niin denaturaatioaikaa voidaan nostaa jopa minuuttiin. Toinen huomioitava tekijä on templaatti-DNA:n GC-pitoisuus. Mikäli se on korkea, niin lämpötilan nostamista 97 °C:seen voidaan harkita.

Reaktiossa toteutettavien syklien määrään vaikuttaa lähinnä templaatti-DNA:n määrä, mikäli reaktio-olosuhteet muilta osiltaan ovat optimaaliset. Liian monen syklin toteuttaminen on yleinen virhe, jonka seurauksena epäspesifisten tuotteiden todennäköisyys kasvaa. Jos syklejä taas on liian vähän, niin haluttua tuotetta ei saada tarpeeksi.

Ekstensioajan valinnassa merkittäviä tekijöitä ovat templaatti-DNA:n määrä ja pitoisuus. Tämän lisäksi tulisi huomioida käytettävä entsyymi ja lämpötila. Ekstensionopeuteen vaikuttaa myös puskuri, suolapitoisuus, pH ja templaatti-DNA:n luonne. Yleisesti käytetty ekstensioaika ja lämpötila on 1 minuutti 72 °C:ssa. Nämä asetukset ovat yleisiä Taq-polymeraasille, ja niiden tulisi riittää, mikäli tuote on pituudeltaan alle 2 kb. Muilla entsyymeillä on kuitenkin omat asetuksensa, ja tämä tulisi ottaa huomioon reaktiota suunniteltaessa. Esimerkiksi denaturointivaiheessa ensimmäiset syklit kannattaa ajaa pidennettyinä, koska templaattipitoisuus on vielä pieni. Tämän lisäksi viimeinen sykli tulisi mieluiten ajaa pidempänä, jotta keskeneräiset tuotteet ehtivät valmistumaan. [4.]; [15.]; [16.]

4.4 Percoll™-liuos DNA-eristykseen

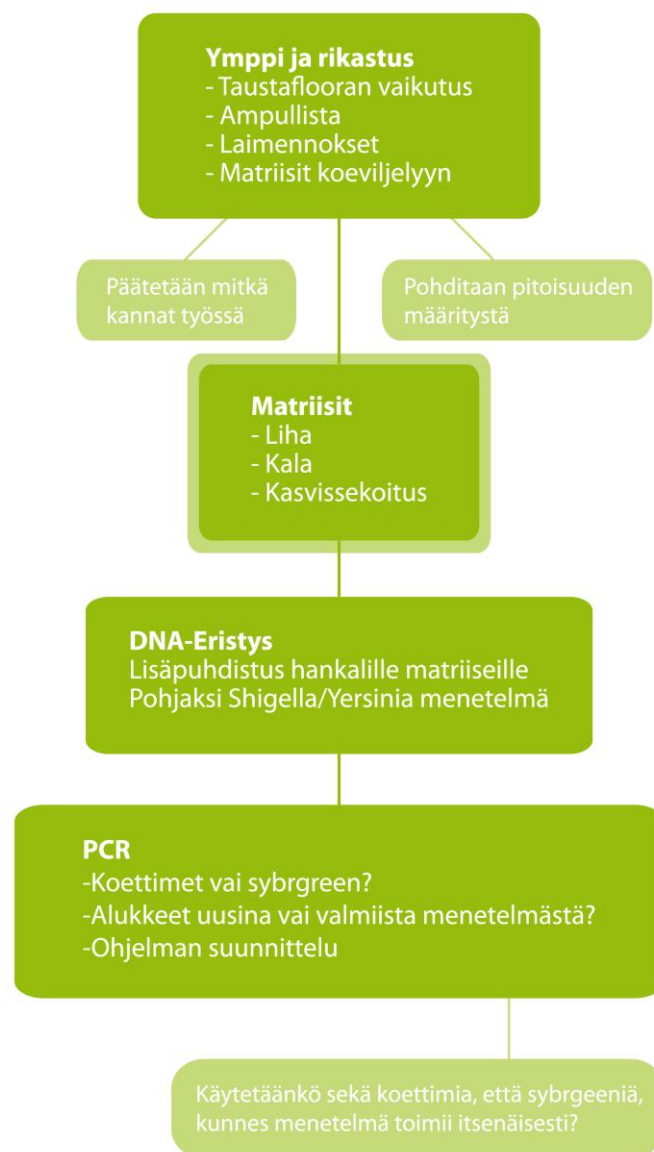
Percoll™-liuos on yleinen DNA-eristykseen käytetty sentrifugointimenetelmä, joka toimii tuotteilla, jotka muodostavat gradientin. Menetelmän avulla solumassa saadaan erotettua elintarvikematriisista nopeasti ja tehokkaasti. Sentrifugoinnin päätteeksi solumassa sijoittuu putken pohjalle, ja matriisi putken yläosaan. Gradientti muodostuu partikkelien koon mukaisesti.

Liuos on muodostunut kolloidisesta silikasta, jonka päällysterakenteena toimii PVP (polyvinyylipyrrolidoni). Liuos muodostaa gradientin spontaanisti, kun sitä sentrifugoidaan alhaisilla nopeuksilla. PVP on ei-toksinen soluille, viruksille ja muille biologisille näytteille, minkä vuoksi se soveltuu hyvin ko-

näytteiden erotteluun. Percollin hyviin puoliin lukeutuu myös sen alhainen viskositeetti. [12.]

