



Eeva Huhtelin

## **TRIKINELLASEKAINFEKTIOIDEN TUNNISTAMINEN**

# **TRIKINELLASEKAINFEKTIOIDEN TUNNISTAMINEN**

Eeva Huhtelin  
Opinnäytetyö  
Syksy 2012  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

# TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

---

Tekijä: Eeva Huhtelin

Opinnäytetyön nimi: Trikinellasekainfektioiden tunnistaminen

Työn ohjaaja: Elsa Kumpulainen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2012

Sivumäärä: 40 + 4 liitettä

---

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin Suomessa esiintyviä trikinellalajeja. Työn tarkoituksena oli valmistaa eri trikinellalajien toukista sekainfektioita ja tutkia, voidaanko yhden lajin toukka tunnistaa useamman erilajisen toukan seasta. Tavoitteena oli tutkia menetelmän herkkyyttä ja selvittää rajat, joiden jälkeen yksittäisen toukan havaitseminen yhteisnäytteestä ei enää onnistunut. Työ tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Tuotanto- ja villieläintutkimusyksikölle.

Työ aloitettiin toukkien eristämällä koe-eläinten lihasta. Toukat hajotettiin ja niiden DNA eristettiin. Lajintunnistus suoritettiin multiplex-PCR-menetelmällä ja PCR-reaktion tulokset todettiin agarosegelelektroforeesilla.

Työn edetessä havaittiin, että käytetty menetelmä ei ole luotettava sekainfektioiden tunnistamiseen useamman toukan yhteisnäytteestä. Luotettavampi tulos saadaan, kun lajintunnistus tehdään yksittäisille toukille. Tällä tavalla työhön käytettävä aika lyhenee huomattavasti, sillä useamman toukan hajottamiseen kuluu enemmän aikaa kuin yksittäisen toukan hajottamiseen.

---

Asiasanat: Trikinella, trikiini, trikinelloosi, multiplex-PCR

# SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
1 JOHDANTO	6
2 TRIKINELLA	7
2.1 Trikinellan elämäntieto	8
2.2 Trikinelloosi	9
2.2.1 Oireet	9
2.2.2 Diagnoosi	10
3 TRIKINELLOJEN LAJINTUNNISTUS	11
3.1 PCR-menetelmän periaate	12
3.2 Multiplex-PCR	13
3.3 Sekainfektioiden lajintunnistus	13
3.4 Sekainfektion syntyminen	14
3.5 Lajintunnistuksen tärkeys	15
4 SEKAINFEKTIOIDEN TUTKIMINEN	16
4.1 Trikinellojen eristäminen	16
4.1.1 Stomacher-digestiomenetelmä	17
4.1.2 Magneettisekoitin-digestiomenetelmä	18
4.2 Lajinmääritys	18
4.2.1 DNA:n eristys	18
4.2.2 PCR-reaktio	20
4.2.3 Elektroforeesi	21
4.3 Sekainfektiot	22
5 TULOKSET	23
5.1 Sekainfektiot 1	24
5.2 Sekainfektiot 2	25
5.3 Sekainfektiot 3	26
5.4 Sekainfektiot 4	28
5.5 Sekainfektiot 5	31
5.6 Sekainfektiot 6	32

5.7 Sekainfektiot 7	34
5.8 Virhelähteet	35
6 YHTEENVETO	37
LÄHTEET	38
Liite 1: Työvälineet	
Liite 2: Reagenssit	
Liite 3: Liuosten valmistus	
Liite 4: Molekyylipainomarkkeri	

# 1 JOHDANTO

Trikinellat, joita myös trikiineiksi nimitetään, ovat pieniä sukkulamatoja, joiden toukat elävät isäntäeläimen lihaksissa. Ne ovat lihaa syövien eläinten loisia ja niitä tavataan kaikkialla maailmassa. Trikinelloja on useita eri lajeja ja Suomessa niistä esiintyy neljä: *Trichinella spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* ja *T. pseudospiralis*.

Trikinellat aiheuttavat trikinelloosiksi kutsuttua sairautta, joka voi tarttua myös ihmiseen. Tartunta saadaan syömällä toukkia sisältävää lihaa raakana tai huonosti kypsennettynä. Suomessa trikinelloosia esiintyy yleisesti villieläimillä kuten ketuilla ja supikoirilla.

Opinnäytetyössä eristetään trikinelloja hiiristä ja valmistetaan niistä erilaisia sekainfektioita. Työn tarkoitus on tutkia, voidaanko yhden lajin toukka havaita useamman erilajisen toukan seasta. Toukkien laji määritetään multiplex-PCR-menetelmällä ja PCR-reaktion tulokset todetaan agaroosigeelielektroforeesilla.

Opinnäytetyö tehdään Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Tuotanto- ja villieläintutkimusyksikölle. Työn valvojana toimii tutkimusprofessori Antti Oksanen ja ohjaajana Elsa Kumpulainen.

## 2 TRIKINELLA

Trikinellat, joita usein vieläkin vanhahtavasti trikiineiksi kutsutaan, ovat pieniä sukkulamatoja, joiden toukat elävät ja kehittyvät tartuntakykyisiksi isäntäeläimen lihaksissa. Trikinelloja on useita eri lajeja, joista Suomessa esiintyy neljä: *Trichinella spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* ja *T. pseudospiralis*. (1.) Eri lajeilla on erilainen isäntäkirjo sekä maantieteellinen levinneisyys (2).

Suomessa trikinellat ovat erittäin yleisiä villieläimissä, kuten ketuissa, supi-koirissa ja ilveksissä. Yleisin laji on arktisiin olosuhteisiin sopeutunut *T. nativa*. Se kestää hyvin jäätymistä toisin kuin *T. spiralis*, jonka tärkein isäntäeläin on sika. (1.) Taulukossa 1. on lueteltu eri trikinellalajit sekä niiden levinneisyys ja isäntäeläimet.

TAULUKKO 1. Trikinellalajit (3, s. 326)

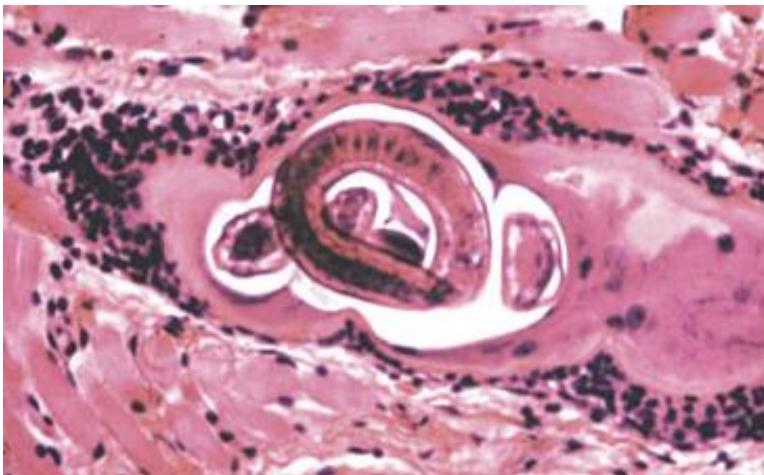
Laji	Levinneisyys	Isäntäeläin
<b>Kapseloituvat</b>		
<i>T. spiralis</i>	Maailmanlaajuinen	Sika, rotta, ihminen, muut nisäkkäät
<i>T. nativa</i>	Arktiset ja subarktiset alueet	Lihansyöjät
<i>T. nelsoni</i>	Afrikan trooppiset alueet	Lihansyöjät
<i>T. britovi</i>	Lauhkea vyöhyke	Lihansyöjät
<i>T. murrelli</i>	Pohjois-Amerikka	Villieläimet, ihminen
<b>Kapseloitumattomat</b>		
<i>T. pseudospiralis</i>	Maailmanlaajuinen	Nisäkkäät, linnut
<i>T. papuae</i>	Papua Uusi Guinea	Villisika, ihminen
<i>T. zimbabwensis</i>	Zimbabwe	Krokotiili

## 2.1 Trikinellan elämäncierto

Toukat elävät tartunnan saaneen eläimen lihaskudoksessa pienten kystien sisällä (4). Kystat ovat isäntäeläimen lihassoluja, jotka ovat muuttuneet toukan elämää ylläpitäviksi hoitajasoluiksi. Kun toukkia sisältävää lihaa syödään raakana tai huonosti kypsennettynä, ruuansulatusentsyymit vapauttavat toukat lihaskudoksesta. Tämän jälkeen toukat kulkeutuvat ohutsuoleen. (5.) Toukat kehittyvät aikuisiksi ohutsuolen nukkalisäkkeissä (3, s. 324).

Aikuistuneet madot parittelevat, jonka jälkeen urokset kuolevat ja naaraat kiinnittyvät ohutsuolen limakalvoon. Naaras synnyttää eläviä toukkia, jotka kulkeutuvat isäntäeläimen verenkiertoon. (3, s. 324.) Naaras tuottaa jälkeläisiä niin pitkään, kunnes isäntäeläimen immuunivaste kehittyy (5).

Toukat kulkeutuvat verenkierron mukana kaikkialle kehoon. Lopulta ne asettuvat poikkijuovaisiin lihassoluihin. Lihassoluissa toukat kehittyvät ja kiertyvät spiraalille. Niiden ympärille muodostuu kapseli ja ne ovat tartuntakykyisiä. (6, s. 134.) Kuvassa 1 on lihaskudokseen asettunut *T. spiralis*. Kapseloitunut toukka voi säilyä tartuntakykyisenä useita vuosia. Jotkut lajit selviävät hengissä jopa pakastamisesta. (4.)



KUVA 1. *Trichinella spiralis* lihaskudoksessa (5)



## 2.2 Trikinelloosi

Trikinellan aiheuttamaa tautia kutsutaan trikinelloosiksi (1). Trikinelloosi, vanhahtavasti trikinoosi, on lihaa syövien eläinten tauti ja se voi tarttua myös ihmiseen. Trikinelloosia esiintyy koti- ja villieläimillä, maa- ja merinisäkkäillä sekä linnuilla ja matelijoilla. (2.)

Ihmisillä yleisin taudin aiheuttaja on *T. spiralis*. Infektio saadaan yleensä eläviä toukkia sisältävästä sian tai villieläinten kuten karhun ja villisian lihasta. (7, s. 221–222.) Toukat eivät kestä kuumennusta, joten infektoituneen lihan kypsentyminen kauttaaltaan 77 °C lämpötilaan tekee siitä turvallista. Kuolleet toukat ovat vaarattomia. (6, s. 135.)

### 2.2.1 Oireet

Trikinelloosin oireiden voimakkuus riippuu toukkien lajista ja määrästä. Myös potilaan ikä ja immuunivaste vaikuttavat taudin ilmenemiseen. Ensimmäiset oireet ilmestyvät yleensä 24–48 tunnin kuluessa tartunnasta, kun toukat ovat asettuneet ohutsuoleen. Silloin saattaa ilmetä vatsakipua, oksentelua ja ripulia. (4.)

