

**REAL-TIME PCR –MENETELMÄN SOVELTAMINEN
YERSINIA ENTEROCOLITICAN OSOITTAMISEKSI
KASVISNÄYTTEISTÄ**



Opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Hämeenlinna 9.5.2008

Sanna Tuomi



Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Visamäentie 35
13100 Hämeenlinna

Työn nimi Real-time PCR –menetelmän soveltaminen *Yersinia enterocolitica*n osoittamiseksi kasvisnäytteistä

Tekijä Sanna Tuomi

Ohjaava opettaja Tuija Pirttijärvi

Hyväksytty _____ . _____ . 20 _____ arvosanalla _____

Hyväksyjä

Arvosana-asteikko 5 = kiitettävä, 4–3 = hyvä, 2–1 = tyydyttävä

HÄMEENLINNA

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Tekijä

Sanna Tuomi

Vuosi 2008

Työn nimi

Real-time PCR –menetelmän soveltaminen *Yersinia enterocolitica* osoittamiseksi kasvisnäytteistä

Työn säilytyspaikka

HAMK, Hämeenlinna, Visamäki

TIIVISTELMÄ

Kasvisperäisten ruokamyrkytysten määrä on lisääntynyt viime vuosina, mikä on johtanut perinteisiä viljelymenetelmiä nopeampien ja herkempien osoittamismenetelmien kehittämistarpeeseen. DNA-tekniikoihin perustuvat menetelmät ovat spesifisiä ja herkkiä, ja erityisesti PCR -menetelmien käyttö on yleistynyt todettaessa patogeeneja elintarvikenäytteistä.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Hämeenlinnan seudun kansanterveystyön kuntayhtymän Ympäristö- ja elintarvikelaboratoriossa TavastLab:ssa. Työssä sovellettiin kasvisnäytteille real-time PCR –menetelmää (kehitetty Ruotsissa, Statens Livsmedels Verket SLV) *Yersinia enterocolitica* osoittamiseksi. Menetelmän kehittäminen on edellytys sille, että menetelmä voidaan validoida ja hakea sille akkreditointia. Kokeita tehtiin PCR -komponenttien toimivuuden ja reaktion tehokkuuden testaamiseksi. Menetelmän lineaarisuus ja toteamisraja määritettiin puhdasviljelmän laimennussarjasta sekä ympätyillä salaatinäytteillä. Vertailtavana oli neljä DNA:n eristysmenetelmää (PrepMan Ultra, Applied Biosystems; PrepMan Ultra + DNA-saostus, Applied Biosystems; JetQuick, Genomed; MasterPure DNA Purification Kit, Epicentre Biotechnologies). Parhaaksi valitun eristysmenetelmän toimivuutta testattiin myös muilla elintarvikematriiseilla.

Menetelmän reaktiotehokkuus todettiin optimaaliseksi (99,9 %), menetelmä todettiin lineaariseksi ja rikastusvaiheen jälkeen toteamisrajaksi kasvisnäytteistä saatiin alle 10 pmy/25 g:n näyte. Eristysmenetelmistä parhaaksi todettiin PrepMan Ultra DNA-saostuksella, jolla rinnakkaismäärittysten hajonta oli pieni, Ct-arvot matalimmat ja delta-Rn –arvot suurimmat. Kehittämistyön jälkeen menetelmä on validoitu ja sille on haettu akkreditointia. Menetelmä on otettu Tavastlab:ssa rutiinikäyttöön.

Asiasanat

Elintarvikehygieniä, real-time PCR, *Yersinia enterocolitica*

Sivut

47 s.

HÄMEENLINNA

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering

Author

Sanna Tuomi

Year 2008

Subject of Bachelor's thesis

Setting up a Real-Time PCR Method for Detection of *Yersinia enterocolitica* in Vegetables

Archives

HAMK University of Applied Sciences, Hämeenlinna

ABSTRACT

During the last years the number of food poisonings originated from vegetables have increased. Traditional culture methods are time-consuming and not sensitive enough. These facts had caused a need to develop more rapid methods for the detection of food-borne pathogens. The use of sensitive and specific DNA-based methods, especially PCR-methods, have become more common. The project was commissioned by Environmental and Food Research Laboratory TavastLab. The aim was to set up a real-time PCR method (developed at Statens Livsmedels Verket SLV, Research and Development Department, National Food Administration, Uppsala, Sweden) in the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in vegetables. Setting up the method is a prerequisite for validation and accreditation. The first experiments were done to show the workability of PCR-components and to specify the reaction efficiency. More experiments were done to prove the linearity and detection limit with dilutions of pure cultures and inoculated salad samples. There were four DNA-extraction kits to compare (PrepMan Ultra, Applied Biosystems; PrepMan Ultra + DNA-precipitation, Applied Biosystems; JetQuick, Genomed; MasterPure DNA Purification Kit, Epicentre Biotechnologies). Some tests were also done on other food samples. The reaction efficiency of the method was found out to be optimal (99.9%). The method was linear and the detection limit in the lettuce was under 10 pmy/25 g. PrepMan Ultra with DNA-precipitation was found to be the best extraction method, because the standard deviation with simultaneous test was minimum, Ct-values were the lowest and delta-Rn-values were the highest. After the development done in this work the method has been validated and the accreditation has been applied to. In Tavastlab the method has now been introduced in routine work.

Keywords Food hygiene, real-time PCR, *Yersinia enterocolitica*

Pages 47 p.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	PCR-TEKNIikka	3
2.1	PCR -tekniikan periaate	3
2.1.1	Templaatti eli kohde-DNA	3
2.1.2	Alukkeet eli primerit	4
2.1.3	DNA-polymeraasit	5
2.2	PCR-reaktion vaiheet	6
2.3	PCR:n kinetiikka	8
2.4	Reagenssit	8
2.5	PCR -reaktion optimointi	9
2.6	Real-time PCR	10
2.7	Fluoresoivat merkkiaineet	10
2.7.1	SYBR Green I	11
2.7.2	Molecular Beacon	12
2.7.3	Hydrolyysiin perustuvat leimat (TaqMan-probe)	13
2.8	DNA:n eristäminen	14
2.9	Inhiboivat tekijät	14
2.10	PCR -työskentely ja kontaminaatio	15
3	<i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> JA SEN OSOITTAMINEN	16
3.1	<i>Y. enterocolitica</i> suomalaisessa elintarvikehygieniassa	17
3.2	<i>Y. enterocolitica</i> osoittamisen erityispiirteitä	17
3.3	<i>Y. enterocolitica</i> osoittaminen PCR -tekniikalla	18
3.4	Mikrobiologisen menetelmän validointi	19
4	<i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> –PCR -MENETELMÄN KEHITTÄMINEN	20
4.1	Tutkimuksen tavoite	20
4.2	Materiaalit ja menetelmät	20
4.2.1	Bakteerikanta ja elatusalustat	20
4.2.2	Salaatti ja ympit	21
4.2.3	Näytteiden valmistaminen	21
4.2.4	Negatiiviset kontrollit	22
4.2.5	PCR -reagenssit	22
4.2.6	DNA:n eristysmenetelmät	23
4.2.7	PCR -laite ja ajot	24
4.2.8	PCR -analyysitulosten käsittely	24
4.2.9	Esiajo PCR -komponenttien testaamiseksi	25
4.2.10	Reaktion tehokkuuden määrittäminen	25
4.2.11	Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen	26
4.2.12	Menetelmän toteamisrajan määrittäminen	27
4.2.13	DNA:n eristysmenetelmien vertailu ja optimointi	27
4.2.14	Elintarvikematriisin ja taustakasvun määrän vaikutus DNA:n monistumiseen	27
4.3	Tulokset	28
4.3.1	Esiajo PCR-komponenttien testaamiseksi	28

4.3.2	Reaktion tehokkuuden määrittäminen	29
4.3.3	Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen	32
4.3.4	Menetelmän toteamisrajan määrittäminen	35
4.3.5	DNA:n eristysmenetelmien vertailu ja optimointi.....	35
4.3.6	Elintarvikematriisin ja taustakasvun määrän vaikutus DNA:n monistumiseen	38
4.4	Tulosten tarkastelu	39
4.5	Johtopäätökset.....	43
LÄHTEET		44

1 JOHDANTO

Elintarvikkeiden aiheuttamiin ruokamyrkytyksiin sairastuu Suomessa vuosittain noin 400 - 3000 ihmistä. Kasvisperäisten ruokamyrkytysten osuus on lisääntynyt viime vuosina. Vuonna 2006 kasvikset olivat ensimmäistä kertaa suurin ruokamyrkytysten aiheuttajaryhmä ohittaen lihan ja lihatuotteet epidemioiden aiheuttajana. *Yersinia*-lajien (*Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis*) aiheuttamien ruokamyrkytysepidemioiden määrä on lisääntynyt 1990-luvun puolivälistä lähtien ja vuonna 2006 ne olivat kolmanneksi suurin bakteeriryhmä elintarvikeperäisten ruokamyrkytysten aiheuttajina. *Yersinia* aiheuttamat ruokamyrkytykset ovat tyypillisesti saaneet alkunsa kotimaisen, varastoidun porkkanan välityksellä. [1.]

Y. enterocolitica on tavallinen maaperän bakteeri. Laji muodostaa heterogeenisen ryhmän, joka jaetaan useisiin bioserotyyppihin. Näistä osa on patogeenisiä ja aiheuttaa ihmiselle yersinioosia, jonka oireita ovat ripuli, kuume ja vatsakipu, ja voi aiheuttaa jälkitautina niveltulehduksen. Toiset bioserotyyppit taas ovat vaarattomia. [2.] Epäiltäessä *Y. enterocolitica* ruokamyrkytyksen aiheuttajaksi, on osoituksessa voitava tunnistaa eri bioserotyyppit, jotta voidaan varmistua osoitetun kannan patogeenisuudesta.

Y. enterocolitica osoittaminen elintarvikenäytteistä viljelymenetelmällä (ISO-standardi ISO 10273:2003) [3] on työlästä ja aikaa vievää. Vastauksen saaminen kestää jopa kaksi viikkoa ja toteamisraja taustakasvua sisältävillä kasvisnäytteillä voi olla jopa 10 000 pmy. *Y. enterocolitica* on todennäköisesti infektiivinen pieninäkin pitoisuuksina [4]. Kaikille patogeenisille *Y. enterocolitica* -kannoille on yhteistä virulenssin kannalta välttämätön plasmidi, joka erottaa patogeeniset kannat ei-patogeenisista. Lisäksi patogeenisilla kannoilla on kromosomaalisessa DNA:ssa geenejä, joita ei esiinny ei-patogeenisilla. Näitä on hyödynnetty kehitettäessä uusia spesifisiä, DNA-tekniikoihin perustuvia *Y. enterocolitica* osoitusmenetelmiä. PCR -tekniikkaan perustuvista menetelmistä on saatu lupaavia tuloksia.

NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) on julkaissut vuonna 1998 perinteiseen PCR:ään perustuvan menetelmän *Y. enterocolitica* osoittamiseksi kasvisnäytteistä [5]. Myös useita real-time PCR:ään perustuvia menetelmiä on kehitetty, mutta standardimenetelmän kehittäminen on vielä kesken. *Y. enterocolitica* osoittamiseksi real-time PCR -menetelmällä ei myöskään ole saatavilla useille muille elintarvikepatogeenille kehitettyjä valmiita kaupallisia kyttejä. Ruotsissa SLV:ssä (Statens Livsmedels Verket) on validoitu real-time PCR -menetelmä *Y. enterocolitica* osoittamiseksi lihanäytteistä ja validointiprosessiin kuului mm. kattava testaus menetelmän spesifisyydestä patogeenisille kannoille. Kasvismatriisi poikkeaa lihasta mm. runsaamman taustakasvun vuoksi ja siksi menetelmän validointi kasvisnäytteille vaatii esim. riittävän tehokkaan inhiboivia tekijöitä vähentävän DNA:n eristysmenetelmän löytämisen.

Toimeksianto tähän opinnäytetyöhön saatiin Hämeenlinnan seudun kansanterveystyön kuntayhtymän ympäristö- ja elintarvikelaboratoriosta Tavastlab:sta ja sen tavoitteena oli kehittää real-time PCR -menetelmä *Y. enterocolitica*n osoittamiseksi kasvisnäytteistä. Menetelmän kehittämiseen kuului lineaarisuuden ja toteamisrajan määrittäminen sekä neljän eri eristyskitin testaaminen. Menetelmän kehittämisen jälkeen se validoitiin, mikä on edellytys menetelmän hyväksymiselle. Validoinnilla osoitetaan uuden menetelmän olevan parempi tai vähintään yhtä hyvä kuin käytössä oleva referenssimenetelmä. Referenssimenetelmänä käytettiin ISO 10273/2003 [6] muunneltua viljelymenetelmää.

2 PCR-TEKNIikka

PCR (polymerase chain reaction) eli polymeerasiketjureaktio perustuu DNA -polymeerasin toimintaan [7, s. 68]. Se on tärkeä geeni- ja molekyyli-tekniikan työväline. PCR -tekniikka luokitellaan mikrobiologisiin menetelmiin, ja sitä voidaan käyttää menetelmästä riippuen sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen määrittelyyn. Mikäli menetelmä sisältää rikastusvaiheen, mikä on yleistä elintarvikeperäisille näyttemateriaaleille kehitetyille menetelmille, PCR:ää käytetään osoitusmenetelmänä eli siitä saadaan kvalitatiivinen todettu/ei todettu –tulos.

PCR -tekniikan etuja ovat sen nopeus, spesifisyys, selektiivisyys, herkkyys ja mahdollisuus automatisointiin [8, s. 40]. Yhtenä PCR:n heikkoutena mikrobiologisissa tutkimuksissa voidaan pitää sitä, että siinä ei saada eristettyä bakteerikantaa, jolloin siitä ei voida tehdä jatkotutkimuksia.