5 TYÖN TOTEUTUS

Työn toteutus jaettiin vaiheisiin seuraavanlaisesti: kantojen elvytys, rikastus ja kasvatus. Seuraavaksi siirryttiin ymppien valmistukseen sekä matriisien valintaan ja valmisteluihin. Kolmas vaihe oli DNA-eristysmenetelmän valinta ja lopulta PCR-menetelmän optimointi ja näytteiden ajo, joka käy ilmi kaaviosta 1.



Kaavio 1. Työvaiheet

5.1 Kantojen elvytys

Kantojen elvytykseen käytettiin Merckin alkaalista peptonivettä (APV), johon lisättiin NaCl:a 2 %:n pitoisuuden saavuttamiseksi. Kaikki työssä käytetyt kannat olivat suolaisessa kasvualustassa menestyviä ja *V. vulnificuksen* tapauksessa ehdottomasti halofiilejä. Jokaisella kannalla on oma ideaalisuolapitoisuutensa, mutta 2 %:n pitoisuutta päätettiin käyttää kompromissina, jossa kaikki kannat pystyisivät kasvamaan.

APV:tä mitattiin koeputkeen 10 ml, minkä jälkeen elvytyshelmi lisättiin putkeen. Putkea sekoitettiin vortex-sekoittimella ja asetettiin rikastettavaksi 37 °C:n lämpökaappiin yön ylitse (n.18 h).

Seuraavana päivänä rikastusliemestä valmistettiin pitoisuusmäärittystä varten laimennossarja pipetoimalla sarjassa 1:10 peptoniveteen. Laimennoksista 100 µl viljeltiin pintalevitystekniikalla 2 %:lle tryptonisoija-agar-maljoille.

Maljoja inkuboitiin lajille sopivassa lämpökaapissa (37 °C *V. cholerae*, *V. carchaemolyticus* tai 42 °C *V. vulnificus*). Laimennoksien ja rikastuksien asetuksien muutoksia jatkettiin, kunnes löydettiin DNA-eristykseen sopivan pesäkeluvun (pmy) tuottavat asetukset jokaiselle lajikkeelle.

5.1.1 *Vibrio cholerae*

*V. cholerae*sta elvytettiin kaksi helmeä. Elvytys onnistui ensimmäisellä yrityksellä ja *V. cholerae*en kanssa ei ollut muutenkaan suuria ongelmia kasvatuksessa tai käsittelyssä. Ainoa ongelma oli liiallinen kasvu osassa maljoista. Tämän lisäksi osassa maljoista pesäkkeet kasvoivat liian laajoiksi, minkä vuoksi maljojen lukeminen oli vaikeaa tai mahdotonta.

5.1.2 *Vibrio parahemolyticus*

*V. parahemolyticus*esta suoritettiin useita elvytyksiä, jotka itsessään onnistuivat hyvin. Kasvatuksista ei kuitenkaan saatu tuloksia PCR-vaiheessa, mistä johtuen kokeiltiin elvyttää uusia helmiä, jotta voitaisiin määrittää oliko vika

helmissä, alukkeissa, eristyksessä vai jossain muussa työskentelyn vaiheessa. Lopulta havaittiin virheen lähteeksi väärä kanta, jonka seurauksena tilattiin haettua geeniä sisältävä kanta Yhdysvalloista.

Uusi kanta saapui ampullissa ja se elvytettiin pakkauksen mukana tulleiden ohjeiden mukaisesti. Ampullista elvytetystä pelletistä valmistettiin tullin kylmäsäilöntään uusia elvytyshelmiä.

5.1.3 *Vibrio vulnificus*

V. vulnificuksen kanssa oli suuria ongelmia toistettavien tulosten saamiseksi kasvatuksessa ja elvytyksessä. Ongelman ratkaisemiseksi kokeiltiin useita eri asetuksia lämpötilan, kasvuajan ja alustan suhteen. Siitäkään huolimatta ideaali ratkaisua ei löydetty testauksen aikana.

5.1.4 *Kasvatus*

Kasvatusta varten valmistettiin 2 %:sta TSA-agaria, TCBS-agaria ja lampaanveri-agaria (reseptit liitteissä). Tarkoituksena oli löytää sopiva kasvatusalusta jokaiselle käytetyistä lajeista. Elvytyksen ja rikastuksen jälkeen helmiä levitettiin TSA-agarille, minkä jälkeen niiden annettiin kasvaa yönylitse (n.18 h) lämpökaapissa.

V. cholerae saatiin kasvamaan 2 %:sella TSA-agarilla ensimmäisellä yrityksellä. Jatkokokeiluissa TSA osoittautui parhaaksi alustaksi ympyrien valmistusta ja laimennossarjoja ajatellen. Myöhemmissä kokeiluissa myös TCBS-agar ja lampaanveri-agar todettiin soveltuviksi *V.choleraen* kasvattamiseen, mutta TSA:ssa pitäydettiin sen antaessa toistettavia tuloksia.