Noin 7 päivää tartunnan jälkeen saattaa esiintyä turvotusta silmien ympärillä, kuumetta, lihaskipua, sidekalvon tulehdusta sekä ihottumaa. Oireet aiheutuvat vastasyntyneiden toukkien vaelluksesta lihaksiin ja saattavat kestää neljästä kahdeksaan viikkoa. Toukkien kapseloituessa voi ilmetä lihasten heikkoutta sekä kipuilua. Kun toukat ovat kapseloituneet, oireet yleensä katoavat. (4.)

Joissain tapauksissa voi ilmetä komplikaatioita hermostossa tai verenkiertoelimissä. Oireina voi olla päänsärkyä, huimausta, apatiaa, rintakipua tai rytmihäiriöitä. Vanhuksilla tämä voi johtaa jopa kuolemaan. (4.)

### 2.2.2 Diagnoosi

Ihmisillä trikinelloosi diagnosoidaan verestä taudin lihasvaiheessa. Tyypillinen, mutta ei spesifi, merkki trikinelloosista on veren eosinofiilipitoisuuden kasvu. (7, s. 222.) Eosinofiilit ovat valkosoluja, jotka inaktivoivat tulehdusvälittäjiä sekä hävittävät kehosta antigeeni-vasta-aine -komplekseja (8).

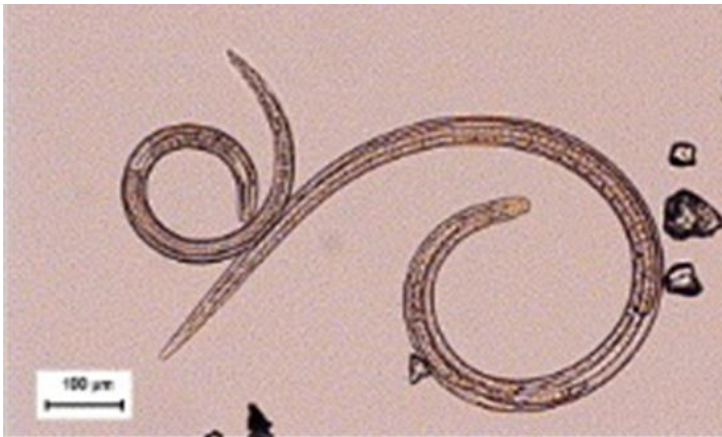
Trikinelloosi voidaan todeta potilaan seerumin vasta-aineista (7, s. 222) tai lihaksesta otetusta koepalasta. Koepalaa voidaan tarkastella mikroskoopilla, tai siitä voidaan tehdä PCR-määritys. PCR on herkkä ja spesifinen menetelmä ja sillä voidaan havaita myös pieniä määriä toukkia. (5.)

Eläimillä trikinelloosi todetaan vasta eläimen kuoltua. Lihantarkastuksessa käytetään digestiomenetelmää. Vaikka eläinten trikinelloosia ei yleensä hoideta, toukat ovat herkkiä useille matolääkkeille. (3, s. 324–325.) Lääkkeen antaminen infektion varhaisessa vaiheessa vähentää merkittävästi toukkien määrää, mutta diagnoosin tekeminen tarpeeksi ajoissa on epätodennäköistä (5). Kapseloituneet toukat ovat melko lailla lääkkeiden ulottumattomissa (9).

### 3 TRIKINELLOJEN LAJINTUNNISTUS

Trikinellalajeja ei voi erottaa toisistaan ulkoisten piirteiden perusteella lukuun ottamatta *Trichinella pseudospiralis* -lajia, jonka toukka on muita lajeja pienempi (10, s. 246), joten niiden tunnistamiseksi on kehitetty erilaisia biokemiallisia menetelmiä. Kuvassa 2 näkyy *T. spiralis* - ja *T. pseudospiralis* -toukkien kokoero. Lajintunnistus voidaan suorittaa käyttämällä isoentsyymejä, radioaktiivisesti leimattuja DNA-hybridisaatio-koettimia, Restriction fragment length polymorphism - tekniikkaa eli RFLP-tekniikkaa tai vasta-aineita. (11, s. 1860–1861.) RFLP-tekniikassa DNA pilkotaan restriktioentsyymeillä erikokoisiksi fragmenteiksi ja toukan laji määritetään fragmenttien määrän ja koon perusteella (12).

Yllä mainitut testit ovat käyttökelpoisia trikinellojen lajinmäärityksessä, mutta niiden suorittamisessa käytetään vaarallisia aineita, ne vaativat paljon työvoimaa tai tarvittavat näytemäärät ovat suuria. Sen vuoksi on myös kehitetty PCR-reaktioon eli polymeerasiketjureaktioon perustuvia testejä. Niissä laji tunnustetaan joko spesifisten tai random amplified polymorphic DNA eli RAPD-alukkeiden avulla (11, s. 1861.)

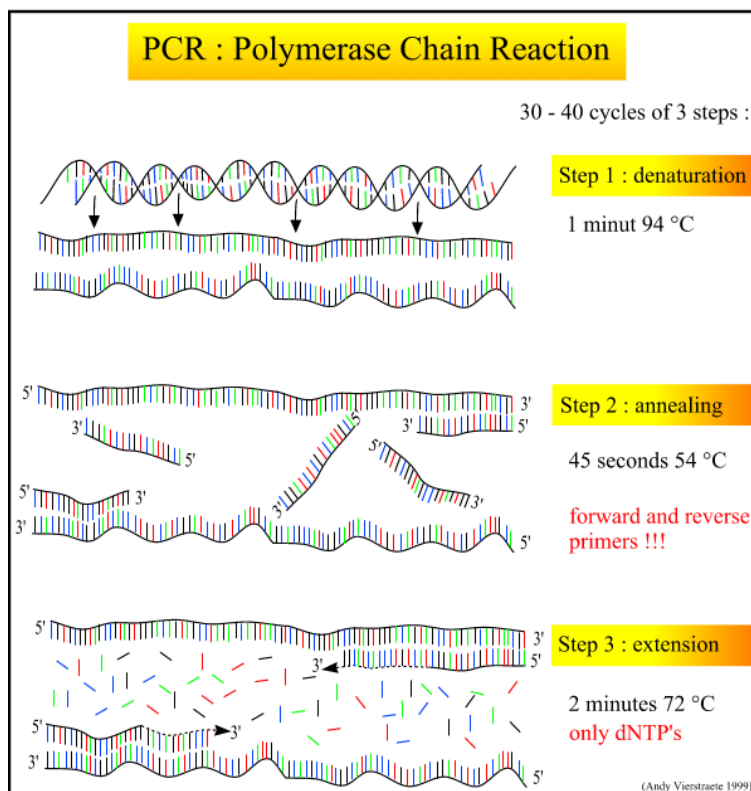


KUVA 2. *Trichinella spiralis* (suurempi) ja *T. pseudospiralis* (pienempi) -toukkien kokoero (13, s. 366)

### 3.1 PCR-menetelmän periaate

PCR on molekyylibiologinen menetelmä, jonka avulla voidaan monistaa DNA-fragmentteja, joiden alku- ja loppuosien nukleiinihappojärjestykset tiedetään. Jos tutkittavalla genotyypillä on jokin tunnettu DNA-jakso, voidaan valita aluke eli oligonukleotidipari, joka mahdollistaa tämän DNA-jakson monistamisen. PCR-reaktio on hyvin herkkä ja spesifinen. (14, s. 2.)

PCR-reaktio koostuu kolmesta päävaiheesta, joita toistetaan useita kertoja. Ensimmäisessä vaiheessa lämpötila nostetaan niin korkeaksi, että DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan ja alukkeet kiinnittyvät DNA-juosteisiin. Kolmannessa vaiheessa polymeerasientsyymi rakentaa yksinauhaisille DNA-fragmenteille vastinjuosteet. (15.) Kuvassa 3 on PCR-reaktion eri vaiheet.



KUVA 3. PCR-reaktion vaiheet (15)

PCR-reaktioon perustuvassa RAPD-menetelmässä käytettyjen alukkeiden avulla voidaan määrittää tunnetut trikinellalajit. Menetelmä soveltuu yksittäisten toukkien lajinmäärittämiseen. (11, s. 1861.) Toisin kuin perinteinen PCR-menetelmä, RAPD-menetelmä ei vaadi monistettavan DNA:n tarkkaa tuntemusta. Kohde-DNA:n monistuminen riippuu alukkeita vastaavien sekvenssien etäisyydestä toisiinsa ja sijoittumisesta DNA:lla. (16.) RAPD-menetelmässä näyttemateriaalin kunto vaikuttaa jonkin verran tulokseen ja mittauksen uusittavuuteen (17, s. 39–40).

### **3.2 Multiplex-PCR**

Genotyypille spesifisiin alukkeisiin perustuvat menetelmät ovat tarkkoja, mutta niitä voidaan käyttää vain yhden lajin tunnistamiseen. Tämän vuoksi on kehitetty menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää kaikki tunnetut trikinellalajit yhdellä kertaa. Tätä menetelmää kutsutaan multiplex-PCR-reaktioksi. (11, s. 1861.)

Multiplex-PCR-reaktiossa käytetään kahta tai useampaa oligonukleotidiparia, mikä mahdollistaa useampien DNA-sekvenssien monistamisen samanaikaisesti. Trikinellojen lajintunnistuksessa käytetään viittä oligonukleotidiparia, joiden avulla voidaan monistaa kaikkia eri trikinellalajeille ominaisia DNA-jaksoja. (14, s. 2.) Multiplex-PCR mahdollistaa nopeamman ja helpomman lajintunnistuksen RAPD-PCR-menetelmään verrattuna (17, s. 41).

### **3.3 Sekainfektioiden lajintunnistus**

Samassa isäntäeläimessä voi esiintyä useammankin kuin yhden trikinellalajin toukkia (18, s. 645). Suomessa tällaisia sekainfektioita esiintyy yleisimmin supikoirissa ja ketuissa (17, s. 42). Supikoira, kettu ja ilves ovat tähän mennessä ainoat eläinlajit, joista on löydetty kaikkien neljän Suomessa esiintyvän trikinellalajin toukkia (19, s. 72).

Suomesta ei ole tähän päivään mennessä löytynyt useamman kuin kahden lajin sekainfektioita. Vuosien 1999–2005 välisenä aikana Suomesta kerättyjen näytteiden perusteella voidaan todeta, että yleisin yhdistelmä on *T. nativa* ja *T. britovi*. Toiseksi yleisin yhdistelmä on *T. nativa* ja *T. spiralis*. Kaikkia muitakin Suomessa esiintyvien lajien yhdistelmiä on löydetty. (19, s. 71.)

Sekainfektioita tutkittaessa laji tunnistetaan yleensä yksittäisistä toukista. Jos näytteessä on eri määrät eri lajin toukkia, PCR-reaktiossa saattaa esiintyä kilpailua alukkeista. (18, s. 645.) Tästä huolimatta sekainfektioita on jonkin verran tutkittu myös useamman toukan yhteisnäytteistä multiplex-PCR-menetelmällä (20).