2.1 PCR -tekniikan periaate

PCR:llä eli polymeerasiketjureaktiolla monistetaan kahden nukleotidisekvenssiltään tunnetun DNA-jakson välissä olevia DNA-jaksoja [9, s. 107]. PCR -reaktioon tarvitaan mallina toimiva, monistettava DNA -jakso eli templaatti, DNA -polymeerasientsyymi ja deoksinukleotidit (G = guaniini, C = sytosiini, A = adeniini ja T = tymiini) [7, s.70]. Monistettavan DNA-jakson päihin tarvitaan alukkeet eli oligonukleotidit, joiden nukleotidisekvenssit ovat komplementaariset monistettavan DNA -jakson päiden sekvenssien kanssa. Kaksijuosteinen DNA aukaistaan korkeassa lämpötilassa, jonka jälkeen lämpötilaa lasketaan ja alukkeet kiinnittyvät monistettavan DNA -jakson vastinjuosteiden päihin. Polymeerasientsyymi syntetisoi alukkeiden välille 5'→3' suunnassa komplementaarisen, alkuperäistä vastaavan DNA -juosteen. Toistamalla näitä syklejä saadaan eksponentiaalisesti monistettua tiettyä DNA-jaksoa. Perinteisessä PCR:ssä tarvitaan jälkikäsitteilyjä monistuneen DNA:n toteamiseksi, mutta real-time PCR:ssä monistumista voidaan seurata reaaliaikaisesti fluoresoivan merkkiaineen avulla.

2.1.1 Templaatti eli kohde-DNA

Templaattina voi olla joko DNA tai RNA, joka voi olla peräisin mm. kromosomaalisesta DNA:sta, mRNA:sta, plasmidista, cDNA:sta tai kosmidista [10, s. 51]. Templaattina toimiva DNA tai RNA voi olla eristetty mistä tahansa, esim. verestä tai muista kudoksista, kasveista, bakteereista tai viruksista. Optimaalisissa olosuhteissa jopa yksi molekyyli voidaan saada monistumaan. Monistettavan alueen nukleiinihapposekvenssi on tunnettava ainakin siinä määrin, että alukkeet voidaan suunnitella. [11, s.168.] Yhä useampien eliöiden DNA-sekvenssit on määritetty joko kokonaan tai ainakin osittain. Näitä on kerätty geenipankkeihin sekvenssitietokannoiksi.

Suurimpia näistä ovat Gen Bank (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA), DDBJ (DNA DataBank of Japan) ja EMBL (European Molecular Biology Laboratory), jotka yhdessä muodostavat yhteistyöelimen nimeltä International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Kansalliset ja kansainväliset tietopankit päivittävät tietojaan niin, että uusimmat sekvenssitiedot ovat kaikkien saatavilla. [7, s. 297.]

Templaatin valinnassa kannattaa suosia lyhyitä sekvenssejä, koska lyhyiden, sekvenssiltään 50-150 nukleotidin pituisten templaattien on todettu monistuvan tehokkaimmin. [12, s. 2.] Enintään 500 nukleotidin sekvenssit monistuvat vielä hyvin, mutta optimoimalla reaktio jopa 10 000 nukleotidin pituiset templaatit on saatu monistumaan [11, s. 168].

2.1.2 Alukkeet eli primerit

Alukkeet ovat yksisäikeisiä DNA-jaksoja, jotka kiinnittyvät monistettavan kohde-DNA:n päihin komplementaarisen nukleotidisekvenssin perusteella [13, s. 38]. Alukkeet ovat pituudeltaan noin 18-30 nukleotidiä ja toimivat DNA-polymeraasin lähtöpaikkoina, mistä DNA-synteesi etenee polymeeraasiensyömyin toimesta 3'-päästä alkaen kohti 5'-päästä [11, s. 168; 13, s. 38]. Alukkeita on kaksi, yksi monistettavan DNA-jakson kumpaankin päähän, ja niillä on omat, erilaiset nukleotidisekvenssinsä [7, s. 68].

Jotkut DNA-sekvenssit ovat samanlaisia eri lajien ja sukujen välillä, kun taas toiset ovat jopa kantakohtaisia [14, s. 49]. Alukkeiden suunnittelussa on tärkeää, että valitaan sellainen sekvenssi, että epäspesifistä kiinnittymistä ja kahdentumista ei pääse tapahtumaan. Kun halutaan tunnistaa näytteestä esim. tietty bakteeri, suunnitellaan alukkeet, jotka tunnistavat kyseisen kannan, mutta on myös varmistuttava siitä, ettei alukkeille ole kiinnittymispaikkaa näytteessä mahdollisesti oleville muille bakteereille. Epäspesifisen kiinnittymisen välttämiseksi alukkeiden suunnittelussa on otettava huomioon muutamia seikkoja, koska alukkeet saattavat kiinnittyä sellaisiinkin sekvensseihin, jotka ovat vain osittain komplementaarisia. Onnistuneella alukkeiden suunnittelulla voidaan vaikuttaa myös monistustehokkuuteen. Alukkeiden suunnittelua pidetäänkin PCR:n tärkeimpänä vaiheena [9, s. 110].

Alukkeet eivät saa sisältää itsessään komplementaarisia jaksoja, jolloin ne voivat muodostaa ns. hiusneularakenteita. Alukkeet voivat kiinnittyä myös toinen toisiinsa, jos niissä on keskenään komplementaarisia jaksoja. [9, s. 110.] Alukkeiden ei myöskään tulisi sisältää samanlaisina toistuvia jaksoja, koska tämä voi johtaa alukkeen kiinnittymiskohdan ”liukumiseen” templaattissa. 3'-pää on tärkeämpi alukkeen suunnittelussa ja yleensä ainakin 3 ensimmäistä nukleotidiä täytyy täsmätä täysin templaatin kanssa. Lisäksi 3'-päässä tulee välttää kolmen tai useamman G:n tai C:n peräkkäistä esiintymistä, koska tämä voi johtaa epäspesifiseen kiinnittymiseen. [10, s.27.]

Alukkeiden rakenne, niiden pituus ja G-C -pitoisuus, vaikuttaa kiinnittymislämpötilaan, ja siksi alukkeiden tulee olla suurinpiirtein saman pituisia

ja G-C -pitoisuuksien tulee olla samanlaiset, jotta ne kiinnittyvät optimaalisesti samassa lämpötilassa [11, s. 168]. G-C –pitoisuuden tulisi olla 40-60 % alukkeen nukleotidisuudesta [15, s. 37]. Lyhyiden alukkeiden (noin 20 nukleotidiä) kiinnittymislämpötilan laskemiseen voidaan käyttää avuksi kaavaa:

$$T_m = n_{G+C} \times 4^\circ\text{C} + n_{A+T} \times 2^\circ\text{C} ,$$

missä T_m (melting temperature) on lämpötila, jossa puolet alukkeista on kiinnittyneenä kohde-DNA:han [10, s. 29]. PCR-reaktiossa kiinnittymislämpötila T_a (annealing temperature) on noin 3-5 °C matalampi kuin T_m [11, s. 168; 20, s. 6409].

2.1.3 DNA-polymeraasit

PCR-reaktiossa polymeraasientsyymi rakentaa yksijuosteiselle DNA:lle vastinjuosteen vapaista nukleotideistä. DNA-synteesin aikana polymeraasi valitsee oikean nukleotidin vastinpari-säännön (A:T ja G:C) mukaan ja liittää sen alukkeen 3'-pään vapaaseen OH-ryhmään jatkaen vastinjuosteen muodostamista kiinnittäen aina seuraavan nukleotidin edelliseen [10, s. 9, 36].

Lämpökestoisia DNA-polymeraaseja on eristetty useista termofiilisistä bakteereista. Yleisin on *Thermus aquaticus* –bakteerista eristetty *Taq* -polymeraasi. Se kestää 95 °C denaturointilämpötilaa 1-2 minuuttia ja tässä lämpötilassa sen puoliintumisaika on yli kaksi tuntia. [11, s. 170.] *Taq* –polymeraasi on hyvä useisiin rutiinisovelluksiin ja se syntetisoi 2000-4000 nukleotidin pituisia tuotteita melko tehokkaasti [10, s. 39].

DNA-polymeraasit katalysoivat aina reaktiota, joka etenee 5'→3' suunnassa. Joillakin polymeraaseilla on oikolukuaktiivisuus (3'-5' – *eksonukleaasiaktiivisuus*), joka tarkistaa 3'→5' suunnassa, että kasvavaan DNA-juosteeseen on liitetty oikea vastinnukleotidi. Mikäli polymeraasi havaitsee väärän kiinnittyneen nukleotidin, se vaihtaa nukleotidin oikeaan. [10, s. 36.]

Taq –polymeraasilla ei ole oikolukuaktiivisuutta, joten se saattaa tuottaa virheitä monistaessaan DNA:ta, keskimäärin yhden per 250 polymeroitua nukleotidia. Tämän vuoksi tiettyihin sovelluksiin käytetään muita, suuremman tarkkuuden omaavia polymeraaseja. [11, s. 170.] Valittaessa polymeraasia PCR:ään, tärkeimpinä ominaisuuksina on tarkkuus ja synteesin tehokkuus [10, s. 36]. Kaikissa sovelluksissa virheet eivät aiheuta ongelmia ja kuhunkin sovellukseen voidaan valita tarkkuudeltaan riittävä polymeraasi valmistajien antamien polymeraasien virhefrekvenssietietojen perusteella [9, s. 111].

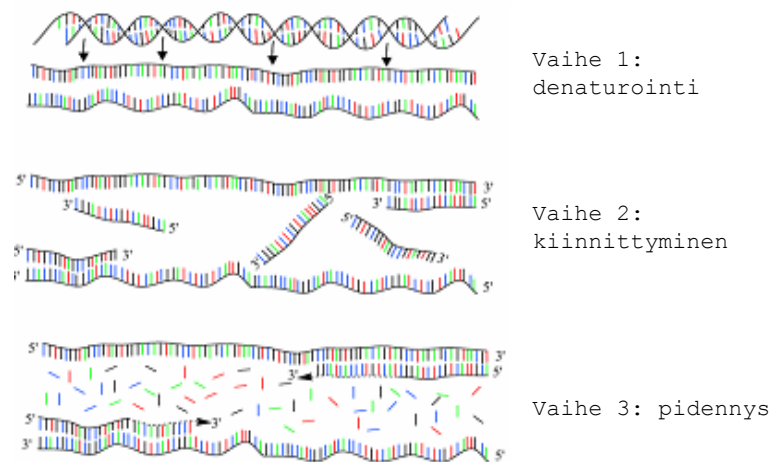
DNA-polymeraasit jaetaan yleisesti kahteen luokkaan kopioitavan templaatin mukaan:

- DNA-riippuvaiset DNA-polymeraasit
- RNA-riippuvaiset DNA-polymeraasit (tai ”reverse transcriptases”) [10, s. 36.]

2.2 PCR-reaktion vaiheet

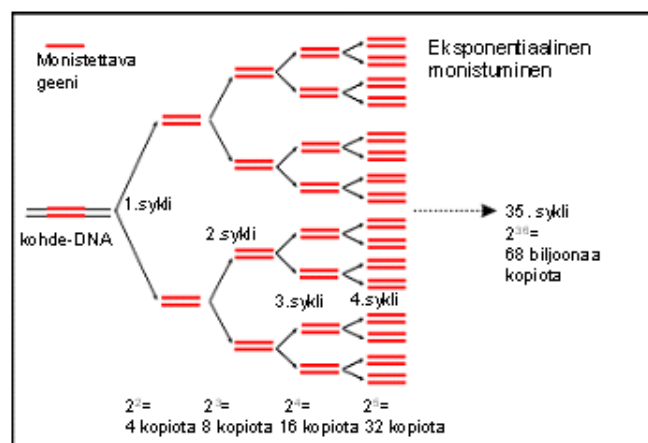
PCR-reaktio voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, jotka muodostavat yhden reaktiosyklin (kuva 1):

1. DNA-juosteiden denaturointi (*denaturation*), jossa lämmön vaikutuksesta DNA-juosteet aukeavat ja irtoavat toisistaan, tapahtuu n. 95 °C:n lämpötilassa [7, s. 70]. Denaturoinnissa vastinjuosteiden nukleotidien emästen väliset vetysidokset katkeavat [9, s. 114]. Denaturointilämpötilaan vaikuttaa denaturoitavan kaksoisjuosteen G-C –pitoisuus, koska G-C –sidosten aukeaminen vaatii korkeamman lämpötilan kuin A-T –sidosten. Mikäli denaturointilämpötila on liian alhainen, denaturoituu vain A-T –pitoiset alueet ja lämpötilaa alennettaessa seuraavassa vaiheessa kaksoisjuoste kiinnittyy alkuperäiseen koostumukseensa. Denaturoitumiseen vaikuttaa lisäksi juosteen pituus. Pidempi juoste vaatii pidemmän denaturointiajan. [16, s. 8.]
2. Alukkeiden kiinnittyminen (*annealing*) mallijuosteiden päihin n. 40-65 °C:n lämpötilassa, kestää noin 30 sekuntia [7, s. 70]. Alukkeet ovat sekvenssiltään lyhkäisiä verrattuna templaattiin ja pystyvät kiinnittymään nopeammin, eikä templaatin denaturointia ehdi tapahtua [9, s. 107].
3. Vastinjuosteiden synteesi eli pidennys (*extension*), jonka aikana DNA-polymeraasi rakentaa nukleotideistä uuden vastinjuosteen alkaen templaatin 3’-päästä ja päätyen 5’-päähän. Vaihe kestää muutaman minuutin ja lämpötila riippuu käytetystä entsyymistä. [7, s. 70; 9, s. 108.]



KUVA 1 PCR -reaktion vaiheet. Vaiheessa 1 vastinjuosteet denaturoituvat korkeassa lämpötilassa. Vaiheessa 2 lämpötila lasketaan, jolloin alukkeet kiinnittyvät vastinjuosteiden päihin. Vaiheessa 3 lämpötila nostetaan DNA-polymeraasin optimaalialueella ja polymeraasi muodostaa uuden vastinjuosteiden molemmille DNA-säikeille. Mukaeltu Vierstraeten (1999) [17] mukaan.