V. parahemolyticuksen kasvatuksessa todettiin lampaanveri-agarin antavan paremmin toistettavia tuloksia, kuin TSA-agar, jota käytettiin ensimmäisiä helmiä elvytettäessä. Myöhemmissä helmielvytyksissä, sekä pitoisuuden määrittäystä hakevissa laimennossarjoissa käytettiinkin lampaanveri-agaria TSA-agarin rinnalla. Siitäkin huolimatta TSA sekä TCBS- agar soveltuivat *V. parahemolyticuksen* kasvatukseen.

Myöhemmin käyttöön otettu uusi *V. parahemolyticus*-kanta käyttäytyi kasvatuksessa samalla tavoin kuin aikaisempikin, jolloin kasvatusolosuhteita ei jouduttu vaihtamaan.

V. vulnificuksen kasvatuksessa oli alusta alkaen ongelmia. Ensiksi helmiä ei saatu elvytettyä kunnolla, minkä jälkeen kasvatuksessa ei löydetty sopivia olosuhteita toistettavien tuloksien takaamiseksi. Koko testauksen ajan pyrittiin löytämään oikeanlainen yhdistelmä kasvualustaa, lämpötilaa ja kasvatusajan pituutta, jotta menetelmä toimisi varmasti.

Sekä TSA että veriagar antoivat toisinaan positiivisia tuloksia *V. vulnificukselle*, mutta samoilla asetuksilla uudelleen kokeiltaessa saattoi lopputulos olla toisella kerralla negatiivinen.

5.2 Ymppien valmistus

Ymppejä valmistettaessa päätettiin vaihteluväliksi valita 1 - 1000 pmy, jotta testauksessa saataisiin informaatiota menetelmän herkkyydestä. Ympit lisättiin sekoitukseen kasvatuslientä ja matriisia. Rinnalle viljeltiin laimennossarja agareille, jotka toimivat pitoisuuden vertauskohtina. Kasvatusliemenä käytettiin pitoisuudeltaan 2 %:sta NaCl-peptonivettä.

5.2.1 Matriisit

Matriisien valinnassa tärkeimpänä kohteena pidettiin merenelävistä koostuvaa matriisia, koska vibriot ovat enimmäkseen merivedestä löytyviä halofiilisiä bakteereja. Kalamatriisiksi valittiin pakastesei, joka oli kustannustehokas ja helppo punnita tarkasti. Menetelmän lopullinen käyttökohde myös tulisi todennäköisesti olemaan erilaiset merenelävistä koostuvat tuotteet, kuten kalat, simpukat ja katkaravut.

Menetelmänkehitysvaiheessa haluttiin testata erilaisten matriisien toimivuutta ja niistä mahdollisesti koituvia häiriötekijöitä. Kalamatriisin lisäksi päätettiin testata kasvis- ja lihamatriisit. Kasvismatriisina käytettiin aluksi kasvissekoitusta, josta myöhemmin siirryttiin porkkanaraasteeseen. Lihamatriisiksi valikoitiin hienoksijauhettu naudanliha.

Ymppejä varten matriisia punnittiin 25 g näytepussiin, jonka jälkeen kasvatusliemeksi lisättiin 225 ml 2 %:sta peptonivettä. Ymppejä lisättiin 1 ml, minkä jälkeen näytteet sekoitettiin stomacher-homogenisaattorilla ja inkuboitiin.

5.2.2 Ympyriä vahvuuden määrittäminen

Vahvuuden määrittäminen suoritettiin agarille viljelyillä laimennos-sarjoilla. Agareiksi valittiin 2 %:nen TSA, sekä lampaanveri-agar, jotka olivat osoittautuneet toimiviksi kasvualustoiksi. Laimennoksia tehtäessä haettiin pitoisuuksia 1 - 1000 pmy. Testauksen alussa pyrittiin käyttämään suuria pitoisuuksia, kuten 100 tai 1000 pmy. Tarkoituksena oli ensin testata menetelmän toimivuutta ideaaliolosuhteissa, ja myöhemmin kokeilla pienempiä pitoisuuksia menetelmän herkkyuden määrittämiseksi.

Vibrio cholerae kanssa TSA-agar antoi toistettavia tuloksia. Myös lampaanveri-agar toimi *V. cholerae* kanssa toistettavasti.

5.3 DNA-eristys

DNA-eristysmenetelmää pohdittaessa pyrittiin löytämään ratkaisu, joka olisi kustannustehokas, helppokäyttöinen ja yhteensopiva tullilaboratorion muiden käytössä olevien menetelmien kanssa. Ensimmäinen testattu menetelmä oli *Biopharm*in *SureFood® PREP Plant X –kitti* [Tuotekoodi: S1006]. Neljästä näyteputkesta suoritettiin eristys kitin ohjeiden mukaisesti, mutta eristyksiä tarkasteltaessa DNA-pitoisuudet olivat alhaisia, joten niiden kanssa ei siirrytty PCR-vaiheeseen.

Seuraavana testattavien metodien listalla oli tullilaboratorion *Yersinia* ja *Shigella* -menetelmissä käytetty Percoll™ -liuos. Tämä metodi oli paitsi helppokäyttöinen, myös tuttu laboratorion henkilökunnalle, jolloin menetelmän opettelu olisi vaivattomampaa. Percoll-liuos valittiinkin lopulliseksi eristysmenetelmäksi, kun ensimmäiset positiiviset tulokset saatiin. Työssä käytetyn liuoksen pitoisuus oli 40 %.