Espanjassa vuonna 2007 tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että kymmenen toukan yhteisnäytteestä voitiin PCR-reaktion jälkeen havaita *Trichinella spiralis* - ja *T. britovi* -lajien DNA-sekvenssit. Tutkimuksesta ei käy ilmi, montako toukkaa kummastakin lajista näytteessä oli. (20.)

### **3.4 Sekainfektion syntyminen**

Sekainfektio voidaan saada kahdella tavalla: joko peräkkäisistä eri trikinellalajien infektiosta tai samanaikaisesti lihasta, jossa on useamman lajin toukkia. Peräkkäisissä infektioiden isäntäeläimen immuunipuolustus saattaa joissain tapauksissa estää sekainfektion syntymisen. (10, s. 246.)

Immunitetti toista infektiota kohtaan riippuu isäntäeläimestä ja ensimmäisen infektion aiheuttaneesta trikinellalajista. Hiirillä *T. spiralis* -infektio inhiboi *T. nativa* ja *T. pseudospiralis* -infektioiden syntymistä, mutta samaa ei tapahdu toisinpäin. (10, s. 246; 13, s. 367.) Näissäkin tapauksissa sekainfektio saattaa syntyä, jos peräkkäiset infektiot saadaan lyhyellä aikavälillä, eikä isäntäeläimen immuunivaste toista infektiota kohtaan ole ehtinyt kehittyä (20).

### 3.5 Lajintunnistuksen tärkeys

Trikinellatoukkien lajintunnistus on tärkeää, jotta voitaisiin määrittää infektion alkuperä ja sen vaikutus kansanterveydelle (18, s. 642). Lajintunnistuksen myötä saadaan tietoa eri trikinellalajien epidemiologiasta ja tämän tiedon avulla voidaan suojella ihmisten terveyttä (21).

Etelä-Suomessa esiintyy kaikkia neljää trikinellalajia, mutta pohjoisesta on löydetty ainoastaan *T. nativa* ja *T. spiralis* -lajien toukkia. Jotkut lajit saattavat menestyä toisia paremmin eri isäntäeläimillä. Esimerkiksi *T. britovi* -lajin toukkia on löydetty eniten ilveksistä, kun taas *T. spiralis* -lajin toukkia on löydetty eniten supikoirista. *T. nativa* on kuitenkin yleisimmin tavattu laji kaikissa Suomen villieläimissä. (19, s. 71–74.)

Taulukossa 1 trikinellalajit on jaettu kahteen ryhmään: kapseloituviin ja kapseloitumattomiin. Kapseloituvat lajit muodostavat paksun kollageenikalvon parasiitin sisältämän lihassolun ympärille (22, s. 735), kun taas kapseloitumattomilla lajeilla tätä kalvoa ei ole (9). Kapseloituvat lajit pystyvät infektoimaan ainoastaan nisäkkäitä, mutta kapseloitumattomat lajit pystyvät nisäkkäiden lisäksi infektoimaan myös lintuja ja matelijoita (22, s. 7354).

Trikinellalajeja on taulukossa 1 lueteltujen lisäksi tunnistettu 3 genotyyppiä, *Trichinella* T6, T8 ja T9 (23). *Trichinella* T6 ja *T. nativa* ovat keskenään hyvin samankaltaisia, ja ne pystyvät lisääntymään myös keskenään. Näiden kahden genotyypin hybridejä on löydetty Alaskassa elävistä susista. (10, s. 245–246.)

## 4 SEKAINFEKTIOIDEN TUTKIMINEN

Työn tarkoitus oli valmistaa trikinellatoukista erilaisia sekainfektioita ja tutkia niitä multiplex-PCR-reaktiolla. Tarkoitus oli tutkia, voidaanko havaita yksi toukka useamman erilajisen toukan seasta. Työssä tutkittiin menetelmän herkkyyttä ja etsittiin rajoja, joiden jälkeen erilaista toukkaa ei voitu enää havaita yhteisnäytteestä.

Työ koostui useasta eri vaiheesta: toukkien eristämisestä koe-eläimen lihasta, toukan DNA:n eristämisestä, DNA-sekvenssien monistamisesta multiplex-PCR-reaktiolla sekä niiden havaitsemisesta agaroosigeelielektroforeesilla.

### 4.1 Trikinellojen eristäminen

Toukat eristettiin hiirten lihaskudoksesta digestiomenetelmällä. Digestio perustui lihaskudoksen sulamiseen toukan ympäriltä. Hiirille oli syötetty trikinellatoukkia, jokaiselle eri lajia. Jokainen näyte käsiteltiin omilla työvälineillä, etteivät lajit päässeet sekoittumaan keskenään. Liitteessä 1 on lueteltu työssä käytetyt välineet ja liitteessä 2 on työssä tarvittavat reagenssit.

Työssä käytettiin vain Suomessa esiintyviä trikinellalajeja. Taulukossa 2 on esitetty käytetyt lajit ja niiden lyhenteet. Jatkossa lajien nimityksistä käytetään niiden lyhenteitä.

TAULUKKO 2. Trikinellalajit ja niillä infektoidut hiiret

Laji	Lyhenne	Koodi	Infektoitu	Lopetettu
<i>Trichinella spiralis</i>	T1			9.8.2012
<i>Trichinella nativa</i>	T2	2743	29.6.2010	4.8.2010
<i>Trichinella britovi</i>	T3	ISS 002	15.2.2011	15.12.2011
<i>Trichinella pseudospiralis</i>	T4	ISS 013		15.1.2008



#### 4.1.1 Stomacher-digestiomenetelmä

Työssä käytettävät hiiret olivat valmiiksi nyljettyjä ja niiden sisälmykset oli poistettu. Aluksi hiirestä leikattiin lihaa niin paljon kuin sai välttämättä luiden joutumista näytteen sekaan. Lihan seassa olevat luunkappaleet saattaisivat hajottaa Stomacher-pussin.

Lihat leikeltiin pieniksi paloiksi saksilla ja laitettiin Stomacher-pussiin. Lihan sekaan kaadettiin 300 ml vettä, 5 ml 17,5 %:sta HCl-liuosta ja 1,2 g pepsiiniä. Tämän jälkeen pussi laitettiin Stomacher-homogenisaattoriin noin 40 °C:n lämpötilaan 40 minuutiksi, jolloin toukat vapautuivat lihaskudoksesta.

Stomacher-käsittelyn jälkeen pussiin lisättiin jäämurskaa ja liuos kaadettiin sihdin läpi erotussuppiloon. Erotussuppilo oli statiivissa, jonka kyljessä oli ajastimella toimiva tärstin. Tärstin oli vuorotellen päällä ja pois päältä 30 s kerralla. Liuoksen annettiin seistä erotussuppilossa 30 min ajan, jolloin toukat painuivat suppilon pohjalle.

Toukkien laskeuduttua suppilon pohjalle liuosta valutettiin mittalasiin noin 50 ml:a. Trikinellat painuivat mittalasin pohjalle 10 minuutin kuluessa. Tässä vaiheessa liuos oli sameaa, joten sitä jouduttiin laimentamaan. Supernatanttia imettiin pinnasta ruiskulla, kunnes pohjalle jäi 10–20 ml liuosta. Mittalasi täytettiin vedellä ja annettiin toukkien painua lasin pohjalle. Laimennusta jatkettiin, kunnes liuos oli lähes kirkasta.

Supernatantti poistettiin ruiskulla ja pohjalle jätettiin 10–20 ml liuosta. Tämä toukat sisältävä liuos kaadettiin petrimaljalle mikroskooppista tarkastelua varten. Mittalasi huuhdeltiin 10 ml:lla vettä ja vesi kaadettiin samalle petrimaljalle.

Mikroskoopilla katsottaessa toukat näkyivät maljan pohjalla spiraalille kiertyneinä kuvan 2 osoittamalla tavalla. Toukat kerättiin pipetillä muovisiin putkiin ja putket täytettiin alkoholilla. Toukkia säilytettiin kylmähuoneessa.

#### **4.1.2 Magneettisekoitin-digestiomenetelmä**

T3-lajin toukkia oli hiiressä niin vähän, ettei niiden eristys Stomacher-digestiomenetelmällä onnistunut. Tämän vuoksi kokeiltiin myös magneettisekoitinmenetelmää. Tässä menetelmässä voitiin käyttää nyljettyä hiirtä kokonaisuena, jolloin saatiin kaikki lihat talteen.

Aluksi hiiri leikeltiin saksilla palasiksi ja jauhettiin teholeikkurilla mahdollisimman hyvin. Lihasmassa siirrettiin 2 l:n dekantterilasiin, jonka pohjalla oli magneetti. Dekantteriin lisättiin 1 l vettä, jonka lämpötila oli +47 °C, 8 ml 25 %:sta HCl-liuosta sekä 5 g pepsiiniä. Liuosta sekoitettiin magneettisekoittimella siten, että seoksen keskelle muodostui syvä pyörre. Lämpötila säädettiin 47 °C:seen ja dekantterin ympärille käärittiin alumiinifolio, jotta lämpötila pysyisi tasaisena.

Sekoitusta jatkettiin 30 minuutin ajan, jolloin toukat vapautuivat lihaskudoksesta. Sen jälkeen seos kaadettiin siivilän läpi erotussuppiloon. Työtä jatkettiin Stomacher-digestiomenetelmän ohjeen mukaan.

#### **4.2 Lajinmääritys**

Eristettyjen toukkien laji määritettiin multiplex-PCR-reaktiolla. Lajinmääritys tehtiin yksittäisille toukille. Ennen PCR-reaktiota toukka hajotettiin ja sen DNA eristettiin. Työskentely tapahtui laminaarivirtauskaapissa.

Etanolissa säilytettyjä toukkia otettiin petrimaljalle ja tarkasteltiin mikroskoopilla. Jokaisesta näytteestä kerättiin yksi toukka 1,5 ml:n eppendorf-putkeen pipetin avulla. Tarkistettiin vielä mikroskoopilla, että toukka oli putken pohjalla, sillä toukat jäivät helposti pipetinkärkeen.

##### **4.2.1 DNA:n eristys**

DNA:n eristyksessä käytettiin kittiä. Aluksi valmistettiin tarvittavat määrät inkubointipuskuria IB+ ja lyysipuskuria LB+ liitteessä 3 olevien ohjeiden mukaan. Näytetoukkia sisältäviä putkia sentrifugoitiin muutaman sekunnin ajan, jotta toukat painuisivat putkien pohjalle.

Jokaiseen putkeen lisättiin 20 µl IB+ -liuosta ja inkuboitiin +55 °C:n lämpötilassa, kunnes toukat olivat hajonneet. IB+ -liuoksen sisältämä proteinaasi K -entsyymi hajotti toukassa olevat proteiinit. Hajoamista tehostettiin ajoittaisella vorteksoinnilla ja hajoaminen tarkistettiin mikroskoopilla. Yksittäisten toukkien hajoaminen kesti noin kaksi tuntia.