Syklejä toistetaan yleensä 15-40 kertaa reaktiosta riippuen. Yhden syklin aikana DNA -juosteiden määrä kaksinkertaistuu eli monistuminen tapahtuu eksponentiaalisesti (kuva 2). Ideaalitapauksessa tämä tarkoittaa 10^6 kopion syntymistä. [7, s. 70.] Yleensä syklejä ei suositella toistettavaksi yli 40 kertaa, koska silloin epäspesifisen monistumisen todennäköisyys kasvaa, ja voi johtaa virheelliseen positiiviseen tulokseen.

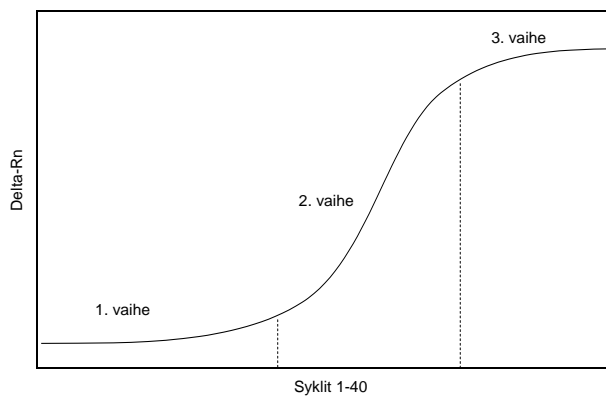


KUVA 2 PCR -reaktion eksponentiaalinen monistuminen. Lähtötilanteessa on yksi kaksoisjuosteinen DNA, josta tulee denaturoinnissa kaksi erillistä DNA -juostetta, 1.syklin jälkeen 4, 2.syklin jälkeen 8, jne. Monistuminen jatkuu eksponentiaalisesti ja teoreettisesti 35. sykli tuottaisi 68 biljoonaa kopiota. Mukaeltu Vierstraeten (1999) [17] mukaan.

2.3 PCR:n kinetiikka

PCR:ssä toistetaan denaturointi-kiinnittyminen-pidennys -syklejä yleensä 15-40 kertaa. Tästä kokonaisuudesta muodostuu kolme eri vaihetta (kuva 3):

1. Varhaiset syklit, jolloin kohde-DNA:ta on vähän suhteessa alukkeisiin. Alukkeet ”etsivät” templaattia, monistuminen on tässä vaiheessa hidasta.
2. Keskivaiheen syklit muodostavat eksponentiaalisen monistumisen vaiheen. Templaattia on reaktiossa enemmän varhaisiin sykleihin verrattuna ja monistuminen on nopeaa.
3. Myöhäiset syklit, jolloin monistuminen loppuu reagenssien rajoittamana (yleensä DNA-polymeraasin) tai reaktioita inhiboivien tekijöiden vaikutuksesta. [11, s. 15-16.]



KUVA 3 PCR -reaktion vaiheet. Varhaisilla sykleillä (1. vaihe) templaattia on vähän ja siksi monistuminen on hidasta. Eksponentiaalisen monistumisen vaiheessa (2. vaihe) reagenssien ja templaatin pitoisuudet ovat optimaaliset monistumiselle, ja vaiheessa 3 reaktio hidastuu inhibition tai jonkin reagenssin loppumisen seurauksena.

2.4 Reagenssit

PCR -reaktioon tarvitaan nukleotidit, alukkeet ja polymeraasientsyymi. Lisäksi menetelmästä riippuen mukana voi olla myös erillinen fluoresoiva koetin ja sisäinen kontrolli.

Nukleotidit ja polymeraasientsyymi voidaan lisätä reaktioon erikseen, mutta nykyään ovat yleistyneet valmiit sekoitukset, jotka sisältävät puskurin, nukleotidit ja polymeraasin samassa liuoksessa [10, s. 26]. (Esim. TaqMan Universal Master Mix, Applied Biosystems; iTaq Supermix With ROX, Bio-Rad Laboratories; Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix, Finnzymes). Valmiit sekoitukset voivat sisältää myös polymeraasientsyymin toiminnalle välttämättömät Mg^{2+} -ionit.

Alukkeiden konsentraatio määritetään kullekin menetelmälle kokemusperäisesti ja suositeltava pitoisuus vaihtelee välillä 0,1 µM – 1 µM. Molempia alukkeita lisätään reaktioon sama määrä. Mikäli alukkeiden konsentraatio on liian korkea suhteessa templaatin konsentraatioon, se voi johtaa primer-dimeerien syntyyn ja epäspesifiseen kiinnittymiseen. [10, s. 34.]

Valmistajat toimittavat alukkeet joko kylmäkuivattuna tai liuotettuna. Kylmäkuivatut reagenssit liuotetaan veteen tai 10 mM Trish-HCl-puskuriin esimerkiksi 10 - 100 pmol/µl pitoisuuteen ja liuosmaiset alukkeet laimennetaan sopivaan konsentraatioon. [10, s. 36.] Konsentraatiota päätettäessä on huomioitava käyttöliuokseen tai reaktioon pipetoitavat määrät, koska 5 µl:aa pienemmät pipetointitilavuudet eivät ole suositeltavia, koska ne voivat aiheuttaa epätarkkuutta [18, s. 1]. Liuokset jaetaan sopiviin tilavuuksiin, koska sulatus ja uudelleenjäädytys lyhentää reagenssien säilyvyyttä, ja säilytetään pakastettuna -20 °C - -70 °C:ssa [10, s. 36; 18 (33), s. 2].

Eri valmistajilta on saatavana valmiita reagenssikittejä useiden eri bakteerien toteamiseksi erilaisista näytematriiseista. Elintarvikepatogeenista voidaan todeta valmiilla kiteillä mm. *Campylocacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter sakazakii* ja *Pseudomonas aeruginosa* (Applied Biosystems) [19]. Suurimmalle osalle bakteereista ei kuitenkaan valmisteta valmiita reagenssikittejä, mutta eri reagenssivalmistajat tarjoavat ilmaisia ohjelmia alukkeiden suunnittelua varten ja PCR -menetelmä voidaankin kehittää periaatteessa mille tahansa bakteerille, jonka nukleinihapposekvenssi on ainakin osittain selvitetty. Alukkeiden sekvenssit voi suunnitella myös itse geenikirjastojen sekvenssikantoja hyödyntäen. Reagenssiluosten valmistukseen ja PCR -menetelmän optimointiin on saatavana ohjeita kirjallisuudesta.

2.5 PCR -reaktion optimointi

Monet tutkimukset ovat osoittaneet PCR -tekniikan tehokkuuden useiden bakteerilajien nopeassa tunnistuksessa. Epäspesifinen kahdentuminen on yksi PCR:n suurista ongelmista ja saattaa johtua esim. liian alhaisesta reaktiolämpötilasta. Tämä saattaa johtaa väärään positiiviseen tulokseen. [14, s.49.] Oikea kiinnittymislämpötila on oleellinen tehokkaan ja spesifisen monistumisen kannalta. Liian matala lämpötila johtaa epäspesifisten DNA-fragmenttien monistumiseen ja liian korkea lämpötila heikentää kohde-DNA:n tuottoa alukkeiden heikon kiinnittymisen vuoksi. [20, s. 6409.]

Reaktion optimoitaviin tekijöihin kuuluu lämpötilan lisäksi kiinnittymis- ja pidennysvaiheiden kestot, templaatin ja alukkeiden suhteelliset määrät ja Mg²⁺-konsentraatio [9, s. 110]. Kaikki polymeeraasit vaativat toimiakseen vapaiden kahdenarvoisten kationien läsnäoloa, yleensä Mg²⁺ -ionien. Jotkut polymeeraasit voivat käyttää myös Mn²⁺-ioneja, mutta kalsium-ionit ovat melko tehottomia. Nukleotidit ja oligonukleotidit sitovat Mg²⁺ -

ioneja, joten ionien konsentraatio täytyy olla suurempi kuin nukleotidien ja alukkeiden fosfaattiryhmien yhteenlaskettu molaarinen konsentraatio. Siksi on mahdotonta määrittellä Mg^{2+} -konsentraatiota, joka olisi optimaalinen kaikissa olosuhteissa. [15, s. 5.] DNA-polymeraasit ovat herkkiä Mg^{2+} -konsentraation vaihteluille ja siksi Mg^{2+} -konsentraatio tulisi optimoida erikseen kullekin templaatti-alkukeyhdistelmälle [9, s. 110].

Reaktion spesifisyyttä voidaan parantaa käyttämällä ”nested” –PCR:ää, jossa monistusreaktio tehdään kaksi kertaa käyttäen eri alukkeita. Ensimmäisellä kerralla monistetaan pidempi DNA -jakso ja toisen monistuskerran alukkeet on suunniteltu tämän pidemmän jakson sisään. Jos ensimmäisessä monistumisessa on tapahtunut epäspesifistä monistumista, saadaan uudella alukeparilla varmistettua, että lopullinen tuote sisältää vain haluttua kohde-DNA:ta. [11, s. 170.]

2.6 Real-time PCR

Real-time eli reaaliaikaisen PCR:n merkittävin ero perinteiseen PCR:ään on mahdollisuus seurata reaktion etenemistä reaaliaikaisesti fluoresoivan merkkiaineen avulla. Tekniikka vaatii optisen yksikön (real-time PCR analysaattorin), joka mittaa kopioiden määrään verrannollista fluoresenssin muutosta, joka ilmoitetaan suhteellisena fluoresenssiyksikkönä, RFU:na (relative fluorescence units). Real-time PCR:n etu perinteiseen PCR:ään verrattuna on se, ettei se vaadi reaktion jälkeisiä analyysejä, mikä nopeuttaa tuloksen saamista ja vähentää eri käsittelyvaiheiden aiheuttamaa kontaminaatoriskiä. [14, s. 50.]

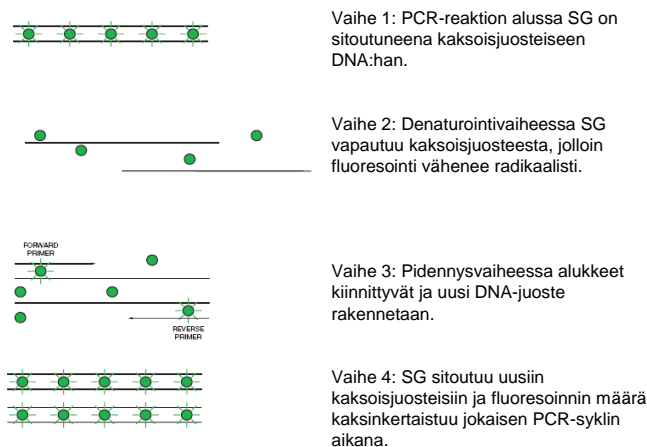
Reaktiossa ilmenevät poikkeamat voidaan havaita real-time PCR:ssä monistumiskäyrän poikkeamina. Lisäksi se mahdollistaa perinteistä PCR:ää tarkemman kvantitatiivisen määrittämisen standardikuvaajan avulla. [14, s.50.]

2.7 Fluoresoivat merkkiaineet

Real-time PCR:n monistumisreaktion etenemistä seurataan erilaisiin tekniikoihin perustuvilla fluoresoivilla merkkiaineilla. Fluoresoiva aine voi olla DNA:han sitoutuva fluoresoiva väri tai fluoresoiva koetin, joka on suunniteltu sitoutumaan tiettyyn kohde-DNA:n sekvenssiin. Kohde-DNA:han sitoutuvat koettimet sisältävät sekä fluoresoivan värin että sammuttavavärin (*quencher*). Vapaana liuoksessa nämä ovat lähellä toisiaan, jolloin fluoresointi on estynyt FRET- (fluoresenssin resonanssienergian siirto) ilmiöön perustuen. Templaattiin kiinnittyminen aiheuttaa värien erkanemisen toisistaan, joka ”vapauttaa” fluoresoinnin. Värit voivat olla kiinnitettynä alukkeeseen tai erikseen suunniteltuun, alukkeiden väliin kiinnittyvään koettimeen. TaqMan Probe ja Molecular Beacon ovat fluoresoivia koettimia. SYBR Green I on DNA:n kaksoisjuosteeseen kiinnittyvä fluoresoiva väri. Scorpion-koettimissa fluoresoiva väri on kiinnitettynä alukkeeseen. [10, s. 212 - 213.]

2.7.1 SYBR Green I

SYBR Green I (SG) on yksi yleisimmin käytetyistä fluoresoivista väreistä [14, s. 50]. Vapaana liuoksessa ollessaan se fluoresoi vain heikosti, mutta PCR -reaktion pidennysvaiheessa se kiinnittyy syntyvän kaksoisjuosteisen DNA:n pieniin uriin ja muuttuu fluoresoivaksi (kuva 4) [10, s. 212]. SG:n avulla voidaan määrittää erilaisten templaattien monistumista niiden sekvenssistä riippumatta, koska se kiinnittyy mihin tahansa kaksijuosteiseen DNA:han. Tämä kuitenkin heikentää spesifisyyttä ja lisää väärin positiivisten määrää, koska epäspesifinen kahdentuminen, esimerkiksi primer-dimeerien synty, aiheuttaa myös fluoresenssin kohoamisen. [14, s. 50; 10, s. 213.] Primer-dimeerien aiheuttama epäspesifinen kahdentuminen voidaan kuitenkin välttää käyttämällä korkeampaa reaktiolämpötilaan, koska primer-dimeereillä on kokonsa vuoksi alhaisempi denaturoitumislämpötila kuin kohde-DNA:lla, ja korkeammassa lämpötilassa primer-dimeerit ovat denaturoituneina, eivätkä siis aiheuta SYBR Green I:n fluoresointia. [10, s. 213.]



KUVA 4 *SYBR Green I* muuttuu fluoresoivaksi kiinnittyessään kaksijuosteiseen DNA:han ja fluoresenssin muutos on suoraan verrannollinen monistumistuotteiden määrään. Mukaeltu Applied Biosystems [21, s. 8].