Tulosten perusteella *Vibrio vulnificus*sta tehdyt eristykset eivät tuntuneet noudattavan johdonmukaista toistettavuutta, koska samansuuruisen pmy -pitoisuuden omaavat näytteet antoivat joissain tapauksissa positiivisen tuloksen, kun taas toisissa ne antoivat negatiivisen tuloksen. Koska *V. cholerae* ja *V. parahemolyticus* kanssa vastaavia ongelmia ei havaittu, on kenties syytä epäillä menetelmän toimivuutta *V. vulnificus* kohdalla. Ongelma voi olla muuallakin, mutta DNA-eristykseen aiheuttamaa virhettä ei voida sulkea pois ilman jatkotestausta.

Aluksi pipetoitiin 600 µl percoll – liuosta 1,5 ml:n eppendorf putkiin. Jokaiselle näytteelle pipetoitiin oma putkensa, minkä jälkeen otettiin ensimmäinen näytepussi käsittelyyn. Pussia sekoitettiin ennen avaamista, jotta näyte olisi tasainen koostumukseltaan. Tämän jälkeen pipetoitiin varovasti pussin suodatetulta puolelta 900 µl kirkasta näytettä, joka pipetoitiin hitaasti percoll-liuoksen päälle, sen pintaa rikkomatta. Toistettiin prosessi jokaisen näytteen kohdalla, minkä jälkeen putkia sentrifugoitiin 60 s:n ajan nopeudella 16000 g.

Mikäli prosessi on suoritettu oikein, niin matriisi ja kasvatusneste jäävät putken yläosaan, kun taas solumassa sijoittuu putken pohjalle. Sentrifugoinnin jälkeen pipetoidaan putkesta varovasti ylempi osa gradientista pois, jättäen pohjalle n. 0,1 ml verran sakkaa. Sama toistetaan jokaiselle putkelle.

Pohjalle jäänyt 0,1 ml:n sakka pipetoidaan uuteen putkeen, johon on valmiiksi pipetoitu 1,2 ml steriiliä vettä. Sekoitetaan putki manuaalisesti kääntelemällä sitä ylösalaisin, niin että neste irtautuu pohjasta joka kerta. Manuaalisen sekoituksen jälkeen putkea vortexoidaan hetken aikaa. Prosessi toistetaan jokaiselle näytteelle omaan uuteen putkeen. Tämän jälkeen putkia sentrifugoidaan 5 min 10000 rpm:n nopeudella.

Sentrifugoinnin päätteeksi jokaisesta putkesta pipetoidaan ylempi osa pois, jättäen pohjalle jälleen n. 0,1 ml. Jokaiseen putkeen lisätään tämän jälkeen 1 ml steriiliä vettä, ja vortexoidaan huolellisesti. Sentrifugoidaan putket uudelleen 5 min 10000 rpm:n nopeudella. Tämän sentrifugoinnin jälkeen putkista pipetoidaan yläosa pois, jättäen pohjalle n. 0,2 - 0,3 ml.

Putket siirretään 95 °C:seen lämpöhauteeseen lyysautumaan 20 min ajaksi. Tämän jälkeen putket asetetaan kylmäblokkiin inkuboitumaan pariiksi minuutiksi, minkä jälkeen ne sentrifugoidaan 1 min 10000 rpm:n nopeudella. Sentrifugoinnin päätteeksi näytteet ovat valmiit käytettäväksi. Tarpeen mukaan ne voidaan säilöä pakkaseen -20 °C:seen.

5.4 PCR

Työn keskeisin osio oli reaaliaikaisen PCR-menetelmän kehittäminen vibriobakteerien havaitsemiseksi elintarvikematriisista. Tärkeimpiä huomioonotettavia asioita menetelmänkehityksessä oli alukkeiden valinta. Ensimmäinen suunnitelma oli käyttää FDA:n menetelmässä esiteltyjä alukkeita. FDA-

menetelmä oli kuitenkin geelipohjainen PCR-menetelmä, ja pohdinnan jälkeen päätettiin käyttää uusia alukkeita.

Reaktion suunnittelussa huomioonotettavia asioita oli optimaalisen reagenssimäärän löytäminen. Lopulta päädyttiin 1 x reaktioksi 20+5 µl:n kokonaistilavuus, jossa alukkeiden pitoisuus oli 900 nM, koettimien 200 nM, 2x mastermixiä viisinkertainen määrä koettimiin + alukkeisiin nähden, ja loput vettä. Lopullista seosta siis 20 µl reaktiota kohti, ja 5 µl näytettä.

Ajo-ohjelman suunnittelu oli aloitettava siitä lähtökohdasta, että kaikki kolme testattavaa kantaa tulisi pystyä ajamaan samanaikaisesti. Tähän päätökseen tultiin paitsi kustannuksellisista, niin myös ajansäästöllisistä syistä. Mahdollisuuksien mukaan menetelmällä tulisi pystyä testaamaan useitakin näytteitä päivässä, jolloin multi-tasking tässä mielessä olisi tärkeää.