Toukan hajottua näyte sentrifugoitiin putken pohjalle ja jokaiseen putkeen lisättiin 40 µl LB+ -liuosta ja 4 µl magneettihartsia. Suspensiota sekoitettiin vorteksoimalla, minkä jälkeen seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Inkuboinnin aikana DNA kiinnittyi magneettihartsiin.

Näyteputket siirrettiin magneettierotustelineeseen, jolloin magneettihartsi kiinnittyi putken seinään. Kiinnittyminen tapahtui lähes välittömästi. Sen jälkeen supernatantti imettiin pipetillä pois varovasti, ettei magneettihartsi irtoaisi putken seinästä. Jos näin kuitenkin tapahtui, näytettä sekoitettiin vorteksoimalla ja asetettiin uudestaan magneettierotustelineeseen. Tämän jälkeen putkeen lisättiin 100 µl LB+ -liuosta. Näytettä sekoitettiin vorteksoimalla ja asetettiin takaisin magneettierotustelineeseen, jolloin supernatantti voitiin poistaa pipetillä.

Näyte pestiin lisäämällä putkeen 100 µl pesupuskuria. Putkea sekoitettiin vorteksoimalla, minkä jälkeen näyte laitettiin takaisin magneettierotustelineeseen ja supernatantti imettiin pois. Pesu toistettiin yhteensä kolme kertaa, minkä jälkeen putkesta jätettiin korkki auki ja annettiin magneettipartikkeleiden kuivua huoneenlämmössä 10 minuuttia.

DNA irrotettiin magneettihartsista lisäämällä 50 µl eluointipuskuria. Näytettä sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin 5 minuuttia +65 °C:n lämpötilassa. Kuuma näyte asetettiin magneettierotustelineeseen ja DNA:ta sisältävä supernatantti otettiin talteen liuoksen ollessa vielä lämmin.

#### 4.2.2 PCR-reaktio

PCR-reaktiota varten näytteeksi otettiin 10 µl eristettyä DNA:ta eluointiliuoksessa. Näytteiden lisäksi jokaiseen PCR-ajoon valmistettiin negatiivinen kontrolli, jossa näytteen tilalla käytettiin nukleasivapaata vettä. Positiivista kontrollia ei yleensä käytetty, koska toukkien lajit tiedettiin. Näytteitä säilytettiin jäissä koko valmistelun ajan. Näytteille valmistettiin reaktioseos liitteessä 3 olevan ohjeen mukaan.

Reaktioseosta valmistettiin näytteiden lukumäärän mukaan ja sitä pipetoitiin 20 µl jokaiseen näytteeseen ja negatiiviseen kontrolliin. Reaktion kokonaistilavuus oli 30 µl. Loppukonsentraatiot seoksessa olivat 0,2 µM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 U Taq-polymeraasia ja 0,4 µM alukkeita. Taulukkoon 3 on lueteltu työssä käytetyt alukkeet.

*TAULUKKO 3. Seos B:n sisältämien oligonukleotidien sekvenssit, koodit ja monistamat alueet*

Oligonukleotidisekvenssit	Koodi	Monistettava sekvenssi
5'-GTT CCA TGT GAA CAG CAG T-3' 5'-CGA AAA CAT ACG ACA ACT GC-3'	IF IR	ESV
5'-GCT ACA TCC TTT TGA TCT GTT-3' 5'-AGA CAC AAT ATC AAC CAC AGT ACA-3'	IIF IIR	ITS1
5'-GCG GAA GGA TCA TTA TCG TGT A-3' 5'-TGG ATT ACA AAG AAA ACC ATC ACT-3'	IIIF IIIR	ITS1
5'-GTG AGC GTA ATA AAG GTG CAG-3' 5'-TTC ATC ACA CAT CTT CCA CTA-3'	IVF IVR	ITS2
5'-CAA TTG AAA ACC GCT TAG CGT GTT T-3' 5'-TGA TCT GAG GTC GAC ATT TCC-3'	VF VR	ITS2

Taulukossa 4 on työssä käytetyn PCR-reaktion lämpötilat ja ajat. Reaktion vaiheita 2–4 toistettiin 35 kertaa. Vaiheessa 2 tapahtui DNA:n denaturaatio, jolloin DNA:n vastinjuosteet irtosivat toisistaan. Vaiheessa 3 alukkeet kiinnittyivät yksi-juosteisiin DNA-fragmentteihin ja vaiheessa 4 Taq-polymeraasi rakensi alukkeista uudet vastinjuosteet. PCR-ohjelman vaiheet 1–5 kestivät yhteensä 72 minuuttia.

#### TAULUKKO 4. PCR-ohjelma

Vaihe	Lämpötila	Aika
1	95 °C	4 min
2	95 °C	10 s
3	55 °C	30 s
4	72 °C	30 s
5	72 °C	3 min
6	4 °C	(1 h)

#### 4.2.3 Elektroforeesi

PCR-reaktion onnistuminen ja tulokset todettiin agarosigeelielektroforeesilla. Geeliä varten punnittiin 1 g agarosia, joka liuotettiin 50 ml:aan 0,5x TBE-puskuria. Liuotus tapahtui mikroaaltouunissa kuumentamalla. Kuumennuksen jälkeen liuokseen lisättiin 5 µl Gel Red -väriainetta ja sekoitettiin varovasti. Lopuksi liuos kaadettiin ajokelkkaan ja lisättiin kampa, jolla saatiin tehtyä kaivot näytteitä varten. Geelin annettiin hyytyä tasaisella alustalla huoneenlämmössä puolen tunnin ajan.

Ajokelkka ja hyytynyt geeli laitettiin ajolaitteeseen ja peitettiin 0,5x TBE-puskurilla. Näytteisiin lisättiin 5 µl 6x Loading Dye -liuosta ja sekoitettiin. Näytteitä pipetoitiin geelin kaivoihin 10 µl ja yhteen kaivoon pipetoitiin 5 µl molekyyli-painomarkkeria. Geeliä ajettiin 75 V:lla noin tunnin ajan. Elektroforeesin jälkeen geelin tarkasteussa käytettiin UV-transluminaattoria ja digitaalista kuvantamislaitetta.

Trikinellojen laji määritettiin sen perusteella, minkä kokoisia fragmentteja geelillä ajetuista näytteistä havaittiin. Fragmentteja verrattiin liitteessä 4 olevaan molekyyli-painomarkkeriin. Taulukossa 5 on lueteltu työssä tutkittavien toukkien PCR-tuotteiden molekyyli-painot.

*TAULUKKO 5. Trikinelloista eristettyjen DNA-fragmenttien molekyylipainot*

Laji	Tuote
T1	173 bp
T2	127 bp
T3	127 bp ja 253 bp
T4	310 bp - 350 bp

### **4.3 Sekainfektiot**

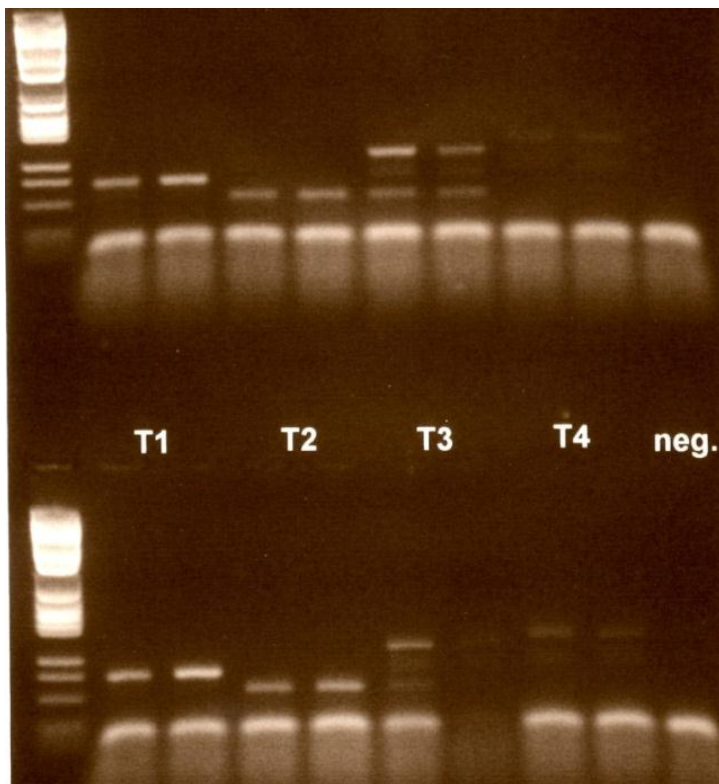
Kun toukkien lajit oli varmistettu, tehtiin niistä erilaisia sekainfektioita. Sekainfektiot valmistettiin ottamalla samaan putkeen useamman eri lajin toukkia. Näytteen DNA eristettiin, suoritettiin PCR-ajo sekä elektroforeesi kuten yksittäisille toukille.

Sekainfektioiden käsittelyssä käytettiin samoja reagenssimääriä kuin yksittäisiä toukkia käsiteltäessä. Toukkia hajotettaessa inkubointiaikaa pidennettiin parista tunnista noin 16 tuntiin, jotta proteinaasi K ehtisi hajottaa kaikki näytteessä olevat proteiinit, jotka saattavat vaikeuttaa DNA:n puhdistusta.

## 5 TULOKSET

Työssä tehtiin sekainfektioita seitsemässä erässä. Sekainfektioita valmistettiin yhteensä 54 erilaista. Kuvassa 4 on jokaisen työssä käytetyn trikinellalajin PCR-tuotteet agarosigeelillä.

T3-lajin kohdalla geelillä pitäisi näkyä vain kaksi vyöhykettä, mutta kuvassa niitä näkyy kolme. Keskimääräinen vyöhyke on ylimääräinen ja se saattaa johtua näytteeseen päätyneestä kontaminaatiosta. Lajit T1, T2 ja T4 tuottavat vain yhden vyöhykkeen. Alimmat, levinneet vyöhykkeet johtuvat PCR-reaktiossa käyttämättömiksi jääneistä alukkeista.



KUVA 4. Trikinellojen DNA-fragmentit agarosigeelillä

## 5.1 Sekainfektiot 1

Aluksi tehtiin viiden toukan sekainfektioita, joissa yksi toukka oli eri lajia kuin muut. Tehtiin myös sellainen sekainfektio, jossa kaikki toukat olivat eri lajia. Taulukossa 6 on lueteltu kaikki ensimmäisen erän sekainfektiot ja niissä käytetyt toukat.