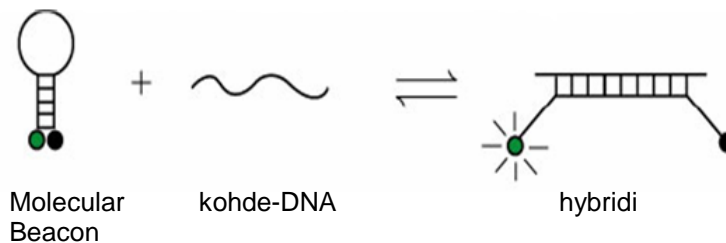
SYBR Green I on monomeerinen syaniiniväri ja sen sitoutuminen DNA:han perustuu osittain SG:n positiiviseen varaukseen ja osittain vapaasti kiertyvillä sidoksilla kiinnittyneisiin aromaattisiin renkaisiin, joiden avulla se kiinnittyy urien kierteisiin rakenteisiin. Vaikka SG sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, sitoutumisessa on todettu eroja G-C- ja A-T -pitoisten alueiden välillä. G-C -pitoisilla alueilla on suurempi negatiivinen potentiaali, jolloin kationiset SG -molekyylit sitoutuvat niihin eri tavalla kuin A-T -pitoisiin alueisiin, joiden negatiivinen potentiaali on heikompi. [22, s. 8.]

SYBR Green I on edullinen vaihtoehto, koska se ei ole sekvenssispesifinen [10, s. 213]. Tämän vuoksi SG:tä ei kuitenkaan voida käyttää multiplex-PCR:ssä eli sen avulla voidaan havaita reaktiossa vain yhden kohde-DNA:n monistuminen. Koska SG sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen

DNA:han, reaktio on optimoitava huolellisesti epäspesifisten monistumistuotteiden välttämiseksi. [16, s. 6.] SG:n etuja sen edullisuuden lisäksi ovat lämpöstabiilisuus ja se, ettei se vaikuta DNA-polymeraasin toimintaan [10, s. 213].

2.7.2 Molecular Beacon

Molecular Beacon –kemian perustuvat koettimet koostuvat yksijuosteisista nukleotidiketjuista, jotka muodostavat varren ja silmukan (kuva 5). Silmukassa on komplementaarinen sekvenssi kohde-DNA:n sekvenssin kanssa ja varren muodostavat päät, jotka ovat keskenään komplementaarisia ja ovat kiinnittyneenä toisiinsa. Fluoresoiva aine on kovalenttisesti kiinnitetty leiman 5'-päähän ja 3'-päähän on kiinnitetty fluoresenssin estävä sammuttaja. Molecular Beacon ei fluoresoi ollessaan vapaana liuoksessa, koska silloin fluoresoinnin estävä aine on fluoresoivan aineen vieressä. Jos kohde-DNA:ta on läsnä, muodostaa silmukkarakenne tämän kanssa hybridin, jolloin silmukkarakenne aukeaa ja fluoresoinnin estävä aine joutuu kauemmaksi fluoresoivasta aineesta, jolloin fluoresointi vapautuu. Silmukkarakenne ja kohde-DNA muodostavat pidemmän ja pysyvämmän hybridin kuin varren nukleotidit, joka aiheuttaa silmukkarakenteen aukeamisen kohde-DNA:n läsnäollessa. [23.]



KUVA 5 *Molecular Beacon koostuu varresta ja silmukasta, sekä fluoresoivasta väristä ja sammuttajaväristä. Kohde-DNA:han liittyessään sammuttaja ja fluoresoiva väri siirtyvät kauemmaksi toisistaan ja fluoresointi vapautuu. [23.]*

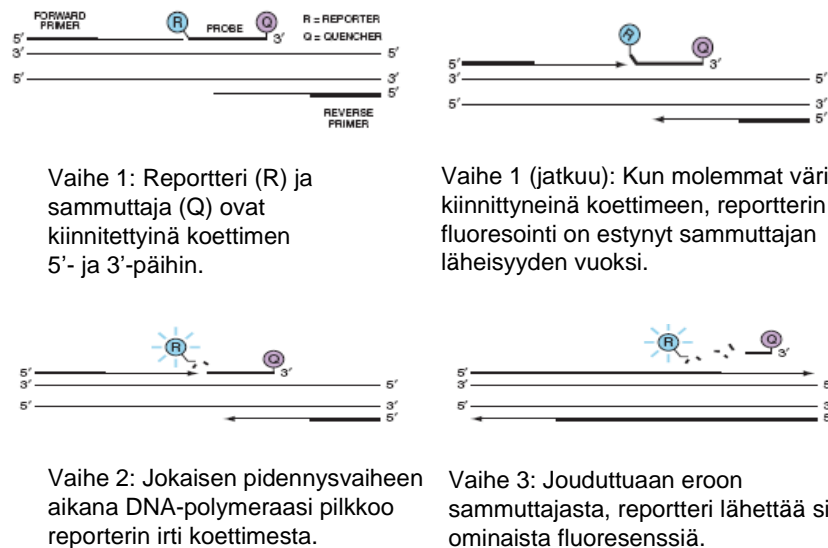
Molecular Beaconit ovat erityisen spesifisiä. Kohde-DNA:han liittyvä silmukkaosan sekvenssi on suunniteltu niin pitkäksi, että se muodostaa juuri ja juuri pysyvämmän hybridin kuin päiden muodostaman varren hybridin on. Siksi jo yhden nukleotidin poikkeama kohde-DNA:sta heikentää hybridin sen verran, että silmukkarakenne säilyy vahvempana, eikä liittymistä synny, jolloin leima ei fluoresoi. [23.] Tämän ominaisuutensa ansiosta Molecular Beacon –koettimet sopivat erityistä spesifisyyttä vaativiin sovelluksiin. Toisaalta tämä tekee koettimen suunnittelun vaativammaksi kuin muilla periaatteilla toimivien koettimien, koska sekvenssin on täysin täsmättävä kohde-DNA:n sekvenssiin tai kiinnittymistä ei tapahdu. [14, s. 50.]

Molecular Beacon –kemialla voidaan syntetisoida leimoja, jotka fluoresoivat eri aallonpituuksilla, jolloin niitä voidaan käyttää myös multiplex-PCR –sovelluksissa. Yhdessä reaktiossa voidaan käyttää jopa seitsemää

eriväristä fluoresenssiä lähettävää leimaa samanaikaisesti eli voidaan todeta seitsemän eri kohde-DNA:n monistuminen. [23.]

2.7.3 Hydrolyysiin perustuvat leimat (TaqMan-probe)

TaqMan –koettimet ovat kaksoisleimattuja hydrolyyttisiä koettimia. Ne ovat 18-22 nukleotidin mittaisia oligonukleotidejä, joiden 5'-päässä on fluoresoiva merkkiaine ja 3'-päässä sammuttaja. TaqMan koettimessa hyödynnetään Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuutta eli kykyä hajottaa nukleinihappomolekyylejä mononukleotideiksi (kuva 6). Koettimen fluoresoiva aine ja sammuttaja ovat liuoksessa vapaana ollessaan lähellä toisiaan, ja sammuttaja estää fluoresoinnin lähes kokonaan lukuun ottamatta vähäistä taustafluoresenssiä. Alukkeet kiinnittyvät kohde-DNA:n päihin ja koetin niiden välissä sijaitsevaan vastinsekvenssiinsä. Polymeerasientsyymi syntetisoi vastinjuosteen kohde-DNA:n 3'-päästä alkaen ja entsyymin 5'-eksonukleaasiaktiivisuus hajottaa koettimen, jolloin sammuttaja ja fluoresoiva merkkiaine erkanevat toisistaan, mikä saa aikaan mitattavan fluoresenssin kasvun. Tämä toistuu jokaisessa PCR -syklissä, eikä kohde-DNA:n määrän lisääntyminen häiritse reaktiota. [24.]



KUVA 6 *TaqMan* –koettimen toiminta. Ehjässä koettimessa reportteri- ja sammuttajaväri ovat lähellä toisiaan ja FRET -ilmiöön perustuen fluoresointi estyy. DNA-polymeraasi pilkkoo kohde-DNA:han kiinnittyneen koettimen, jolloin fluoresoiva väri joutuu erilleen sammuttajasta, ja saa aikaa fluoresoinnin. Mukaeltu Applied Biosystems [21, s. 9].

TaqMan –koettimet ovat spesifisempiä kuin SYBR Green I, mutta eivät kuitenkaan vaadi täydellistä täsmävyyttä kiinnittyäkseen kuten Molecular Beacon –koettimet [14, s. 50].

2.8 DNA:n eristäminen

PCR -menetelmien käyttö patogeenien osoittamiseksi elintarvikenäytteistä on lisääntynyt viimeaikoina, mutta ongelmana ovat lukuisat ja usein tuntemattomat inhibiittorit, jotka voivat olla solun sisäisiä tai ulkoisia, ja voivat johtaa väärään negatiiviseen tulokseen [25, s. 143]. Oikealla DNA:n eristysmenetelmällä saadaan mahdollisimman hyvä DNA-saalis ja poistettua riittävästi inhiboivia tekijöitä.

Klassinen DNA:n eristysmenetelmä sisältää fenoli-kloroformi –uuton ja DNA:n saostamisen etanolilla. DNA:n eristämiseksi on kehitetty nopeampia ja kehittyneempiä menetelmiä, kuten erilaiset kromatografiset menetelmät ja kiinteän faasin erotusmenetelmät. [25, s. 143.] Yksinkertaisimmillaan DNA voidaan eristää hajottamalla solukalvo kuumentamalla, jolloin DNA vapautuu ja samalla lämpöherkät PCR -inhibiittorit tuhoutuvat [26, s. 224].

DNA:n eristysmenetelmät voidaan jakaa viiteen eri ryhmään menetelmällä saavutettavan DNA:n puhtausasteen mukaan (1=puhtain) [27]:

1. Makromolekyylien, kuten DNA:n, kolmiulotteista rakennetta hajottaviin reagensseihin (esim. fenoli/kloroformi) perustuvat menetelmät
2. Sentrifugoitavat kolonnit, joissa DNA:n erottaminen perustuu suodatukseen
3. Piidioksidi-pohjaiset kalvot
4. Magneettikuulat
5. Kuumennus ja sentrifugointi

Vaadittu DNA:n puhtausaste vaikuttaa eristysmenetelmän valintaan. Yleensä puhtaamman tuloksen saamiseksi vaaditaan useampia käsittelyvaiheita, joissa voidaan menettää DNA:ta. Siksi valinnassa on otettava huomioon myös lähtö-DNA:n määrä.

Kaupallisia, erilaisiin menetelmiin perustuvia DNA-eristys- ja puhdistuskittejä on saatavana useilta eri valmistajilta erilaisiin käyttötarkoituksiin mm. näytemateriaalin ja vaaditun puhtausasteen mukaan.

2.9 Inhiboivat tekijät

PCR:n näytemateriaalit ovat peräisin lukuisista eri lähteistä, ja saattavat sisältää useita tunnistamattomia inhiboivia tekijöitä. Eri näytemateriaalit vaativat erilaisia DNA:n eristysmenetelmiä, ja myös näissä voi olla PCR-reaktiota inhiboivia aineita, esim. erilaiset detergentit (puhdistusaineet), jotka on poistettava ennen PCR:ää [10, s. 75-76]. Elintarvikeperäisissä näytteissä inhiboivat tekijät ovat oleellinen PCR:n käyttöä rajoittava tekijä. Siksi PCR:ään perustuvat tekniikat ovat vahvasti riippuvaisia DNA:n eristys- ja puhdistusmenetelmistä. Eristysmenetelmällä pyritään saamaan talteen mahdollisimman paljon DNA:ta ja puhdistuksen tarkoituksena on

poistaa erilaisia inhiboivia tekijöitä mahdollisimman tehokkaasti. [28, s. 76.]

Yhtenä merkittävänä inhibiittoreiden ryhmänä useissa biologisissa näytteissä pidetään DNA-rakennetta tuhoavia entsyymejä. Ulostenäytteissä tunnettuja inhibitiota aiheuttavia aineita ovat sappisuolat, verinäytteissä hemi ja sianlihaperäisissä näytteissä suodattimen läpäisevät lämpökestoiset molekyylit. Näytteestä riippuvaisten erilaisten inhibiittekijöiden vuoksi kullekin näytemateriaalille suositellaan erilaisia PCR:ää edeltäviä toimia, joita ovat rikastus, laimennus, suodatus, sentrifugointi ja absorptio. Rikastus, joka sisältyy lähes kaikkiin ohjeisiin, lisää herkkyyttä ja varmistaa elävien solujen toteamisen. Laimentamista suositellaan vahvasti kontaminoituneille näytteille vähentämään inhiboivien tekijöiden ja ylimääräisen DNA:n osuuden vähentämiseksi. Sentrifugointia käytetään *Y. enterocolitican* konsentroidiin, mutta haittapuolena on inhiboivien tekijöiden samanaikainen konsentroituminen. Suodatusta on käytetty *Y. enterocolitica* –lajien konsentroidiin vesinäytteissä. [26, s. 223.]

Myös rikastusalustojen on todettu inhiboivan PCR reaktiota. Esimerkiksi ITC -liemessä inhibitiota aiheuttaa $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ja TSB -liemessä tryptoni. Myös PSB-liemen Na_2HPO_4 :n on havaittu olevan voimakas PCR -inhibiittori. Alle 2,0 g/l pitoisuuksilla inhiboiva vaikutus on lievä, mutta PSB -liemen pitoisuudella 10,45 g/l inhiboiva vaikutus on voimakas. [29, s. 98, 103.] Liian suuri kohdebakteerin konsentraatio voi olla myös inhibition aiheuttaja. Siksi rikastusvaihe on arvioitava huolella, ja huomioitava esimerkiksi erilaiset viipymäajat eli kasvuympärisöön sopeutuminen ennen varsinaisen kasvun alkamista. [29, s. 103; 7, s. 125.] Käytettäessä ei-selektiivisiä rikastusalustoja myös taustaflooran rikastuminen on voimakasta, jolloin kokonaisbakteeripitoisuus nousee nopeasti inhiboivan tason yläpuolelle ja kohdebakteerin toteamisaika jää lyhyeksi [29, s. 104].