Havainnointimenetelmää pohdittaessa isoin kysymys oli vaihtoehdot koettimien ja sybrgreen-väriaineen välillä. Olisiko mahdollista tai järkevää käyttää testausvaiheessa kumpaakin, kunnes menetelmän toimivuudesta olisi varmpaa tietoa. Tässä vaiheessa myös pohdittiin, millaisia positiivisia tai negatiivisia verrokkeja reaktiossa käytettäisiin.

5.4.1 Alukkeet ja koettimet

Alun perin tarkoituksena oli käyttää FDA:n menetelmässä käytettyjä alukkeita, mutta reaaliaikaisen ja geelipohjaisen menetelmän eroavaisuuksien vuoksi päädyttiin luomaan kokonaan uudet alukkeet. Reaaliaikaista PCR:ää varten tarvitaan alukkeiden lisäksi koetin, minkä lisäksi FDA:n alukkeet monistivat liian suurta PCR-tuotetta. Real-time PCR:lle sopivan kokoinen tuote on <200 nt ja FDA:n menetelmän tuotteet olivat 270 - 777 nt. Alukkeet ja koettimet suunniteltiin Sigma-Aldrich'in 'design my probe' -palvelussa.

V. cholerae-alukkeiden kohteeksi valikoitiin pätkä koleratoksiinia (CT) koodaavasta CTX-geenisekvenssistä. *V. parahemolyticuksen* kohdesekvenssinä oli *tdh*:ta koodaavan geenin osa. *V. vulnificuksen* kohdesekvenssiksi valittiin *vvhA* -geenin osa. Uudet alukkeet sijoituivat kokonaan (ctx, vvhA) tai osittain (tdh) FDA:n alukesekvenssien sisälle. Alukkeiden ja koettimien spesifisyys tarkistettiin primer-BLAST-haulla. Saadut tulokset vastasivat FDA:n

menetelmän lukemia, joten uusien alukkeiden ja koettimien voitiin olettaa olevan yhtä spesifisiä.

Suunnitelluilla alukkeilla tulisi olla mahdollista tunnistaa suurin osa patogeenisistä vibrioista. *V. parahaemolyticuksen* osalta tunnistuksen ulkopuolelle jäävät kannat joilla tdh-geenin sijaan on trh-geeni. FDA:n alukkeet on esitelty alla olevassa taulukossa.

Taulukko 1. FDA:n alukkeet [5.]

<i>V. cholerae</i> FDA alukkeet	
Cholera toxin gene(ctx) subunit A ja B, 777nt	
Forward	5'-TGAAATAAAGCAGTCAGGTG-3'
Reverse	5'-GGTATTCTGCACACAAATCAG-3'
<i>V. parahaemolyticus</i> FDA alukkeet	
Thermostable direct hemolysin gene(tdh), 270nt	
Forward	5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3'
Reverse	5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'
<i>V. vulnificus</i> FDA alukkeet	
Cytolysin gene(vvhA), 519nt	
Forward	5'-CCGCGGTACAGGTTGGCGCA-3'
Reverse	5'-CGCCACCCACTTTCGGGCC-3'

Havainnointimenetelmää päätettäessä päädyttiin koettimiin sybrgreenin sijaan. Syyt olivat kustannuksellisten syiden lisäksi käytännölliset. Koetintekniikan todettiin paremmin vastaavan menetelmän tarpeita. Koettimiksi valikoitui dual-labeled 6-FAM-Tamra DNA-koettimet, kuten alla olevassa taulukossa käy ilmi.

Taulukko 2. Uudet alukkeet ja koettimet

V. cholerae uudet alukkeet ja koettimet	
Cholera toxin gene(ctx) subunit A ja B, 97nt	
Forward	5'-TAGCCACTGCACCCAACATG-3'
Reverse	5'-GGAATCCCACCTAAAGCAGAAAC-3'
Koetin	AGGGGCATACAGTCCTCATCCAGAT
V. parahaemolyticus uudet alukkeet ja koettimet	
Thermostable direct hemolysin gene(tdh), 175nt	
Forward	5'-CTGATGAGATATTGTTTGTGTTTCG-3'
Reverse	5'-GTCATGTAGGATGTCAACCATTAG-3'
Koetin	CCCAAGCTCCGGTCAATGTAAAGGT
V. vulnificus uudet alukkeet ja koettimet	
Cytolysin gene(vvhA), 138nt	
Forward	5'-ATATGTGCCGATTGTTGAGAAACC-3'
Reverse	5'-GCCACATTGACGCGAACATC-3'
Koetin	AGCACCCGCATTACACCAGTCTCGT

5.4.2 Reaktio-olosuhteet

Kun alukkeet ja koettimet saatiin tilattua ja käyttöön, alettiin pohtia sopivia pitoisuuksia reaktiota varten. Seuraava taulukko esittää lopullisia 1 x reaktiopitoisuuksia.