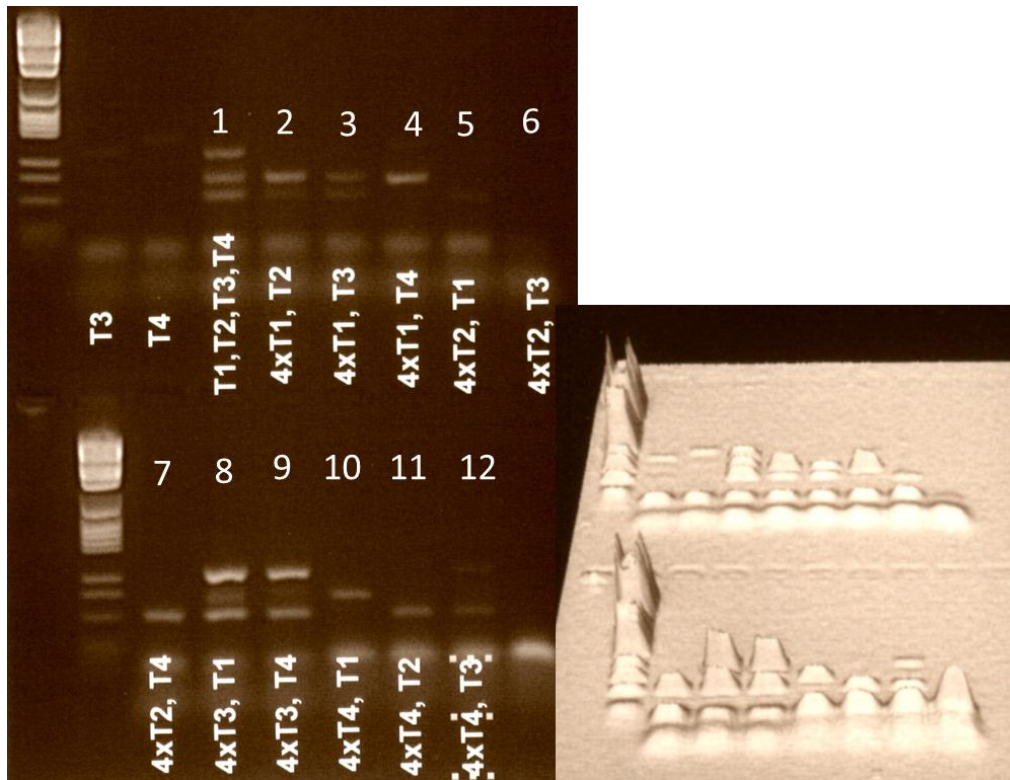
TAULUKKO 6. Sekainfektiot 1

Seka- infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s1	1	1	1	1
s2	4	1		
s3	4		1	
s4	4			1
s5	1	4		
s6		4	1	
s7		4		1
s8	1		4	
s9			4	1
s10	1			4
s11		1		4
s12			1	4

Lajit T2 ja T3 tuottavat saman painoisen tuotteen, joten niistä tehtiin vain yksi sekainfektio. Kuvassa 5 on agaroosigeeli elektroforeesiajon jälkeen. Geelille on sekainfektioiden lisäksi laitettu T3- ja T4-lajien PCR-tuotteet positiivisiksi kontrolloiksi.

Lajien T1, T2 ja T3 PCR-tuotteet näkyvät geelillä lähes jokaisessa sekainfektiossa, mutta lajin T4 PCR-tuote ei erotu missään sekainfektiossa. T4 näkyy ainoastaan 3D-kuvassa yksittäisen toukan eristyksessä. Yksittäisten T3- ja T4-toukkien tuotteet eivät näy juurikaan agaroosigeelillä eikä T3 toukan alempi vyöhyke näy juurikaan edes 3D-kuvassa. Tämä saattaa johtua toukan epätäydellisestä hajoamisesta, epäonnistuneesta DNA:n eristyksestä tai PCR-reaktiosta tai jossain vaiheessa työtä sattuneesta pipetoimisvirheestä.





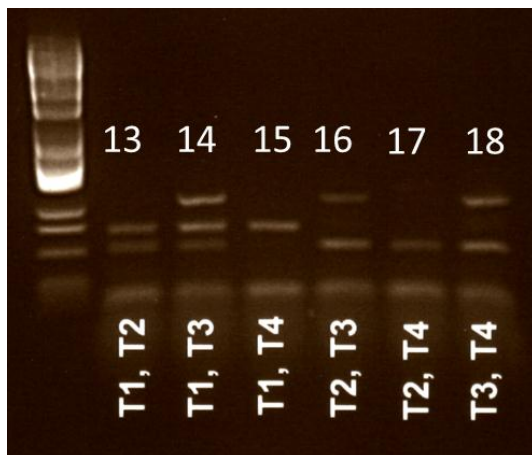
KUVA 5. Sekainfektiot 1. Vasemmalla kuva agaroosigeelistä ja oikealla 3D-kuva samasta geelistä.

## 5.2 Sekainfektiot 2

Koska elektroforeesin jälkeen geelillä ei näkynyt kaikkia vyöhykkeitä, tehtiin uudet sekainfektiot. Tällä kertaa otettiin vain 2 toukkaa yhteen putkeen. Taulukossa 7 on lueteltu toisen erän sekainfektiot ja kuvassa 6 on sekainfektioiden PCR-tuotteet agaroosigeelillä.

TAULUKKO 7. Sekainfektiot 2

Seka- infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s13	1	1		
s14	1		1	
s15	1			1
s16		1	1	
s17		1		1
s18			1	1



*KUVA 6. Sekainfektiot 2*

Lajit T1, T2 ja T3 näkyvät hyvin sekainfektioissa, joissa toukkien suhde on 1:1. Koska lajeilla T2 ja T3 on samanpainoinen PCR-tuote, ei näytteessä 16 näy kuin kaksi vyöhykettä, joista alempi on hieman kirkkaampi. T4 ei erottunut näisäkään sekainfektioissa.

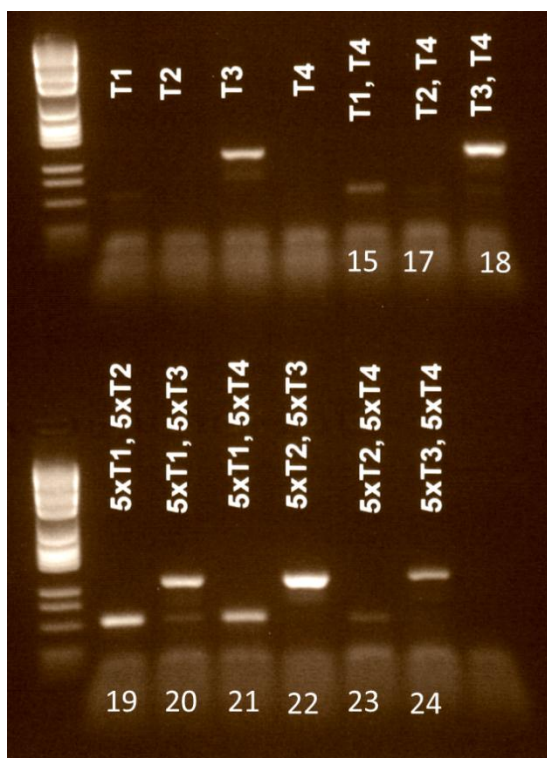
T4-lajin tuote ei ole ehkä monistunut PCR-reaktiossa eikä siksi näy geelillä. Tämän vuoksi tehtiin uusi alukeseos seos B. Seokseen pipetoitiin kaikkia taulukossa 3 olevia alukkeita 10 µl, jolloin saatiin 100 µl alukeseosta. Seos jaettiin neljään putkeen ja pakastettiin.

### 5.3 Sekainfektiot 3

Taulukossa 8 oleviin sekainfektioihin kokeiltiin uutta alukeseosta. Kolmannen erän sekainfektioissa toukkia oli samassa suhteessa kuin toisessakin erässä. Ainoastaan toukkien lukumäärät olivat suuremmat. Alukeseoksen toimivuutta kokeiltiin lisäksi jokaisesta lajista eristettyyn DNA:han ja kolmeen toisen erän sekainfektioon, jotka sisälsivät T4-lajin toukkia. Kuvassa 7 on kolmannen erän sekainfektiot.

### TAULUKKO 8. Sekainfektiot 3

Seka- infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s19	5	5		
s20	5		5	
s21	5			5
s22		5	5	
s23		5		5
s24			5	5



KUVA 7. Yläriivi: trikinellalajit ja T4-toukkia sisältäviä sekainfektioita; alarivi: sekainfektiot 3

Uudella alukeseoksella ei ollut vaikutusta tuloksiin, vaan T4-toukkien fragmentit jäivät edelleen monistumatta PCR-reaktiossa. Myöskään T1-lajin tuotetta ei näy kuin muutaman näytteen kohdalla. Näytteessä 21 näkyy vain yksi vyöhyke ja sekin on väärällä kohdalla. Näyte on todennäköisesti sekoittunut jonkun toisen näytteen kanssa.

Seuraava eristys tehtiin pelkästään T4-lajin toukille. Toukkia otettiin eri määrät näyteputkiin ja testattiin uuden ja vanhan alukeseoksen toimivuutta. Kuvassa 8 näkyy, ettei uusi alukeseos toiminut, sillä geelillä ei näy T4-toukkien PCR-tuotteita eikä alukkeita. Näytteissä, joissa käytettiin vanhaa alukeseosta, näkyvät alukkeet, mutta vain kymmenen toukan yhteisnäytteessä näkyy T4-toukan DNA-sekvenssi. Vanha alukeseos oli siis toimiva, joten seuraavaksi kokeiltiin muokata DNA:n eristys -menetelmää.



*KUVA 8. Alukeseosten vertailua T4-lajin toukilla. Näytteissä käytettyjen toukkien lukumäärä on ilmoitettu kuvan alareunassa.*

#### **5.4 Sekainfektiot 4**

Seuraavaksi valmistettiin taulukossa 9 olevat sekainfektiot. Tällä kertaa muutettiin toukkien lukumäärien suhteeksi 2:1. Samalla kokeiltiin, näkykö T2 ja T3 -lajien yhteisnäytteessä eroja vyöhykkeiden kirkkaudessa, jos toista lajia on näytteessä enemmän.