Näytteen laimentaminen on usein tehokas tapa vähentää inhibitiota. Tarkoituksena on saada inhibiittorikonsentraatio niin matalaksi, että se ei häiritse reaktiota. Samalla laimenee myös templaatti, mutta PCR:n eksponentiaalisen monistumisen vuoksi laimenemisen merkitys on vähäinen verrattuna inhibition pienentymiseen. [10, s. 75.]

Inhiboivat tekijät voivat häiritä reaktiota eri tasoilla johtaen polymeraasin alentuneeseen aktiivisuuteen tai estäen sen kokonaan [28, s. 76]. Siksi on tärkeää käyttää reaktion sisäisiä positiivisia kontrolleja, jotta voidaan sulkea pois inhibition mahdollisuus [10, s. 75]. Sisäinen kontrolli on mukana jokaisessa reaktiossa, ja positiivinen tulos osoittaa, että monistumisreaktio on mahdollinen kyseisessä reaktiossa. Negatiivinen tulos on merkki inhibitiosta ja negatiivinen näytetulos voi silloin olla virheellinen.

2.10 PCR -työskentely ja kontaminaatio

PCR -tekniikkaa käytettäessä näytteiden kontaminoitumisvaara aiheutuu pääasiassa kohde-DNA:n joutumisesta tahattomasti näytteeseen sekä sormista irtoavasta DNA:ta tuhoavasta entsyymistä, joka voi tuhota näytteenä

olevan DNA:n ja johtaa väärään negatiiviseen tulokseen. Koska PCR:llä voidaan todeta hyvin pieniä DNA –määriä, se on herkkä myös kontaminaatioille. PCR -työskentelyssä noudatetaan erityistä huolellisuutta ja tietyt varotoimia kontaminaatioiden aiheuttamien väärin tulosten ehkäisemiseksi. [9, s. 112.] PCR -työskentelyä varten tulisi olla oma erillinen tila tai ainakin muusta laboratoriosta eristetty alue, jossa on UV-valolla varustettu laminaarivirtauskaappi reaktioseosten tekoa ja PCR -pipetointeja varten [15, s.16]. Pipettien välityksellä saattaa levitä DNA:ta, jos liuoksia joutuu pipettien sisäosiin. Siksi onkin suositeltavaa käyttää suodattimella varustettuja kärkiä ja noudattaa varovaisuutta pipetinkärkien poistamisessa, ettei roiskeita joudu ympäristöön. Reagenssiseoksia valmistetaan vain kerralla tarvittava määrä ja loput hävitetään. [9, s. 112.] PCR -työskentelyssä tarvittavat välineet, pipetit, pipetinkärjet, kertakäyttökäsi- neet, mikroputket ja telineet säilytetään vetokaapissa, eikä niitä siirrellä muualle ja käytetä muihin tarkoituksiin. UV-valo tuhoaa DNA:ta ja se on tehokas keino tuhota mahdolliset DNA-jäämät vetokaapin pinnoilta, pipe- teistä ja muista välineistä. [15, s. 16-17.]

Real-time PCR:ssä kontaminaatoriski on pienempi, koska monistaminen tapahtuu suljetuissa mikrokyveteissä, eikä niitä tarvitse aukoa ajon jäl- keen. Perinteinen PCR vaatii monistetun DNA:n käsittelyä, jolloin suuria määriä templaatti-DNA:ta sisältäviä putkia joudutaan aukomaan, mikä li- sää riskiä DNA:n joutumisesta ympäristöön ja kulkeutumisesta seuraavaan PCR -ajoon.

3 *YERSINIA ENTEROCOLITICA* JA SEN OSOITTAMINEN

Yersiniat ovat gram-negatiivisia, oksidaasi-positiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia sauvoja [2, s. 189]. Ne kuuluvat *Enterobacteriaceae* – heimoon. *Yersinia*-sukuun kuuluu yhteensä 12 lajia, joista osan (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis*) on todettu olevan patogeenisia, mutta muiden lajien patogeenisyydestä ei ole riittävää tutkimustietoa (esim. *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*). Yersiniat pystyvät lisääntymään laajalla lämpötila-alueella (-2 °C- +45 °C), joten ne pystyvät lisääntymään myös jääkaappilämpötilassa. [30, s. 2.] Yersiniat aiheuttavat suolistotulehdusta, yersinioosia, jonka oireita ovat vatsakipu, ripuli ja lievä kuume. Sairastuneista 2-3 % saavat jälkitautina reaktiivisen niveltulehduk- sen, joka saattaa kestää kuukausia ja muuttua krooniseksi. [4, s. 110.]

Y. enterocolitica-laji on heterogeeninen ryhmä, joka jaetaan kuuteen bio- tyyppiin (1A, 1B, 2, 3, 4 ja 5) ja edelleen useisiin serotyyppeihin [31, s.259; 26, s. 220]. Näistä vain harvojen on todettu olevan virulentteja ja aiheuttavan sairauksia ihmiselle. Suurin osa sairauksia aiheuttavista su- vuista kuuluu bioserotyyppeihin 1B/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9, 3/O:3 ja 4/O:3. Kaikille virulenteille tyypeille yhteistä on niiden 64-75 kb:n pituinen plasmidi, pYV (plasmid for *Yersinia* Virulence). Plasmidin tiedetään edis- tävän *Y. enterocolitica*-kantojen sopeutumista korkeampaan lämpötilaan (+37 °C). Useat ulkokalvon proteiinit esiintyvät plasmidin läsnäollessa +37° C:n lämpötilassa, mutta eivät +25 °C:n lämpötilassa. Plasmidin gee- nien *virF* ja *yadA* koodaamien proteiinien avulla *Y. enterocolitica* pystyy

ohittamaan isäntänsä puolustusjärjestelmän ja tunkeutumaan isäntäsoluun. [31, s.258-259.] Yersiniat ovat liikkuvia kasvaessaan alle +30 °C:n lämpötilassa, mutta liikkumattomia +37 °C:ssa [2, s. 189].

3.1 *Y. enterocolitica* suomalaisessa elintarvikehygieniassa

Suomessa raportoitiin vuonna 2006 yhteensä 42 elintarvikeperäistä ruokamyrkytys epidemiaa ja yhteensä noin 1700 henkilön oli ilmoitettu sairastuvan elintarvikkeiden välityksellä. Näistä suuria, yli 100 sairastuneen epidemioita oli kolme, jotka olivat kaikki kasvisten aiheuttamia. Kasvikset olivat suurin elintarvikevälitteisten ruokamyrkytysten aiheuttaja ohittaen ensimmäistä kertaa lihan ja lihatuotteet merkittävimpänä epidemioita aiheuttavana ryhmänä. [1, s. 15, 26.] Tämän on arvioitu johtuvan osittain lisääntyneestä kasvisten käytöstä ja käsittelyprosessien muuttumisesta. Kasviksia käsitellään suurissa laitoksissa ja toimitetaan suurina erinä joukkoruokailupaikkoihin, esim. kouluihin, jolloin mahdolliset ongelmat koskettavat suuria ryhmiä. [32.] Noin kolmasosassa elintarvikevälitteisistä epidemioista välittäjäelintarviketta ei pystytty jäljittämään [1, s. 26].

Yersinia on salmonellan ja kamylobakteerin jälkeen kolmanneksi yleisin suolistoinfektioita aiheuttava bakteeri Suomessa. *Yersinia*-infektioista oli vuonna 2004 *Y. enterocolitican* aiheuttamia 81 % ja *Y. pseudotuberculosis*-lajin aiheuttamia 19 %. [30, s. 1.] Vuonna 2006 elintarvikevälitteisissä ruokamyrkytys epidemioissa norovirus ja *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*) aiheuttivat eniten sairastumisia. *Yersinia* aiheuttamat epidemiat olivat lähtöisin kotimaisista varastoiduista porkkanoista. [1, s. 15, 19.]

Y. enterocolitican kyky lisääntyä jääkaappilämpötilassa ja pitkät säilytysajat voivat johtaa ruokamyrkytyksen aiheuttaviin bakteeripitoisuuksiin elintarvikkeissa [30, s.2]. Infektiivistä annosta ei tunneta, mutta sen oletetaan olevan pieni. *Y. enterocolitica* pystyy kasvamaan happamassa ympäristössä (pH 4,2) ja kestää myös emäksisyyttä paremmin kuin muut gram-negatiiviset bakteerit. *Y. enterocolitica* kestää pakastusta ja lisääntyy myös tyhjiöpakkauksissa. Bakteeri tuhoutuu +60 °C:ssa 1-3 minuutissa. [4, s. 110-111.]

Patogeenisen *Y. enterocolitican* osoittamiseen elintarvikkeista ei ole luotettavaa viljelymenetelmää ja PCR -menetelmiä on käytössä lähinnä tutkimustarkoituksissa. Siksi *Y. enterocolitican* esiintymistä elintarvikkeissa on tutkittu vain vähän, eikä esim. bakteeripitoisuuksia ole pystytty määrittämään. [4, s. 112.]

3.2 *Y. enterocolitican* osoittamisen erityispiirteitä

Yersinia enterocolitica on merkittävä yersinioosia aiheuttava patogeeni sekä eläimillä että ihmisillä. Sika on pääasiallinen kantaja yleisimmin ihmisestä löytyvälle patogeeniselle serotyypille O:3. *Y. enterocolitica* pidetään merkittävänä elintarvikeperäisenä patogeenina, vaikka sitä pystytäänkin vain harvoin eristämään elintarvikkeista, mikä johtunee osaksi vil-

jelymenetelmien rajallisesta herkkyudesta. Viimevuosina on kehitetty useita DNA-tekniikoihin, mm. PCR:ään perustuvia tekniikoita *Y. enterocolitican* viljelymenetelmiä nopeampaan ja herkempään osoittamiseen. PCR:n on osoitettu olevan jopa 10 000 kertaa herkempi kuin perinteisen viljelymenetelmän *Y. enterocolitican* osoittamisessa elintarvikeperäisissä näytteissä. [26, s. 220, 225.]

Y. enterocolitica on yleinen bakteeri ympäristössämme. Koska laji on heterogeeninen, on eristetyistä kannoista määritettävä patogeenisyys. Tämä on mahdollista useilla fenotyypisillä testeillä, mutta ne ovat aikaavieviä, eivätkä aina luotettavia. PCR ja muut DNA-tekniikat perustuvat tietyn patogeenisuutta aiheuttavan geenin, esim. plasmidin *yadA*-geenin tai kromosomaalisen *ail*-geenin ilmenemiseen, ja ovat siksi erittäin spesifisiä. [26, s. 220.]

Y. enterocolitican aiheuttamat infektiot ovat epidemiologialtaan monimutkaisia ja heikosti tunnettuja, lisäksi infektiot esiintyvät usein satunnaisesti ja tartunnan lähde jää tunnistamatta. Eristettäessä *Y. enterocoliticaa* ongelmana on usein patogeenien vähäinen määrä suhteessa taustaflooraan, joka on ongelma erityisesti elintarvike- ja ympäristönäytteissä. Suora eritys selektiivisestäkään alustasta harvoin onnistuu ja tämän vuoksi aikaavievä rikastus on yleensä välttämätön. Selektiivisillä rikastusliemillä pyritään saamaan olosuhteet *Y. enterocoliticaalle* suotuisiksi ja taustakasvua ehkäiseviksi. [26, s. 220.] Herkkiä PCR -menetelmiä käytettäessä rikastusvaiheella ehkäistään väärin positiivisten tulosten saanti, koska PCR -menetelmä monistaa myös kuolleista soluista peräisin olevaa DNA:ta.

3.3 *Y. enterocolitican* osoittaminen PCR -tekniikalla

Y. enterocolitican tunnistamiseksi on kehitetty useita PCR -menetelmiä, sekä perinteiseen että real-time PCR:ään perustuvia. Monet perustuvat plasmidin geenien, *yadA*:n ja *virF*:n tunnistamiseen, jotka ovat välttämättömiä bakteerin virulenssille. Bakteeri saattaa kuitenkin menettää plasmidinsa esim. säilytyksen aikana, joten myös kromosomaalisiin geeneihin perustuvia menetelmiä on kehitetty. Patogeenisillä *Y. enterocoliticoilla* esiintyvä *ail*-geeni on näistä yleisimmin käytetty. Yhdistelmätekniikoissa voi kohteena olla kaksi geeniä, usein plasmidin *virF* ja lisäksi kromosomaalinen *ail*, jonka avulla havaitaan myös pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) -negatiiviset kannat. [26, s. 222.]

Y. enterocolitican osoittamiseen perinteisellä PCR -menetelmällä on kehitetty virallisia ohjeita, mm. NMKL:n menetelmä Nr. 163 1998 [5], mutta real-time PCR –menetelmän standardointi on vielä kesken. NMKL:n menetelmäohjeessa on kaksi vaihtoehtoista menetelmää, joista toinen on yksivaiheinen ja perustuu *ail*-geenin tunnistamiseen, ja toinen on kaksivaiheinen (nested-PCR) menetelmä, jossa kohde-DNA:na on plasmidin *yadA*-geeni. Monistumistuote todetaan geielektroforeesi-menetelmällä [5, s. 1, 13.]

3.4 Mikrobiologisen menetelmän validointi

Validointi on osa standardointia ja sen tarkoituksena on osoittaa, että uudella menetelmällä saatavat tulokset ovat nykyiseen referenssimenetelmään verrattuna yhtä hyviä tai parempia. Lisäksi validoinnin tavoitteena on osoittaa menetelmän spesifisyys ja toistettavuus käytettäessä uutta menetelmää muissa laboratorioissa. Yleinen menetelmä validointidatan keräämiseen on testata menetelmä useissa eri laboratorioissa identtisillä materiaaleilla valvontalaboratorion kontrollissa. [8, s. 45.]

Validointiprosessissa on tärkeää, että toimitaan todellisuutta vastaavissa olosuhteissa, esimerkiksi käyttämällä luonnollisesti kontaminoituneita näytteitä [8, s.45].