Taulukko 3. Reaktiopitoisuudet

Reaktioseos	Pitoisuus
Kantaliuos	100 µM
Välilaimennos	20 µM
1 x Reaktio 20µl + 5µl näyte	
Aluke Forward	1,125 µl (900 nM)
Aluke Reverse	1,125 µl (900 nM)
Koettimet	0,25 µl (200 nM)
2 x Mastermix	12,5 µl
H ₂ O	5 µl

5.4.3 Ajo-ohjelma

Ajo-ohjelman suunnittelussa lähtökohtaisesti haettiin ohjelmaa, jonka avulla kaikki kolme käytettyä kantaa saataisiin ajettua yhtäaikaisesti. Toistettavuuden takaamiseksi käytettiin jokaisella ajolla samaa PCR-laitetta (Applied Biosystems 7300 Real-time PCR system).

Testauksen aikana kokeiltiin kahta eri ohjelmaa, joista toinen antoi parempia tuloksia kuin ensimmäinen. Tarkoituksena oli löytää reaktiolle optimaaliset lämpötilat, syklin pituudet sekä määrät. Asetukset käyvät ilmi taulukosta 4.

Taulukko 4. Ajo-ohjelmien asetukset

Päivä	Vaihe	Lämpötila	Aika (min:sek)	Toistoja
12.8.2009	1	50	2	1
	2	95	10	1
	3	95 61	0:15 1	45
6.8.2009	1	50	2	1
	2	95	10	1
	3	95 64	0:15 1	45

6 TULOKSIEN TARKASTELU

6.1 Ajotulokset

Menetelmää ehdittiin testaamaan käytännössä muutamia kertoja, joiden tulokset olivat vaihtelevia. Toistoja ei ehditty suorittamaan tarpeeksi useata menetelmävalidointia, tai muutakaan pitävää varmennusta varten. Tulokset ovat siis lähinnä suuntaa-antavia, mutta hyvä pohja menetelmän jatkokehitykselle.

V. vulnificus oli kaikissa käsittelyn vaiheissa hankalin menetelmään valituista lajeista, ja tämä näkyi myös PCR-tuloksissa taulukossa 5.

Taulukko 5. *V. vulnificus* qPCR-tulokset eri matriiseissa

<i>V. vulnificus</i>		kala		
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
12.8.2009	?		x	
12.8.2009	?	x		26,8461
15.9.2009	?	x		23,0051
15.9.2009	?	x		23,0329
20.8.2009	?		x	
20.8.2009	?		x	
31.8.2009	100	x		26,8471
31.8.2009	100	x		26,8202
31.8.2009	1		x	
31.8.2009	1		x	
<i>V. vulnificus</i>		kasvis		
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
12.8.2009	?	x		32,3618
12.8.2009	?	x		32,9195
15.9.2009	?		x	
15.9.2009	?		x	
20.8.2009	?		x	
20.8.2009	?		x	
31.8.2009	100	x		33,0345
31.8.2009	100	x		32,7146
31.8.2009	1		x	
31.8.2009	1		x	
<i>V. vulnificus</i>		liha		
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
12.8.2009	?	x		33,5982
12.8.2009	?	x		33,415
15.9.2009	?	x		25,6267
15.9.2009	?	x		25,7421
20.8.2009	?		x	
20.8.2009	?		x	
31.8.2009	100	x		30,9039
31.8.2009	100	x		30,6293
31.8.2009	1		x	
31.8.2009	1		x	

Taulukkoa tarkastelemalla voidaan todeta, että jakauma positiivisten ja negatiivisten näytteiden välillä on lähes tasan 50–50 %. Kaikkiin näytteisiin kui-

tenkin lisättiin vibriobakteereja, joten tuloksista voidaan kenties vetää johtopäätöksiä.

V. cholerae kanssa työskennellessä törmättiin vähäisempiin ongelmiin. PCR-tulokset puhuivat myös sujuvan menettelyn puolesta, kuten taulukosta 6 voidaan havaita.

Taulukko 6. *V. cholerae* qPCR-tulokset eri matriiseissa

<i>V. cholerae</i>		kala		
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
15.9.2009	?	x		18,261
15.9.2009	?	x		18,2979
31.8.2009	100	x		15,6605
31.8.2009	100	x		15,5736
31.8.2009	1	x		15,6587
31.8.2009	1	x		15,4923
2.10.2009	40	x		15,8334
2.10.2009	40	x		15,8615
<i>V. cholerae</i>		kasvis		
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
12.8.2009	?	x		33,412
12.8.2009	?	x		34,1322
15.9.2009	?	x		19,5403
15.9.2009	?	x		19,6036
31.8.2009	100	x		34,5249
31.8.2009	100	x		35,1389
31.8.2009	1	x		27,948
31.8.2009	1	x		28,0705
2.10.2009	40	x		16,6997
2.10.2009	40	x		16,7554
<i>V. cholerae</i>		liha		
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
15.9.2009	?	x		17,1908
15.9.2009	?	x		17,1657
31.8.2009	100	x		20,234
31.8.2009	100	x		20,1204
31.8.2009	1	x		17,4072
31.8.2009	1	x		17,391
2.10.2009	40	x		16,3551
2.10.2009	40	x		16,4414

Jokainen ajetuista näytteistä antoi positiivisen tuloksen. Matriisilla ei vaikuttanut olevan merkittävää vaikutusta lopputuloksen kannalta. Toistoja ei jälleen ollut kovinkaan useaa, mutta tuloksista voidaan silti vetää suunta-antavia johtopäätöksiä menetelmän toimivuudesta *V. cholerae* osalta.