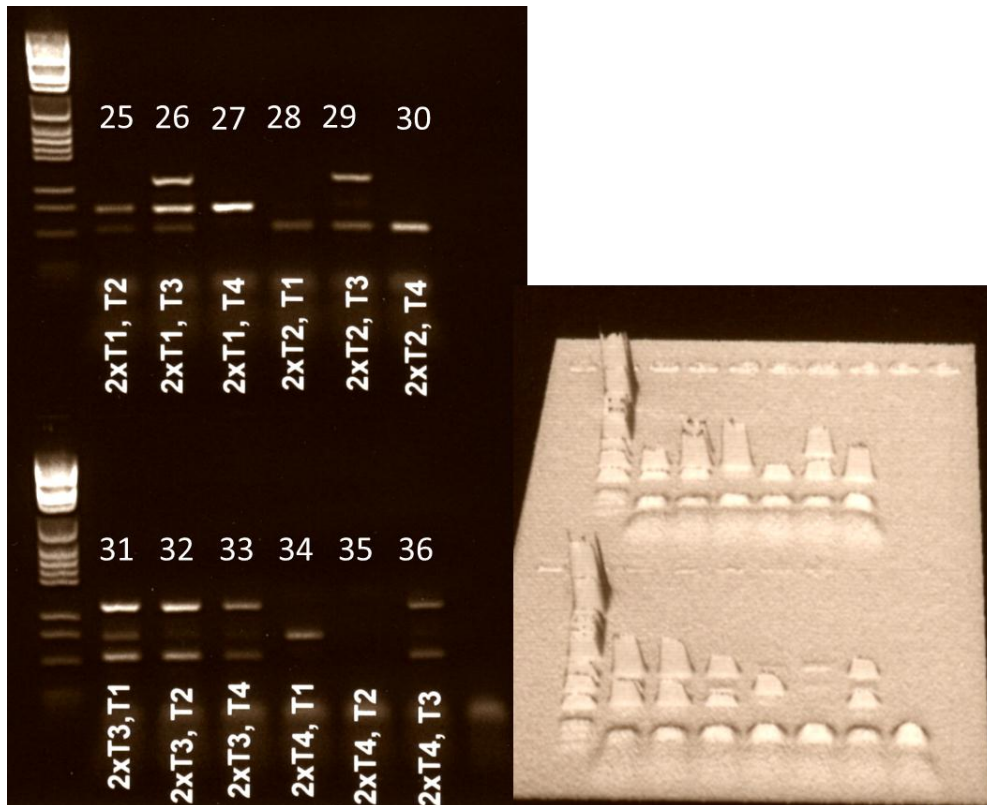
Koska näytteeseen eristyksen jälkeen mahdollisesti jääneet proteiinit kilpailevat DNA:n kanssa magneettihartsin sitoutumiskohdista, lisättiin magneettihartsin määrää 7 µl:aan. PCR-reaktiossa käytettiin vanhaa alukeseosta.

TAULUKKO 9. Sekainfektiot 4

Seka- infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s25	2	1		
s26	2		1	
s27	2			1
s28	1	2		
s29		2	1	
s30		2		1
s31	1		2	
s32		1	2	
s33			2	1
s34	1			2
s35		1		2
s36			1	2

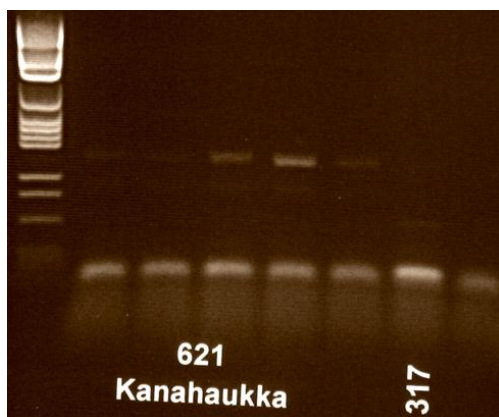
Kuvassa 9 on agarosigeeli elektroforeesin jälkeen. Tälläkään kertaa geelillä ei näy T4-toukkien PCR-tuotteita. Ainoastaan näytteen 35 kohdalla näkyy 3D-kuvassa T4-lajin vyöhyke, mutta T2-lajin vyöhyke puuttuu. Kuvasta 9 näkyy, että T2 ja T3 -lajien yhteisnäytteissä ylempi vyöhyke on kirkkaampi riippumatta siitä, kumpaa lajia näytteessä on enemmän.

Magneettihartsin lisäämisestä ei ollut hyötyä DNA:n eristyksessä. Ylimääräinen magneettihartsi vaikeutti DNA:n puhdistusta tarttumalla pipetinkärkeen supernatantin poistamisen yhteydessä. Magneettihartsin mukana näytteestä saattoi poistua myös osa DNA:sta.



KUVA 9. Sekainfektiot 4

Seuraavaksi testattiin menetelmän toimivuutta vanhoilla kanahaukasta eristetyillä T4-toukilla. Puhdistuksessa magneettihartsin määrä vähennettiin ohjeenmukaiseen 4 µl:aan. PCR-reaktioon otettiin mukaan myös vanha T4-lajin toukasta eristetty DNA-näyte. Kuvasta 10 näkyy kanahaukasta eristettyjen toukkien PCR-tuotteet himmeästi.



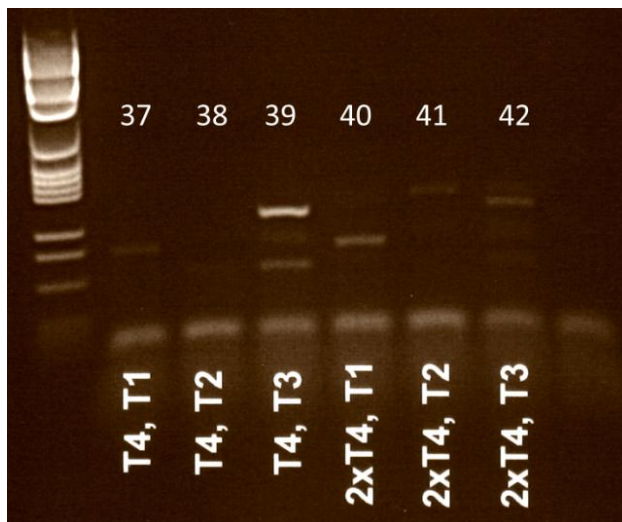
KUVA 10. Kanahaukasta eristetyt T4-toukat sekä valmiiksi eristetty T4 DNA

## 5.5 Sekainfektiot 5

Seuraavat sekainfektiot tehtiin kanahaukasta eristetyistä T4-toukista, koska niiden PCR-tuotteet näkyvät geelillä selvemmin kuin hiirestä eristettyjen T4-toukkien tuotteet. Kanahaukasta eristetyt toukat olivat myös parempikuntoisia kuin hiirestä eristetyt toukat. Tällä kertaa tehtiin vain erilaisia T4-toukkia sisältäviä yhdistelmiä. Taulukkoon 10 on lueteltu viidennen erän sekainfektiot ja kuvassa 11 on PCR-tuotteet agarosigeelillä.

TAULUKKO 10. Sekainfektiot 5

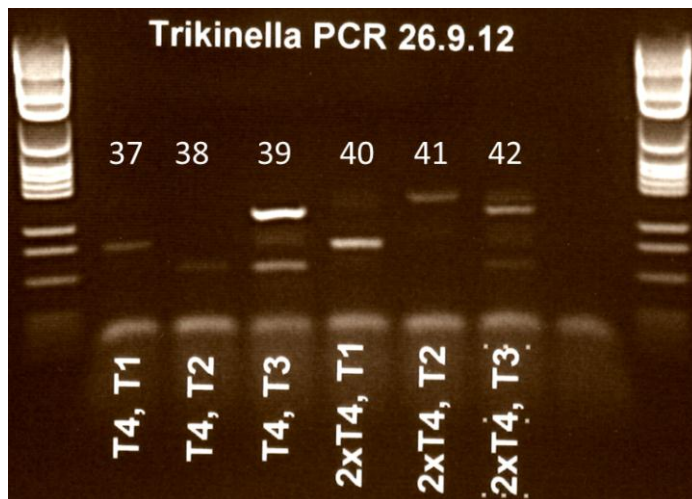
Seka-infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s37	1			1
s38		1		1
s39			1	1
s40	1			2
s41		1		2
s42			1	2



KUVA 11. Sekainfektiot 5: Tehty osin kanahaukasta eristetyistä toukista



T4-toukat eivät edelleenkään näy sekainfektioissa. Näytteessä 41 näkyy T4-vyöhyke, mutta T2 ei näy. Seuraava PCR-ajo tehtiin samoille taulukon 10 näytteille, mutta taulukossa 4 olevaa PCR-ohjelmaa muutettiin pidentämällä vaiheen 4 aikaa kaksinkertaiseksi. T4-lajin monistettava DNA-fragmentti on pidempi kuin muiden lajien DNA-fragmentit, joten se ei välttämättä ehdi monistua lyhemmässä ajassa, jos samassa näytteessä on useamman lajin DNA:ta. Kuvassa 12 ovat uuden PCR-ajon tulokset.



*KUVA 12. Sekainfektiot 5: PCR-reaktiossa käytetty pidempää aikaa*

Tällä kertaa näytteessä 42, jossa T4-toukkia oli enemmän kuin T3-toukkia, näkyy himmeästi sekä T3-, että T4-toukkien vyöhykkeet. Näytteessä 41 ei tälläkään kertaa näy T2 vyöhykettä, joten toukkien hajotus tai DNA:n eristys ei ole tämän näytteen kohdalla täysin onnistunut.

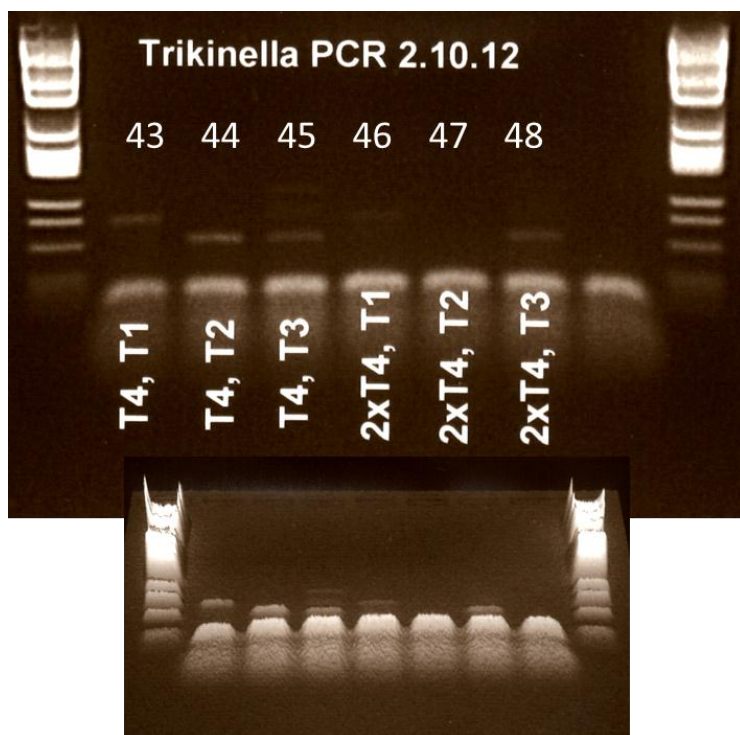
## 5.6 Sekainfektiot 6

Koska kanahaukasta eristetyt toukat loppuivat, kokeiltiin menetelmää samanlaisilla hiirestä eristetyistä T4-toukista valmistetuilla sekainfektioilla. PCR-ajossa käytettiin pidempää aikaa. Nämä sekainfektiot on lueteltu taulukossa 11 ja tulokset ovat kuvassa 13.