Validointi jakaantuu kahteen vaiheeseen:

1. Tutkimukset, joissa uutta menetelmää verrataan nykyiseen referenssiin käyttämällä sekä keinotekoisesti että luonnollisesti kontaminoituneita näytteitä.
2. Laboratorioiden väliset vertailututkimukset uudella menetelmällä. [8, s. 45.]

Mikrobiologiset menetelmät jaetaan kvalitatiivisiin ja kvantitatiivisiin menetelmiin. Erityyppisten menetelmien testaukset poikkeavat toisistaan ja molempien menetelmien validoinnille on määritelty omat tunnuspiirteensä. [33, s. 5.]

Kvalitatiiviset menetelmät:

1. Suhteellinen selektiivisyys
2. Suhteellinen tarkkuus
3. Suhteellinen havaitsemiskynnys
4. Suhteellinen sensitiivisyys
5. Suhteellinen spesifisyys

Kvantitatiiviset menetelmät:

1. Suhteellinen selektiivisyys
2. Suhteellinen tarkkuus
3. Toistettavuus (samat laitteet ja olosuhteet, pieni aikaväli)
4. Toistettavuus (eri laitteet, eri käyttäjät)
5. Suhteellinen standardista poikkeaminen

4 *YERSINIA ENTEROCOLITICA* –PCR -MENETELMÄN KEHITTÄMINEN

4.1 Tutkimuksen tavoite

Tutkimuksen tavoitteena oli soveltaa kasvisnäytteille *Yersinia enterocolitica* real-time PCR –osoitusmenetelmää. Työn aihe saatiin Hämeenlinnan seudun kansanterveystyön kuntayhtymän ympäristö- ja elintarvikelaboratoriosta Tavastlabista. Laboratoriolla oli tarkoitus hakea akkreditointia kehitettävälle real-time PCR -menetelmälle. Laboratoriossa on käytössä ISO 10273: 2003 menetelmästä muunneltu, akkreditoitu viljelymenetelmä *Y. enterocolitica* osoittamiseksi, mutta viljelymenetelmällä vastauksen saaminen kestää jopa kaksi viikkoa. Käytössä olevan menetelmän heikkouksia ovat myös korkea toteamisraja sekä sen työläys.

Tässä työssä käytetty real-time PCR –menetelmä oli kehitetty ja menetelmän spesifisyys oli testattu Ruotsissa SLV:ssä (Statens Livsmedels Verket) 116 *Y. enterocolitica* –kannalla, 15 muulla *Yersinia* –kannalla sekä 20 muulla bakteerikannalla (viite: Thisted Lambertz, S., Nilsson, C., Hallanvuo, S., & Lindblad, M., A real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food, lähetetty julkaistavaksi). Kattavan validointiaineiston ansioista menetelmä on alustavasti hyväksytty kehitteillä olevan ISO -standardin pohjaksi.

Menetelmään kuului 24 tunnin rikastusvaihe TSBY -liemessä, ja kehittämistyöhön sisältyi neljän eri DNA:n eristysmenetelmän vertailu. Tavoitteena oli valita neljästä eristyskitistä paras suhteuttaen hinta ja työläys sekä määrittää menetelmän lineaarisuus ja toteamisraja, jonka tavoitteena oli alle 10 pmy/25 g:n näyte. Menetelmän kehittämiseen kuului myös reaktion tehokkuuden määrittäminen.

Menetelmän kehittäminen on edellytys sille, että PCR -menetelmä voidaan validoida ja hakea sille akkreditointia. Validoinnin edellyttämät kokeet menetelmän toistettavuudesta ja vastaavuudesta referenssimenetelmään suoritettiin tässä työssä tehdyn kehittämistyön jälkeen.

4.2 Materiaalit ja menetelmät

4.2.1 Bakteerikanta ja elatusalustat

Testauksissa käytettiin Kansanterveyslaitoksen kantakokoelmasta lähtöisin olevaa, potilaasta eristettyä serotyypin O:3 *Y. enterocolitica* –kanta TA-VA 25, jota säilytettiin -70 °C:ssa. Kanta elvytettiin laboratoriossa rutiinisti neljän viikon välein verimaljalle ja siirrostettiin viikon välein uudelle maljalle.

Bakteeripitoisuuksien määrittämisessä käytettiin veriagarua (Oxoid, CM0271), johon oli lisätty 7 % steriiliä naudanverta (Bio Trading) ja *Y. enterocolitica* – selektiivistä CIN -agarua (Oxoid, CM0653) täydennettynä *Yersinia*-selektiivisellä antibioottisella (Cefsulodin, Irgasan ja Novobiocin).

Rikastusliemenä käytettiin BHI (Brain Heart Infusion broth; Oxoid, CM0225) –lientä ja TSBY (Tryptone Soya broth + Yeast, Oxoid, CM0129 ja LP0021) –lientä. BHI -lientä käytetään laboratoriossa yleisesti elvytetäessä pakastettuja bakteerikantoja ja TSBY -lientä rikastettaessa *Y. enterocolitica* PCR:ää varten. Referenssinä olleessa viljelymenetelmässä käytettiin ohjeenmukaista rikastuslientä.

4.2.2 Salaatti ja ympit

Kasvisnäytteiksi valmistettiin porkkana-jäävuorisalaatti, jonka annettiin seistä jääkaapissa kolme vuorokautta, jotta näytteet sisältäisivät myös taustakasvua. Tämän jälkeen näytteet punnittiin valmiiksi 25 g filtteripusseihin ja pakastettiin -20 °C:ssa. Näytteiden kokonaisbakteeripitoisuus oli 6,5 milj. pmy/g. Kokeita tehtiin myös lehtisalaatilla, jonka kokonaisbakteeripitoisuus oli 150 000 pmy/g. Viimeisessä ajossa käytettiin tulosten vertailun vuoksi myös muita elintarvikematriiseja (raakamaito, keittokinkku, kaivovesi ja jauheliha). Näytteiden kokonaisbakteeripitoisuudet määritettiin mukaellulla standardiviljelymenetelmällä [34].

Salaattien ympäystä varten *Y. enterocolitica* TAVA 25 -kanta oli rikastettu liemiviljelmässä ja pakastettu 20 %:ssa kuoritussa maidossa n. 2 ml:n annoksina. Ennen pakastusta pitoisuus oli määritetty, mutta se varmistettiin jokaisen ympäyksen kohdalla erikseen mahdollisten pitoisuusvaihtelujen vuoksi. Ympäyksiin käytettiin myös laimennussarjoja, jotka valmistettiin puhdasviljelmästä rikastetusta *Y. enterocolitica* TAVA 25 –kannasta.

4.2.3 Näytteiden valmistaminen

Näytteitä valmistettiin rikastetuista puhdasviljelmistä sekä ympätyistä kasvisnäytteistä. Puhdasviljelmän rikastus tehtiin *Y. enterocolitica* TAVA 25 –kannasta ympäemällä maljalta yksi pesäke 9 ml:aan BHI- tai TSBY lientä ja inkuboimalla 24 ±3 tuntia +25 °C:ssa. DNA eristettiin joko suoraan rikastusliemestä tai siitä tehdystä laimennussarjasta. Laimennussarja tehtiin valmiisiin 9 ml:n peptonipurkkeihin (Dilucup). Bakteeripitoisuus määritettiin laimennussarjasta viljelymenetelmällä.

Salaattinäytteet ympättiin joko laimennussarjan eri laimennuksilla tai kuoritussa maidossa pakastetulla valmiilla ympäliuoksella. Pakastetun ympin pitoisuus tarkistettiin jokaisella kerralla viljelymenetelmällä. Filtreripusseihin punnitut salaattinäytteet sulatettiin huoneenlämmössä ja ympättiin sopivalla tilavuudella bakteerisuspensiota. Näytteet sekoitettiin käsin pu-

ristelemalla ja annettiin tasaantua 15 min. Rikastuslientä lisättiin lopputilavuuteen 225 ml ja sekoitettiin stomacherilla 1 min. Näytteitä rikastettiin 24±3 tuntia +25 °C:ssa. Ennen näytteen pipetointia DNA-eristykseen ne sekoitettiin varovasti käsin ja annettiin laskeutua noin 15 min, jotta eristykseen saatiin pipetoitua pinnasta mahdollisimman kirkasta lientä.

4.2.4 Negatiiviset kontrollit

PCR -ajoissa käytettiin negatiivisina kontrolleina steriiliä ultrapuhdasta vettä, valmistajan kitin vettä sekä rikastus- ja eristysvaiheet läpikäynyttä siirrostamatonta rikastuslientä. Jokaisessa ajossa oli mukana vähintään kuusi negatiivista kontrollia, joista ainakin kaksi rinnakkaista steriiliä ultrapuhdasta vettä.

Negatiivisina näytekontrolleina käytettiin ympäristöä salaattinäytteitä, jotka käsiteltiin samoin kuin ympätyt näytteet. PCR- ajoissa näytekontrollit käsiteltiin muiden näytteiden tavoin.

4.2.5 PCR -reagenssit

PCR -reaktioissa käytettiin seuraavia Applied Biosystems'n reagensseja:

- TaqMan® Universal Master Mix
- TaqMan® MGB Probe
- Sequence detection primer
- 10X Exo IPC Mix
- 50X Exo IPC DNA

4.2.5.1 Alukkeet ja koetin

Yersinia enterocolitica osoittamiseen PCR:llä ei ole saatavana valmista kittiä, joten alukkeet ja koetin tilattiin suunnitellun sekvenssin mukaan reagenssivalmistajalta. Menetelmän kehittämisessä saatiin apua SLV:n Mikrobiologisesta yksiköstä, josta saatiin valmiiksi suunnitellut ja testatut sekvenssit alukkeille ja koettimelle sekä näiden molaariset pitoisuudet näyttereaktiossa.

Kohdetemplaatin koettimessa käytettiin FAM -leimaa, jonka mitattu fluoresenssin muutos on suoraan verrannollinen monistuneen DNA:n määrään.

4.2.5.2 Sisäinen positiivinen kontrolli (IPC)

Sisäisenä kontrollina käytettiin IPC:tä (TaqMan Exogenous Internal Positive Control) (Applied Biosystems). IPC-reagenssia pipetoitiin normaalissa PCR -ajossa jokaiseen näytekaivoon, myös negatiivisiin kontrolleihin. IPC:n koettimessa käytetään VIC -leimaa, jonka avulla monistuminen havaitaan. [35, s. 1.]

IPC kittiin kuuluu IPC Mix, joka sisältää IPC alukkeet ja koettimen, IPC Block, joka estää IPC:n monistumisen (käytettiin IPC -estetyissä negatiivisissa kontroleissa) ja IPC DNA, joka on IPC templaatti-DNA:ta. [35, s.4]. 50 µl:n reaktiutilavuuteen valmistaja suosittelee 5 µl:aa IPC Mixiä ja 1 µl:aa IPC DNA:ta. Kokeet suoritettiin 25 µl:n reaktiutilavuudessa ja IPC-kontrollin konsentraatio puolitettiin valmistajan antamasta ohjeesta.

4.2.5.3 Reagenssien liuotus ja laimentaminen

Liuotustilavuudet ja laimennuskertoimet ns. varastoliuoksen (stock) valmistamiseen laskettiin valmistajan ohjetta mukaellen 25 µl:n lopputilavuudelle (taulukko 1). SLV:sta saadun ohjeen mukaan reaktiossa olevien pitoisuuksien tuli olla alukkeille 900 nM ja koettimelle 200 nM yhdessä reaktiossa. Tämän perusteella laskettiin sopivat liuotus- ja laimennusmäärät ottaen lisäksi huomioon, ettei pipetoitavaksi tulisi alle 5 µl:n tilavuuksia, koska pienemmissä tilavuuksissa epätarkkuus voi nousta häiritseväksi.

TAULUKKO 1 *Yhteen reaktion näyte- ja reagenssitilavuudet. Reagenssit sekoitettiin yhdeksi liuokseksi, jota pipetoitiin 20 µl kuhunkin reaktioon.*

Reagenssi	määrä µl/reaktio
TaqMan Universal PCR MasterMix	12,5
Primer 1	2
Primer 2	2
Probe	2
10X Exo IPC Mix	1,25
50X Exo IPC DNA	0,25
Reagenssit yhteensä	20
Näyte	5
Lopputilavuus	25

TE-low –puskuriin (1 mM EDTA, 1 mM Tris-HCl, pH 8,0) liuotetut alukkeet ja laimennettu koetin jaettiin sopiviin annoksiin eppendorf-putkiin ja pakastettiin. Valmiita liuoksia ei saanut sulattaa ja pakastaa uudelleen yli viittä kertaa, joten annosmäärät laskettiin arvioidusta näytemäärästä ajokertaa kohden tämän mukaan.

Jokaista näyteajokertaa varten valmistettiin siinä tarvittava määrä MasterMixiä, johon sekoitettiin kaikki reagenssit. Valmiille sekoitukselle ei ole määritetty säilyvyysaikaa, joten jäljelle jäänyt MasterMix hävitettiin jokaisen PCR -pipetointivaiheen jälkeen.

4.2.6 DNA:n eristysmenetelmät

DNA:n eristämiseen käytettiin seuraavia kittejä:

- PrepMan™ Ultra, Applied Biosystems [6]

- PrepMan™ Ultra + DNA-saostus, Applied Biosystems [6]
- MasterPure™ DNA Purification Kit, Epicentre Biotechnologies [36]
- JetQuick Tissue DNA Spin Kit, GENOMED GmbH [37]

Eristykset suoritettiin valmistajien ohjeiden mukaan, paitsi käytettäessä PrepMan Ultran DNA-saostusta näytteet liuotettiin ohjeesta poiketen TE-low –puskuriin näytteiden säilyvyyden parantamiseksi ja MasterPure –kittiä käytettäessä etanoli jäähdytettiin -20 °C vaikutuksen tehostamiseksi. Lisäksi MasterPure –ohjeessa suositeltiin kylmäseentrifugointia, mutta näytteet jäähdytettiin ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä. PrepMan Ultran DNA-saostus tehtiin kitin ohjeen mukaan.