Viimeinen tutkittavista suvuista oli *V. parahaemolyticus*. Jonkin aikaa ehdittiin testata kantaa, jolla ei ollut patogeenisyyttä aiheuttavaa geeniä, jolloin menetelmä ei havainnut näytteistä mitään. Kun geenin sisältävä kanta tilattiin ja alettiin testata menetelmän toimivuutta sen kanssa, olivat tulokset huomattavasti rohkaisevampia.

Taulukko 7. *V. parahaemolyticus* qPCR-tulokset eri matriiseissa

<i>V. parahaemolyticus</i>				
Kala				
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
9.10.2009	?	x		17,3404
9.10.2009	?	x		17,4797
13.10.2009	?		x	
13.10.2009	?		x	
Kasvis				
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
9.10.2009	?	x		18,0426
9.10.2009	?	x		17,8217
13.10.2009	?	x		20,6215
13.10.2009	?	x		20,7438
Liha				
pvm	pmy	Pos.	Neg.	Ct
9.10.2009	?	x		23,1864
9.10.2009	?	x		23,1926
13.10.2009	?	x		23,6314
13.10.2009	?	x		23,5301

Muutaman toiston jälkeen ei vielä voida vetää pitäviä johtopäätöksiä, mutta suunta-antavasti tulokset vaikuttaisivat lupaavilta. *V. parahemolyticuksen* kohdalla ei törmätty isompiin ongelmiin missään vaiheessa työskentelyä. Kuten muidenkin lajien kohdalla useampia toistoja tarvittaisiin, jotta menetelmä voitaisiin akkreditoida ja ottaa käyttöön.

PCR-tuloksia tarkasteltaessa voidaan huomata, että näytteiden Ct-arvot eivät vaikuttaisi korreloivan pmy-pitoisuuksien kanssa. Selitystä ilmiölle ei löy-

detty testauksen aikana, joten toistaiseksi sitä voidaan vain arvuutella. Pitoisuuden määrittämisen kanssa oli muutenkin ongelmia maljojen joko ylikasvetua, annettua ei toistettavia lukuja tai jäädessä kokonaan kasvamatta. Lähinnä *V. cholerae*n kanssa suoritettujen maljaukset antoivat keskenään yhteneviä tuloksia, mutta PCR-testauksessa nämäkin näytteet antoivat ristiriitaisia tuloksia.

6.2 Negatiiviset kontrollit

Negatiivisena kontrollina käytettiin muuten näytteiden kanssa samoin valmistettuja reaktioseoksia, mutta näyte DNA:n sijaan lisättiin vettä. Negatiivisten kontrollien tulokset olivat taulukon 8 mukaisia.

Taulukko 8. Negatiiviset kontrollit

Negatiiviset kontrollit <i>V. vulnificus</i>			
pvm	Pos.	Neg.	Ct
12.8.2009		x	Undet.
15.9.2009		x	Undet.
20.8.2009		x	Undet.
31.8.2009		x	Undet.
Negatiiviset kontrollit <i>V. parahaemolyticus</i>			
pvm	Pos.	Neg.	Ct
9.10.2009		x	Undet.
13.10.2009		x	Undet.
Negatiiviset kontrollit <i>V. cholerae</i>			
pvm	Pos.	Neg.	Ct
12.8.2009		x	Undet.
6.8.2009		x	Undet.
15.9.2009		x	Undet.
31.8.2009		x	Undet.
2.10.2009		x	Undet.

Tulosten perusteella voidaan arvioida, että negatiiviset kontrollit toimivat oletetulla tavalla.

7 YHTEENVETO JA POHDINTA

Yhteenvetona voitaisiin todeta, että menetelmänkehitys onnistui kohtuullisen hyvin aikarajoitteista huolimatta. Kaikkia alukkeita ja koettimia ehdittiin testata toimivuuden suhteen, ja jokainen testatuista lajeista saatiin havaittua me-

netelmällä, mutta toistettavuuden kanssa havaittiin ongelmia. Syitä voi olla useita, joita voidaan pohtia.

Testatuista lajeista *Vibrio cholerae* oli työskentelyn suhteen helppo siinä mielessä, että se antoi tuloksia jokaisessa työskentelyn vaiheessa. PCR-testien antamia ristiriitaisia tuloksia tulisi vielä tarkkailla ja tehdä useampia toistoja. Mahdollisesti tuloksiin voi löytyä selitys maljauksessa käytetystä agarista. 2 %:n TSA-agar ei välttämättä ole ideaali pitoisuusmäärittysten tekemiseen. Ehdottaisin seuraavaksi kasvualustaksi testauksessa TCBS-agaria.