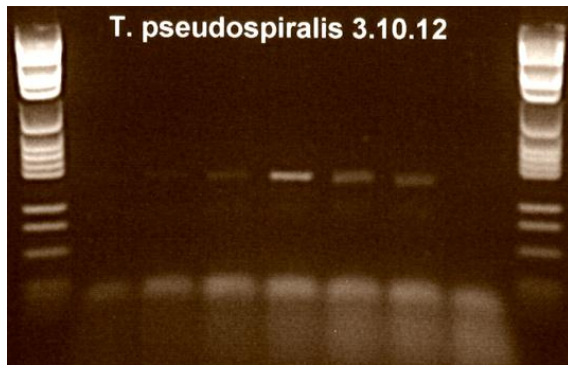
TAULUKKO 11. Sekainfektiot 6

Seka- infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s43	1			1
s44		1		1
s45			1	1
s46	1			2
s47		1		2
s48			1	2



KUVA 13. Sekainfektiot 6

Tälläkään kertaa ei saatu T4-lajin toukkia näkymään geelillä. Myös muut näytteet näkyvät geelillä huonosti. PCR-reaktion toimivuutta kokeiltiin vielä kerran valmiiksi eristetyillä T4 DNA-näytteillä. Tällä kertaa käytettiin T4-vertailunäytteitä. Kuvassa 14 on vertailunäytteiden PCR-tuotteet geelillä.



KUVA 14. T4-vertailunäytteiden DNA-sekvenssit

Geelillä ei näy vyöhykkeitä jokaisen näytteen kohdalla. Tämä voi johtua pipe-toimisvirheestä tai PCR-reaktion epäonnistumisesta. Jos PCR-laitteessa oleva lämpölevy ei lämpiä tasaisesti, osa putkista jää kylmäksi eikä reaktio onnistu. Sama voi tapahtua silloinkin, kun putket ovat levyllä vain toisessa reunassa eikä kansi sulkeudu tiiviisti.

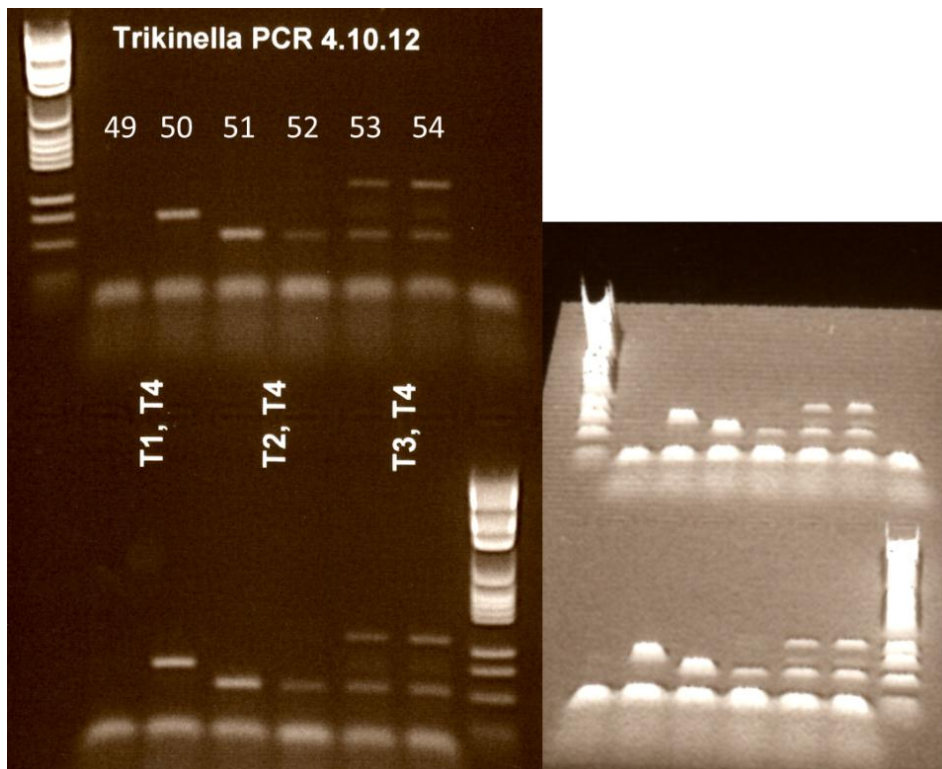
## 5.7 Sekainfektiot 7

T4-toukkien DNA-sekvenssit näkyvät yksittäisissä eristyksissä, mutta sekainfektioissa ne eivät yhtä poikkeusta lukuun ottamatta näy. Geelillä ei myöskään joka kerta näy kaikkien näytteiden PCR-tuotteet, minkä vuoksi tehtiin vielä yhdet sekainfektiot. Tällä kertaa tehtiin kaksi kappaletta jokaista sekainfektiota, ja jokaisesta DNA:n eristyksestä otettiin kaksi näytettä PCR-reaktioon. Taulukossa 12 on viimeisen erän sekainfektiot. Tehtiin ainoastaan T4-toukkia sisältäviä sekainfektioita.

TAULUKKO 12. Sekainfektiot 7

Seka-infektiot	Toukkien määrä			
	T1	T2	T3	T4
s49	1			1
s50	1			1
s51		1		1
s52		1		1
s53			1	1
s54			1	1

Kuvassa 15 näkyvät viimeisten sekainfektioiden tulokset. Samasta DNA:n eristyksestä otetut näytteet ovat kuvassa allekkain. Näytteessä 49 DNA:n eristys tai puhdistus on epäonnistunut, sillä kummassakaan näytteessä ei PCR-reaktion jälkeen näy DNA-fragmentteja. T4-vyöhykkeitä ei saatu tälläkään kertaa näkymään missään sekainfektiossa.



KUVA 15. Sekainfektiot 7

## 5.8 Virhelähteet

Hiirestä eristettyjen T4-lajin toukkien DNA-fragmentit eivät näkyneet yhdessäkään sekainfektiossa. Toukat eristettiin pakastetusta lihasta ja mikroskoopilla tarkasteltaessa ne näyttivät heikoilta eivätkä olleet enää spiraalille kiertyneitä. Jotkut toukat näyttivät läpikuultavilta.

Kanahaukasta eristettyjä toukkia oli säilytetty kylmähuoneessa etanolia sisältävässä putkessa, eikä niitä oltu jäädytetty kertaakaan. Mikroskoopilla tarkasteltaessa toukat olivat kiertyneet spiraalille ja näyttivät parempikuntoisilta kuin hiirestä eristetyt toukat. Näistä toukista tehdyssä sekainfektiossa näkyi kertaalleen myös T4-fragmentti. Fragmentti näkyy ainoastaan näytteessä, jossa T4-lajin DNA:ta oli kaksinkertainen määrä toisen lajin DNA:han nähden.

Toukan kunnon ei pitäisi vaikuttaa multiplex-PCR-määrittelyyn, mutta tämän työn perusteella näin näyttäisi kuitenkin käyvän. Hiirestä eristettyjen T4-toukkien huono kunto voi johtua näytteen säilytyksestä pakastettuna, tai vaihtoehtoisesti hiirelle syötetyt toukat olivat alun perinkin heikompia yksilöitä.

T4-lajin toukkien DNA-fragmentit eivät monistuneet PCR-reaktion aikana, jos putkessa oli muidenkin lajien DNA:ta. Menetelmässä käytetyt alukkeet eivät ilmeisesti sitoutuneet T4-toukan DNA:han yhtä helposti kuin toisen lajin DNA:han, vaikka alukkeita oli reaktioseoksessa ylimäärin. Joissain tapauksissa vyöhykkeiden puuttuminen saattoi johtua pipetoimisvirheestä, mutta on epätodennäköistä, että virhe sattuisi aina T4-lajin kohdalla.

## 6 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli tutkia, voidaanko sekainfektioita tutkia useamman toukan yhteisnäytteestä. Käytetty menetelmä ei ole luotettava sekainfektioiden tutkimisessa. T4-lajin DNA-fragmentti ei yleensä monistu PCR-reaktiossa, jos samassa näytteessä on mukana toisen lajin DNA:ta. Toukan kunto vaikuttaa DNA:n monistumiseen. Jos T4-lajin toukat ovat hyväkuntoisia ja niitä on näytteessä enemmän kuin muita toukkia, saattaa sen DNA monistua PCR-reaktiossa.

T2- ja T3-lajit tuottavat samanpainoisen tuotteen, mutta geelillä ei näy eroa vyöhykkeiden kirkkaudessa, vaikka T2-tuotetta olisikin enemmän. Jos useamman toukan yhteisnäytteestä löytyy T3-lajin lopputuotteet, täytyy testata yksittäisiä toukkia myös T2-lajin varalta.

Jos näytteessä on vain T1- ja T2-lajien toukkia, yhden erilaisen toukan lopputuote saadaan yleensä näkyviin kolmen toukan yhteisnäytteestä. Kuitenkin useamman toukan yhteisnäytteen käsittelyyn kuluu huomattavasti enemmän aikaa, kuin jos toukkien lajinmääritys tehtäisiin yksittäisiä toukkia käyttäen.

T4-lajin toukat ovat keskimäärin pienempiä kuin muut ja kokoero saattaa näkyä mikroskoopilla tarkasteltaessa. Jos näytteessä näkyy erikokoisia toukkia, voidaan siinä olettaa olevan sekainfektio. Tässä tapauksessa voidaan kerätä kummankin lajin toukkia eri putkeen lajinmääritystä varten. Aina tämä kokoero ei kuitenkaan ole tarpeeksi selvä. Muiden lajien kohdalla ei voida havaita mitään ulkoisia eroavaisuuksia.

PCR-tunnistus on mielekkäintä tehdä yksittäisistä toukista. Koska kovin monta yksittäistä toukkaa näytettä kohden ei ole mielekästä tunnistaa, osa sekainfektioista jää tunnistamatta. Jos käytettävissä olisi ollut enemmän aikaa, olisi testattu myös reaaliaikaisen PCR-reaktion käyttöä sekainfektioiden tunnistamisessa.

## LÄHTEET

1. Trikinella. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. Saatavissa:  
[http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten\\_terveys\\_ja\\_elaintaudit/elaintaudit/usealle\\_elainlajille\\_yhteiset\\_taudit/trikinelloosi/](http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/elaintaudit/usealle_elainlajille_yhteiset_taudit/trikinelloosi/). Hakupäivä: 4.9.2012
2. Hylkeet ja trikinella-loinen. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos. Saatavissa:  
[http://www.rktl.fi/riista/hylkeet/hylkeiden\\_metsastys/hylkeet\\_trikinella\\_loinen/](http://www.rktl.fi/riista/hylkeet/hylkeiden_metsastys/hylkeet_trikinella_loinen/). Hakupäivä: 4.9.2012.
3. Taylor, M. A - Coop, P. L - Wall, R. L. 2007. Veterinary Parasitology – 3. painos. Oxford: Blackwell Publishing.
4. Lawley, Richard. Trichinella. 2008. Food Safety Watch. Saatavissa:  
<http://www.foodsafetywatch.com/public/810.cfm>. Hakupäivä: 5.9.2012
5. Summary of Basic Science and Clinical Information. The Trichinella Page. Saatavissa: [http://www.trichinella.org/index\\_synopsis.htm](http://www.trichinella.org/index_synopsis.htm). Hakupäivä: 5.9.2012.
6. Georgi, Jay R. 1985. Parasitology for Veterinarians – 4. painos. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
7. Hendrix, Charles M – Robinson, Ed. 1998. Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians – 3. painos. St. Louis: Elsevier Mosby.
8. Eosinofiili. Solunetti. Saatavissa:  
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/eosinofiili/>. Hakupäivä: 13.9.2012.
9. Gottstein, Brumo – Pozio, Edoardo – Nöckler, Karsten. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Control of Trichinellosis. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 22. No. 1. S. 127–145. Saatavissa:  
<http://cmr.asm.org/content/22/1/127.full>. Hakupäivä: 16.10.2012.
10. Webster, Pia – Kapel, Christian M. O. 2005. Intestinal establishment and reproduction of adult *Trichinella* spp. in single and mixed species infection in foxes (*Vulpes vulpes*). Veterinary Parasitology 130. S. 245–253. Elsevier. Saatavissa:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705001354>. Hakupäivä: 3.10.2012.