4.2.7 PCR -laite ja ajot

PCR-ajot suoritettiin Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System -laitteella. Laitteessa voi käyttää joko 96-kuoppalevyä tai 0,2 ml mikrokyvettejä. Suositeltava näytetilavuus on 20-100 µl ja mahdollinen lämpötilavaihtelu +4 °C - +100 °C. [38.]

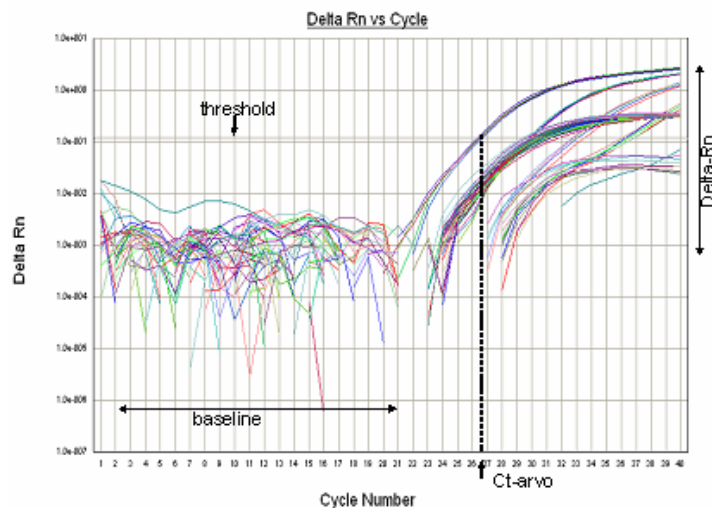
PCR -ajot luotiin laitteen Sequence Detection Software (SDS) 1.3.2 -ohjelmalla. Ajoihin käytettiin kahta erilaista mittausmenetelmää riippuen siitä, oliko mukana IPC -kontrolli vai ei. Jos IPC -kontrollia ei ollut mukana, valittiin AQ-ajo (Absolute Quantification), jos taas käytettiin IPC -kontrollia, ajo suoritettiin PlusMinus Amplification -ajona.

Laite määrittää kullekin kuoppalevyn mittauspaikalle eli kaivolle käytetyn fluoresoivan leiman aikaansaaman fluoresenssimuutoksen. IPC:n kohde-DNA:n koettimessa käytettiin VIC -leimaa ja *Y. enterocolitica* vastavasti FAM -leimaa. Leimat fluoresoivat tyypillisellä aallonpituudellaan, joka mahdollistaa signaalien erottamisen detektiovaiheessa. Jokaiselle mittauspaikalle määritettiin myös sen ”tehtävä” (*task*), joka määräytyi sen mukaan, oliko mittauspaikalla estetty IPC -kontrolli, negatiivinen vesikontrolli vai näyte. Ajona käytettiin kaksivaiheista ohjelmaa: 15 s +95 °C ja 60 s +60 °C. Lisäksi jokaisen ajon alkuun kuului 10 min vaihe +95 °C:ssa. Syklimääräksi asetettiin 40 tai 45 sykliä. Näytetilavuus oli 25 µl ja näytteet ajettiin 3-5 rinnakkaisena jokaisessa ajossa.

4.2.8 PCR -analyysitulosten käsittely

PCR -ajon valmistuttua tuloksia tarkasteltiin ohjelman tulosvalikosta. Ohjelmalla voitiin määrittää automaattisesti perustaso (baseline) ja threshold-arvo (kuva 7). Arvot voitiin asettaa myös manuaalisesti. Baseline määritettiin asettamalla sille alkamis- ja päättymissyklit, joiden väliseltä matkalta laite määrittä perustason, josta fluoresenssin muutos (delta-Rn) mitattiin. Threshold on raja, jonka ylittävät monistumiskuvaajat saavat positiivisen tuloksen. Alustavassa tarkastelussa havainnollisin oli kuvaaja, jossa x-akselilla on syklinumero ja y-akselilla delta-Rn –arvo (kuva 7). Threshold asetettiin eksponentiaalisen monistumisen vaiheeseen niin, että selvistä

positiivisista näytteistä saatiin mahdollisimman suurella todennäköisyydellä positiivinen tulos, kuitenkin poissulkien epäspesifisestä kiinnittymisestä aiheutuvien fluoresenssimuutosten aiheuttamat väärät positiiviset tulokset. Ruotsissa SLV:ssä lihanäytteillä tehdyssä validoinnissa threshold-arvoksi oli asetettu 0,20, jota käytettiin suuntaa-antavana tasona tulosten tarkastelussa. Tuloksia tarkasteltiin fluoresenssin muutoksena perustasoon (delta-Rn) sekä syklinumerona, jolloin threshold ylittyy (Ct-arvo).



KUVA 7 *Real-time PCR:n monistumiskuvaajasta tulkitut parametrit. Baseline määrittää tason, johon fluoresenssin muutosta (delta-Rn) verrataan. Threshold-ajan ylittävät kuvaajat saavat positiivisen tuloksen, joka ilmoitetaan Ct-arvona eli syklinumerona, jolloin ylittyminen tapahtuu. Monistumiskuvaajat voitiin erotella kaivokohtaisesti omilla värillään tai mitattavan leiman perusteella (*IPC/Y. enterocolitica*).*

4.2.9 Esiajo PCR -komponenttien testaamiseksi

Esiajossa näytteinä käytettiin BHI -liemessä rikastetusta puhdasviljelmästä tehdyn laimennussarjan eri laimennuksista PrepMan Ultra –reagenssilla eristettyä DNA:ta. Määritettävänä olivat näytteet, joiden *Y. enterocolitica* –pitoisuudet vastasivat tasoja 10^0 - 10^4 pmy/ml.

PCR -ajoa varten näytteistä tehtiin 1:10 laimennokset steriiliin ultrapuh- taaseen veteen. Näytteet laimennetaan normaalisti inhiboivien tekijöiden vaikutuksen pienentämiseksi, mutta koska puhtaasta rikastusliemestä tehdyn laimennussarjan näytteissä näitä ei oletettu olevan, PCR -ajo tehtiin vertailun vuoksi myös laimentamattomista näytteistä. IPC -kontrolli korvattiin häiriötekijöiden minimoimiseksi vedellä ja ajo suoritettiin AQ (Absolute Quantification)-ajona.

4.2.10 Reaktion tehokkuuden määrittäminen

PCR -reaktion tehokkuus määritettiin DNA-laimennussarjasta tehdyn regressiosuoran kulmakertoimen avulla eli mitattavana oli tasaisesti aleneva sarja yhdestä eristyksestä tehtyjä DNA-laimennuksia. Suhteellisista DNA-

pitoisuuksista ja niitä vastaavista Ct-arvoista muodostettiin regressiosuora puolilogaritmiselle asteikolle. Teoreettisessa 100 % tehokkuudessa jokaisen syklin aikana monistettava tuote kaksinkertaistuu ja suoran kulmakerroin on -3,32. Jos kulmakerroin on tätä pienempi (”enemmän negatiivinen”), tehokkuus on huonompi kuin 100 %. Suurempi kulmakerroin on merkki ongelmista pipetoinnissa tai näytteessä. [39, s. 12.]

Tehokkuus E (efficiency) laskettiin kaavalla [39, s.13]:

$$E = (10^{-1/kk} - 1) \times 100 ,$$

jossa *kk* on suoran kulmakerroin.

Pisteiden asettumista suoralle arvioitiin korrelaatiokertoimen (R^2) avulla, joka määritettiin taulukkolaskentaohjelman (Excel) avulla. Korrelaatiokerroin voidaan laskea myös kaavalla:

$$R^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Menetelmän tehokkuuden määrittämiseksi tehtiin ajot kahdesta DNA-laimennussarjasta. Ensimmäisessä ajossa IPC -kontrolli korvattiin vedellä ja toisessa ajossa IPC -kontrolli oli mukana. Ensimmäiseen ajoon DNA eristettiin PrepMan Ultra -reagenssilla laimennussarjan laimennuksesta 10^{-3} ja toiseen ajoon suoraan TSBY -rikastusliemestä PrepMan Ultralla jatkettuna DNA-saostuksella. DNA-laimennussarja tehtiin pipetoimalla 10 µl näytettä 90 µl:aan steriiliä ultrapuhdasta vettä, ja menetelmän tehokkuus määritettiin ilman IPC -kontrollia DNA-laimennuksista 10^{-4} - 10^{-10} ja IPC -kontrollin kanssa laimennuksista 10^{-3} - 10^{-10} .

4.2.11 Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen

Lineaarisuudella tarkoitetaan Ct-arvojen suhdetta logaritmisesti kasvavaan eristettyyn tai lisättyyn bakteerimäärään. Menetelmän lineaarisuus määritettiin pitoisuudeltaan tunnetun puhdasviljelmän laimennussarjasta ja salaattinäytteistä, joihin oli lisätty logaritmisesti kasvava bakteerimäärä.

Puhdasviljelmän laimennussarjasta DNA eristettiin PrepMan Ultra -reagenssilla laimennuksista, jotka vastasivat *Y. enterocolitica*-pitoisuustasoja 10^0 - 10^6 pmy/ml. PCR -pipetointivaiheessa näytteet laimennettiin steriiliin veteen 1:10 (10 µl näytettä + 90 µl vettä). PCR -ajossa oli mukana myös IPC -kontrolli.

Salaattinäytteillä tehdyssä määrittäyksessä näyttematriisina käytettiin pakastettua, PCR:llä *Y. enterocolitican* suhteen negatiiviseksi todettua salaattia. Näytteiksi valmistettiin rinnakkaiset salaattit ympäällä ne pitoisuuksiin 10^0 - 10^5 pmy *Y. enterocolitica* TAVA 25 kannan rikastetun puhdasviljel-

män laimennussarjasta eli määritettävänä oli kuusi eritasoista näytettä. DNA eristettiin PrepMan Ultra -reagenssilla DNA-saostuksen kanssa. PCR -ajossa käytettiin IPC -kontrollia.

4.2.12 Menetelmän toteamisrajan määrittäminen

Menetelmän toteamisraja on pienin *Y. enterocolitica* pitoisuus, joka näytteestä voidaan todeta. Toteamisraja määritettiin pitoisuudeltaan tunnetusta laimennussarjasta sekä ympätyillä kasvisnäytteillä, jolloin mukana oli rikastusvaihe. Toteamisraja selvitettiin samoissa ajoissa kuin lineaarisuus (ks. 4.2.11 Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen).

4.2.13 DNA:n eristysmenetelmien vertailu ja optimointi

Eristyskittejä PrepMan Ultra ja PrepMan Ultra DNA-saostuksella verrattiin kahdella rinnakkaisella porkkana-jäävuorisalaattinäytteellä (A ja B), joihin ympättiin noin 10^3 pmy *Y. enterocolitica* TAVA 25 –kantaa kuoritussa maidossa.

Molemmissa eristysmenetelmissä alkuvaihe suoritettiin samalla tavalla. Ensimmäisessä sentrifugoinnissa bakteerit ja salaattinäytteistä irronneet partikkelit kerättiin pelletiksi eppendorf-putken pohjalle ja supernatantti pipetoitiin mahdollisimman tarkkaan pois. Pelletin päälle lisättiin PrepMan Ultra –reagenssi ja vortexoinnilla oli tarkoitus irrottaa näyteainesta pelletistä. Pelletti oli kuitenkin tiukasti kiinni putken pohjassa, eikä päälle lisätty reagenssi juurikaan samentunut vortexoinnilla. Kahdesta A-näytteen putkesta pelletti irrotettiin pipetinkärjellä, jotta nähtiin, onko tällä merkitystä DNA-saannon kannalta ja joutuuko pelletistä lopulliseen näytteeseen merkittäviä määriä PCR -reaktiota inhiboivia tekijöitä.

Molemmista salaattinäytteistä kaksi rinnakkaista eristystä tehtiin PrepMan Ultra -reagenssilla ja inhiboivien tekijöiden vähentämiseksi näytteet laimennettiin PCR:n pipetointivaiheessa 1:10 ultrapuhtaalla vedellä. Loput neljä putkea, kaksi molemmista näytteistä käsiteltiin PrepMan Ultra –eristuksen jälkeen vielä DNA-saostuksella, eikä näytteitä laimennettu enää PCR -pipetointivaiheessa. Ajossa käytettiin IPC -kontrollia.

Toisessa eristyskittien vertailussa oli mukana kolme eristyskittiä: PrepMan Ultra DNA-saostuksella, MasterPure ja JetQuick –eristyskitit. Testausta varten valmistettiin kaksi rinnakkaista porkkana-jäävuorisalaattinäytettä (A ja B), joihin molempiin ympättiin *Y. enterocolitica* TAVA 25 kantaa kuoritussa maidossa noin 7 pmy.

4.2.14 Elintarvikematriisin ja taustakasvun määrän vaikutus DNA:n monistumiseen

Näytteinä oli pakastettu jauheliha, raakamaito, kinkku, kaivosvesi ja tuore ruukkusalaatti. Jokaisesta näytteestä valmistettiin positiivinen näyte ympäpäämällä siihen noin 130 pmy *Y. enterocolitica* TAVA 25 –kantaa kuoritussa maidossa sekä ympäpäämätön näyte negatiiviseksi kontrolliksi. Kai-

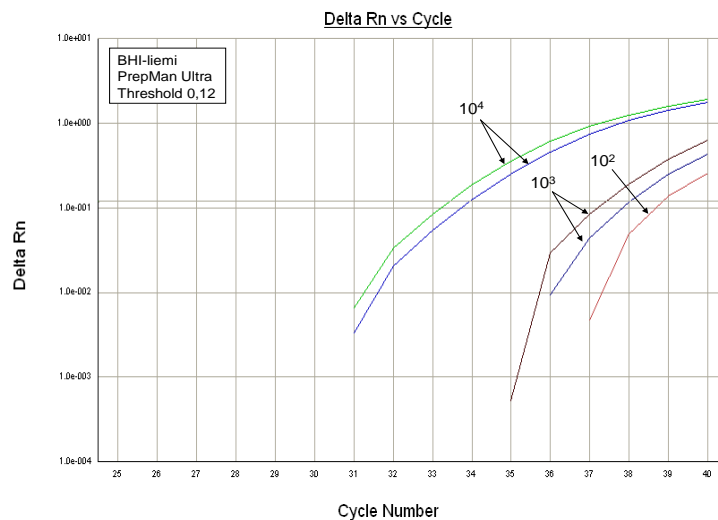
voveteen ympättiin vain noin 13 pesäkettä. DNA eristettiin PrepMan Ultra –reagenssilla DNA-saostuksen kanssa.