Vibrio vulnificus oli vaikein testatuista suvuista, ja sen kanssa kaikissa menetelmänkehityksen vaiheissa törmättiin jonkinlaisiin ongelmiin. Elvytyksen kanssa oli ongelmia, kun helmiä ei saatu elvytettyä luotettavasti. Samat ongelmat jatkuivat rikastuksessa ja kasvatuksessa. Maljakasvatuksia ei saatu toimimaan kunnolla, vaikka testattiin erilaisia lämpötiloja, kasvatusaikoja sekä kasvualustoja. PCR-testeissä saadut vaihtelevat tulokset voivat selittyä ajo-ohjelmassa sijaitsevilla ongelmilla, kuten liiallinen syklien määrä, *V. vulnificukselle* kenties soveltumattomat lämpötilat jne. Toinen vaihtoehto on DNA-eristyksessä sijaitsevat ongelmat. Käytetty Percoll-liuos saattaa olla soveltumaton *V. vulnificuksen* eristykseen. Toinen mahdollisuus on, että DNA-eristyksessä käytetty lyysauslämpötila on *V. vulnificukselle* haitallinen. Mahdolliseen jatkokehitykseen suosittelisin siis testaamaan eri DNA-eristysmenetelmää, kokeilemaan erilaisia ajo-ohjelmia ja mahdollisesti kasvatuksessa esiintyneisiin ongelmiin korkeamman NaCl-pitoisuuden sisältävää kasvatusalustaa/lientä.

Harmillisen virheen vuoksi etsittyä sekvenssiä sisältävää *Vibrio parahemolyticus*-kantaa ei ehditty testaamaan kovinkaan kauan. Sekvenssiä sisältämättömän kannan testauksesta hyötynä tosin oli oikeiden elvytys- ja kasvatusolosuhteiden löytäminen. Samat menetelmät toimivat myös patogeeniselle kannalle, jolloin eristys ja PCR-testaus helpottuivat.

V. parahemolyticuksen kohdalla ongelmanratkaisu keskittyy jälleen toistettavan pitoisuusmäärittymisen kehittämiseen, ja useampien PCR-ajojen suorittamiseen menetelmän toimivuuden varmistamiseksi. Tähän mennessä saadut tulokset ovat suuntaa-antavia ja puhuvat menetelmän toimivuuden puolesta.

Ehdottaisin seuraavaksi testauksen kohteeksi TCBS-agarin kokeilun pitoisuusmäärityksissä.

Menetelmän validoinnin loppuunsaattamiseksi olisi syytä suorittaa useampia toistoja. Herkkyyden määrittämiseksi olisi myös keksittävä luotettava pitoisuudenmääritysmenetelmä, koska maljaviljely ei vaikuttanut tuottavan kokeilla asetuksilla johdonmukaisia tuloksia.

VIITELUETTELO

- [1] Moreno ML, Landgraf M, Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* isolated from seafood: 1998
- [2] Hedman, Klaus. Mikrobiologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim, 2010.
- [3] Korkeala, H, Elintarvikehygieniä: ympäristöhygieniä, elintarvike- ja ympäristötöksikologia. WSOY oppimateriaalit: 2007
- [4] Suominen, I, Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52: 2010
- [5] Bacteriological Analytical Manual Online, May 2004, Chapter 9 Vibrio. U.S. Food and drug administration: 2004
- [6] UDC 576.851 Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea No. 156: 1996
- [7] TCBS-agar kuva. Verkkodokumentti
<http://www.annclinlabsci.org/content/37/4/330/F3.expansion> Luettu 21.8.2012
- [8] Dual-label koettimien toimintakaavio. Verkkodokumentti
<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html> Luettu 21.7.2012
- [10] Kaysner A. C, Compendium of methods for the microbiological examination of foods 4th edition, Chapter 40 Vibrio. American public health association, Washington, DC: 2001 (ISBN-13: 978-0875531755)
- [11] Post E. D, Food-borne pathogens monograph number 7 Vibrios, Oxoid. 2000
- [12] Percoll ohje. Verkkodokumentti
[\[http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20hand%20books/Don't%20move/18111569AC.pdf\]](http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20hand%20books/Don't%20move/18111569AC.pdf) Luettu 2.9.2012
- [13] Hallanvuo, S, Validointi – Mikrobiologiset menetelmät. Verkkodokumentti
[\[www.evira.fi/files/saija_hallanvuo_validointialustus_13102010.pdf\]](http://www.evira.fi/files/saija_hallanvuo_validointialustus_13102010.pdf) Luettu 13.10.2010
- [14] Tartuntatautiasetus.Finlex 31.10.1986
- [15] Markoulatos, P, Multiplex polymerase chain reaction:A practical approach. Virology Department, Hellenic Pasteur Institute, Ateena, Kreikka:2002
- [16] Heid, A, C. Real time quantitative PCR. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1996
- [17] Saari, L. Kemiallisten menetelmien validointiohje. Verkkodokumentti
[\[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoritoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf\]](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoritoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf) Luettu 29.09.2012

LIITE 1 RESEPTIT

Taulukko 1. Alkaalinen peptonivesi

Alkaalinen peptonivesi (APV) 2%		
Peptonia		10g/l
Valmis NaCl		10g/l
Lisätty NaCl		+10g

Taulukko 2. Trypicase soy agar

Trypicase Soy agar (TSA) 2% NaCl	-/l
Valmistaja	BBL
Pancreatic digest of casein	15g
Papaic digest of soybean meal	5g
NaCl	5g
Agar	15g
Lisätty NaCl	15g