11. Zarlenga, Dante S – Chute, M. Barry – Martin, Anthony – Kabel, Christian M. O. 1999. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. International Journal for Parasitology 29/1999. S. 1895–1867. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751999001071>. Hakupäivä: 20.9.2012.
12. Phillips, Theresa. RFLP. About.com. Saatavissa: <http://biotech.about.com/od/glossary/g/RFLPdef.htm>. Hakupäivä: 26.9.2012.
13. Nöckler, K – Reckinger, S – Pozio, E. 2006. *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* mixed infection in a wild boar (*Sus scrofa*) of Germany. Veterinary Parasitology 137. S. 364–368. Elsevier. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000471>. Hakupäivä: 3.10.2012.
14. Identification of *Trichinella* Muscle Stage Larvae at the species level by Multiplex PCR. Istituto Superiore di Sanità. Community Reference Laboratory for Parasites. Työohje. Saatavissa: [http://www.iss.it/binary/crlp/cont/PCR\\_method\\_WEB\\_SITE.pdf](http://www.iss.it/binary/crlp/cont/PCR_method_WEB_SITE.pdf). Hakupäivä: 27.9.2012.
15. Principle of the PCR. 1999. Saatavissa: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Hakupäivä: 15.10.2012.
16. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). NCB. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRAPD.shtml>. Hakupäivä: 17.10.12.
17. Kapel, C. M. O – Oivanen, L – La Rosa, G – Mikkonen, T – Pozio, E. 2001. Evaluation of two PCR-based techniques for molecular epidemiology in Finland, a high endemic area with four sympatric *Trichinella* species. Parasite, 8. S. 39–43.

18. Rombout, Y. B – Bosch, S – Van Der Giessen, J. W. B. 2001. Detection and Identification of Eight *Trichinella* Genotypes by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39. No. 2. S. 642–646.
19. Airas, Nina – Saari, Seppo – Mikkonen, Taina – Virtala, Anna-Maija – Pellikka, Jani – Oksanen, Antti – Isomursu, Marja – Kilpelä, Seija-Sisko – Lim, Chae W – Sukura, Antti. 2010. Sylvatic *Trichinella* spp. infection in Finland. *The Journal of Parasitology*. Vol 96. No. 1. S. 67–76.
20. Rodríguez, Esperanza – Olmedo, Juan – Ubeira, Florencio M – Blanco, Carmen – Gárate, Teresa. 2008. Mixed infection, *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi*, in a wild boar hunted in the Province of Cáceres (Spain). *Experimental Parasitology*. Elsevier. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489408000751>.  
Hakupäivä: 1.10.2012.
21. Alban, L – Pozio, E – Boes, J – Boireau, P – Boué, F – Claes, M – Cook, A. J. C – Dorny, P – Enemark, H. L – van der Giessen, J. – Hunt, K. R – Howell, M – Kirjusina, M – Nöckler, K – Rossi, P – Smith, G. C – Snow, L – Taylor, M. A – Theodoropoulos, G – Vallée, I – Viera-Pinto, M. M – Zimmer, I. A. 2011. Towards a standardised surveillance for *Trichinella* in the European Union. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 99. Issues 2-4. S.148-160. Elsevier. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587711000390#sec0045>.  
Hakupäivä: 3.10.2012.
22. Zarlenga, D. S – Rosenthal, B. M – La Rosa, G – Pozio, E – Hoberg, E. P. 2006. Post-Miocene expansion, colonization, and host switchin drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. *PNAS*. Vol. 103. No. 19. S.7354–7359.
23. Pozio, Edoardo. 2000. Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary parasitology*. Vol. 93. Issues 3–4. S. 241–262. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401700003447>.  
Hakupäivä: 5.10.2012.



TYÖVÄLINEET

- analyysivaaka, tarkkuus 0,1 g
- Stomacher ja Stomacher-pusseja
- lämpömittari
- statiivi, johon on kiinnitetty tärstin
- teholeikkuri
- lämmittävä magneettisekoitin ja magneetti
- stereomikroskooppi
- pöytäseentrifugi 1,5 ml:n putkille
- vortex-sekoitin
- lämpöblokki, lämpötilaväli 25–100 °C
- magneettierotusteline
- PCR-laite
- mikroaaltouuni
- elektroforeesilaite
- UV-transluminaattori
- digitaalinen kuvantamislaitte
- automaattipipetit 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl ja 1–5 ml
- pipetinkärkiä
- laboratorioastiastoja
- eppendorf-putkia
- laminaarivirtauskaappi

## REAGENSsit

- 17 % ja 25 % HCl, Merck, koodi: 273681233
- Pepsiini, koodi: K42155490142
- 99 % etanoli
- 1 M DTT-liuos
- 18 mg/ml proteinaasi K-liuos
- inkubointipuskuri, kaupallinen liuos: DNA IQ™ System kit, Promega, koodi: DC6701
- lyysipuskuri, kaupallinen liuos: Tissue and Hair Extraction kit, Promega, koodi DC 6740
- paramagneettinen hartsi, kaupallinen suspensio: DNA IQ™ System kit, Promega, koodi: DC6701
- pesupuskuri, kaupallinen liuos: Tissue and Hair Extraction kit, Promega, koodi DC 6740
- eluointipuskuri, kaupallinen liuos: Tissue and Hair Extraction kit, Promega, koodi DC 6740
- 2xPCR master mix, 2x kaupallinen liuos, Promega, koodit: M7501, M7502, M7505. Koostumus: dATP 400µM, dCTP 400 µM, dGTP 400 µM, dTTP 400 µM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, Taq-polymeraasi 50 U/ml
- oligonukleotidit, kaupalliset valmisteet, lyofilisoidut tuotteet liuotettuna nukleaasivapaaseen veteen loppukonsentraatioon 100 pmol/µl
- 10 µM seos B, multiplex-PCR -reaktiossa käytettävä oligonukleotidiseos
- 6x Loading Dye -latauspuskuri, kaupallinen liuos
- agarosi, kaupallinen tuote, koodi 206084
- 0,5x TBE -liuos
- Gel Red 10,000x in water
- molekyylipainostandardi, kaupallinen tuote, jossa on markkerit 50–500 emäsparin välillä
- milli-Q vesi, laatu  $\geq 18$  mohm/cm

## LIUOSTEN VALMISTUS

## Inkubointipuskuri (IB+ -liuos)

- 100 µl IB-liuosta
- 12,5 µl 1M DTT -liuosta
- 12,5 µl Proteinaasi K -liuosta

Liuos valmistetaan uudestaan jokaista eristystä varten.

## Lyysipuskuri (LB+ -liuos)

- 10 ml lyysipuskuria
- 100 µl 1M DTT -liuosta

Liuos säilyy huoneenlämmössä kuukauden.

## PCR-reaktioseos

- 15 µl 2XPCR Master Mix
- 1,2 µl Set B alukeseosta
- 3,8 µl H<sub>2</sub>O

Liuos valmistetaan ennen PCR-reaktiota ja säilytetään jäähäuteessa.

MOLEKYYLIPAINOMARKKERI

Product Contents

BenchTop pGEM® DNA Markers:

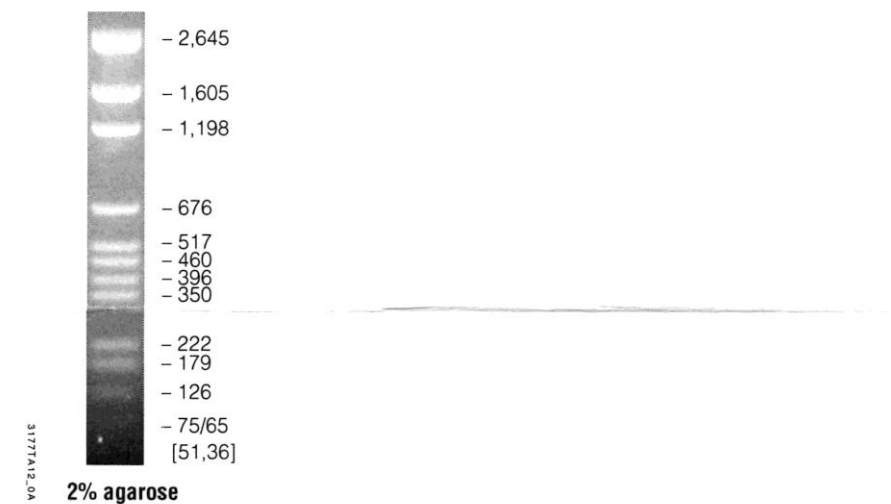
Part No.	Size
G752A	250µl (50 lanes)
G752B	50µl (10 lanes)

**Description:** BenchTop pGEM® DNA Markers (Cat.# G7521) are made by digesting pGEM®-3 Vector DNA to completion with *Hin*II, *Rsa*I and *Sin*I in separate reactions. The products of these reactions are mixed, and after phenol extraction and ethanol precipitation, the DNA fragments are resuspended in TE Buffer and diluted in Blue/Orange Loading Dye (Cat.# G1881) to a final concentration of 0.2mg/ml. The recommended loading volume is 5µl/lane.

**Storage Buffer:** BenchTop pGEM® DNA Markers are supplied in 1X Blue/Orange Loading Dye.

**Storage Conditions:** See the Product Information Label for storage recommendations. Storage at -20°C can enhance the shelf life of this product.

**Usage Note:** Concentration gradients may form in products and should be dispersed; mix well prior to use. When the product is subjected to electrophoresis in an agarose gel, the three dyes in the markers migrate at various speeds. The xylene cyanol FF migrates at approximately 4kb, bromophenol blue at approximately 300bp and orange G at approximately 50bp in 0.5–1.4% agarose gels in 1X TAE buffer (1).



Quality Control Assay

**Accurate Sizing:** Five microliters of the BenchTop pGEM® DNA Markers is subjected to electrophoresis in a single lane on a 2% agarose gel with 1X TAE buffer. The markers must show the expected pattern when compared to the conventional pGEM® DNA Markers (Cat.# G1741).

Reference

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.