4.3 Tulokset

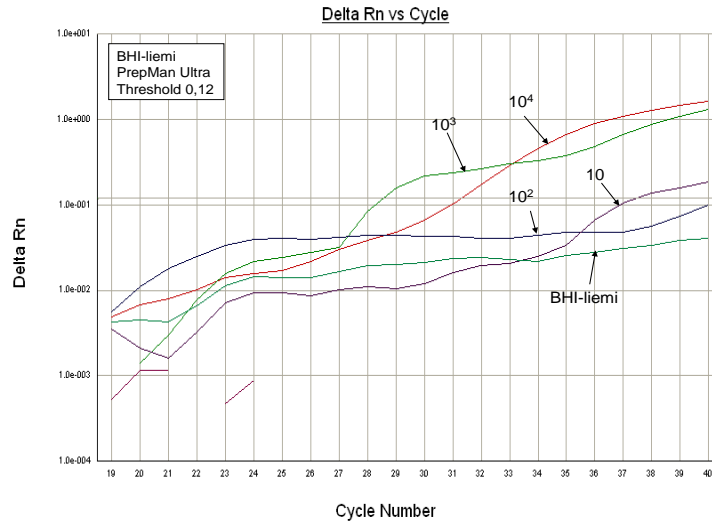
4.3.1 Esiajo PCR-komponenttien testaamiseksi

Esiajo komponenttien toimivuuden testaamiseksi tehtiin BHI -liemessä rikastetun puhtasviljelmän laimennussarjasta. Tulos oli positiivinen ja monistuminen eksponentiaalista laimennussarjan pitoisuuksista 10^4 ja 10^3 pmy/ml eristetyistä näytteistä, kun käytettiin laimennusta (1:10) ennen ajoa. Lisäksi saatiin yksittäinen positiivinen tulos pitoisuudesta 10^2 pmy/ml (kuva 8). Laimentamattomissa näytteissä ei tapahtunut eksponentiaalista monistumista (kuva 9). Kaikissa positiivisissa näytteissä delta-Rn –arvot jäivät melko pieniksi ollen suurimmillaan 1,90. Pitoisuudella 10^4 saatiin Ct-arvoksi (rinnakkaisten ka) 33,66 ja pitoisuudella 10^3 pmy/ml Ct-arvo oli 37,68. Arvot ovat suhteellisen korkeita, eli monistuminen alkoi myöhäisillä sykleillä.

BHI -liemessä rikastetun puhtasviljelmän laimennussarjasta saatiin todettua 10^2 pmy/ml PrepMan Ultra –eristyksellä laimennettaessa näytteet veteen 1:10 PCR -pipetointivaiheessa. Eksponentiaaliset monistumiset osoittivat reagenssien toimivuuden.



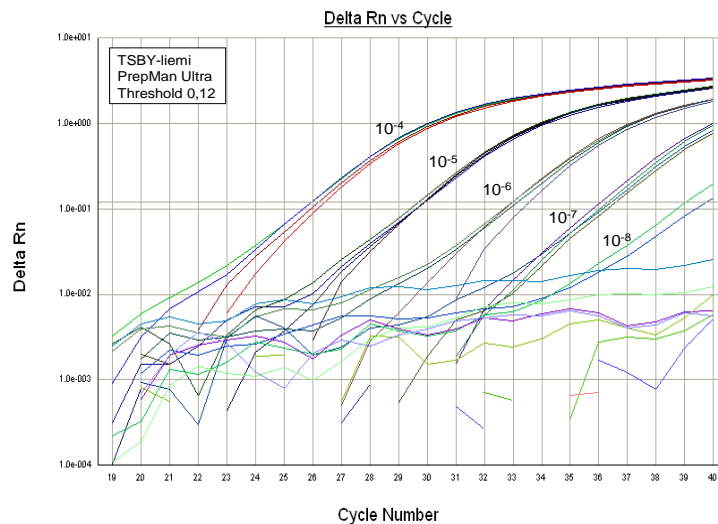
KUVA 8 Puhdasviljelmästä BH I-liemessä tehdyn rikastuksen eri laimennoksista eristettyjen ja sen jälkeen 1:10 laimennettujen DNA-näytteiden monistuminen. Eksponentiaalista monistumista tapahtui pitoisuuksista 10^3 ja 10^4 pmy/ml (kaksi rinnakkaista molemmista) sekä yksi monistuminen pitoisuudesta 10^2 pmy/ml.



KUVA 9 Puhdasviljelmän eri laimennoksista eristettyjen, laimentamattomien DNA-näytteiden monistuminen. Eksponentiaalista vaihetta ei ole selvästi erotettavissa mistään käyrästä reaktiota inhiboivien tekijöiden vuoksi.

4.3.2 Reaktion tehokkuuden määrittäminen

Reaktion tehokkuus määritettiin kahdesta eri DNA-laimennussarjasta, ensimmäinen ilman IPC -kontrollia ja toinen IPC -kontrollin kanssa. Ensimmäisessä ajossa laimennuksista 10^{-4} - 10^{-8} saatiin positiiviset tulokset (vain kaksi positiivista laimennuksesta 10^{-8}), joiden perusteella laskettiin reaktion tehokkuus. Laimennukset 10^{-9} ja 10^{-10} olivat negatiivisia. (kuva 10) Rinnakkaismääritysten hajonta oli pientä ja vain yksi tulos laimennuksesta 10^{-6} jätettiin pois laskettaessa reaktion tehokkuutta (taulukko 2).



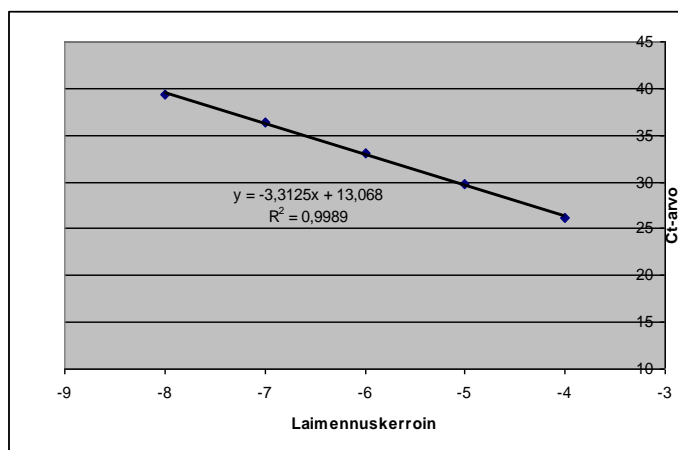
KUVA 10 Reaktion tehokkuuden määrittämiseksi tehdyn PCR -ajon monistumiskäyrät DNA-laimennoksista 10^{-4} - 10^{-8} . Viidestä laimennuksesta saatiin positiivinen tulos, joiden perusteella tehokkuus laskettiin. Ajo tehtiin ilman IPC:tä.

TAULUKKO 2 Reaktiotehokkuusmäärityksen eri laimennuksista saadut Ct-arvot sekä näiden keskiarvot, joita käytettiin kulmakertoimen laskemiseen..

Laimennuskertoimen	-8	-7	-6	-5	-4
Ct-arvot	39,79	36,55	33,00	29,91	26,26
neg	36,39	33,06	29,79	26,02	
neg	36,03	33,06	29,70	25,95	
	39,06	36,21	33,16	29,88	26,17
Ct-arvojen ka	39,43	36,30	33,07	29,82	26,10

*) Tulos hylättiin hajonnan vuoksi

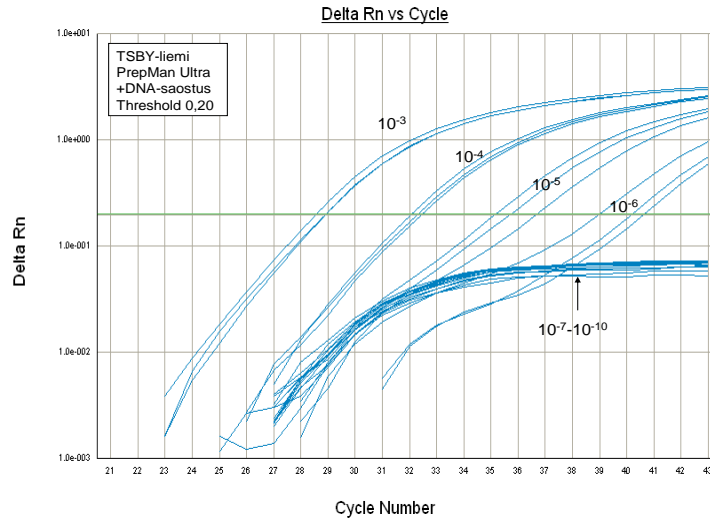
Suoran korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9989 eli pisteet asettuivat hyvin samalle suoralle ja kulmakertoimeksi saatiin -3,3125 (kuva 11), jonka mukaan laskettuna reaktiotehokkuus oli 99,9 %.



KUVA 11 Menetelmän tehokkuus määritettynä DNA-laimennussarjasta laimennuksista 10^{-4} - 10^{-8} ilman IPC -kontrollia. Kulmakertoimeksi saatiin -3,31. Kulmakertoimen avulla lasketuksi reaktiotehokkuudeksi saatiin 99,9 %.

Reaktiotehokkuus määritettiin myös IPC -kontrollin kanssa tehden eristys suoraan TSBY -rikastuliemestä PrepMan Ultra –reagenssilla DNA-saostuksen kanssa. Määritykset tehtiin DNA-laimennuksista 10^{-3} - 10^{-10} .

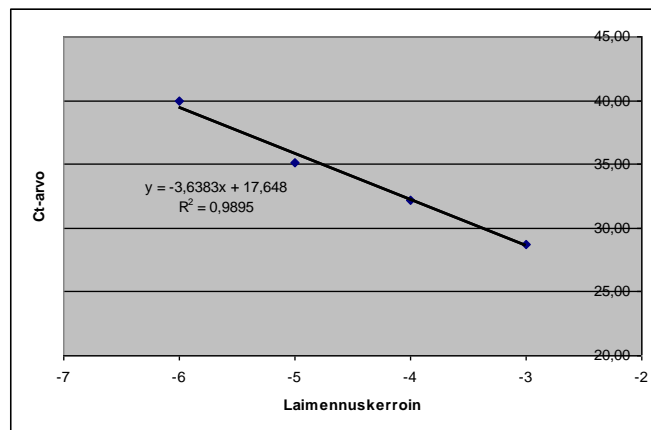
Laimennuksista 10^{-3} ja 10^{-4} saatiin hyvät rinnakaistulokset (kuva 12), mutta laimennuksissa 10^{-5} ja 10^{-6} rinnakaisten hajonta oli melko suurta. Suuremmista laimennuksista saatiin negatiiviset tulokset. Rinnakaistulosten Ct-arvojen keskiarvojen (taulukko 3) ja logaritmisesti lisääntyvän DNA-määrän mukaan piirretty suoralla (kuva 13) kulmakertoimeksi saatiin -3,64, joka tarkoittaa 88 %:n reaktiotehokkuutta. Suoran korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9895.



KUVA 12 Menetelmän tehokkuuden määrittäminen DNA-laimennussarjasta (10^{-3} - 10^{-10}) IPC-kontrollin kanssa. Laimennuksista 10^{-3} - 10^{-6} saatiin positiivinen tulos.

TAULUKKO 3 Reaktiion tehokkuuden määrittämisen (IPC-kontrollin kanssa) Ct-arvot sekä näiden keskiarvot, joita käytettiin kulmakertoimen laskemiseen.

Laimennuskerroin	-6	-5	-4	-3
Ct-arvot	39,00	33,70	32,06	28,88
	40,16	35,14	32,39	28,92
	40,60	36,64	32,26	28,50
Ct-arvojen ka	39,92	35,16	32,24	28,77

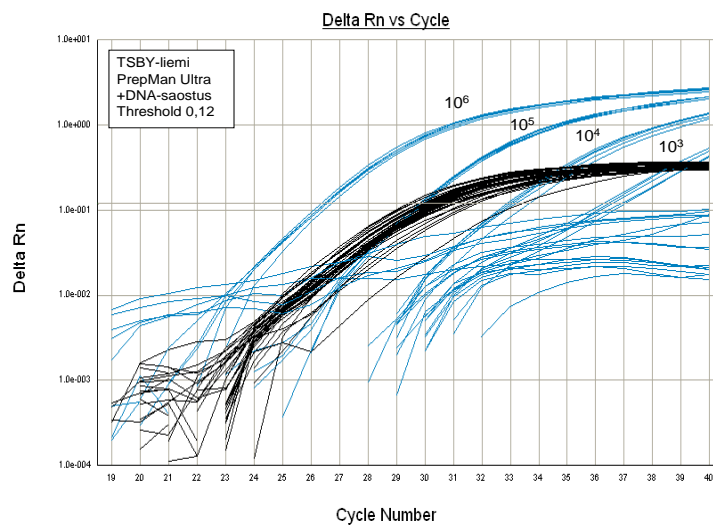


KUVA 13 Menetelmän tehokkuus määritettynä DNA-laimennussarjasta laimennuksista 10^{-3} - 10^{-6} , kun mukana on IPC-kontrolli. Kulmakerroin on -3,6, josta lasketuna reaktiion tehokkuudeksi saadaan 88,3 %.

4.3.3 Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen

Menetelmän lineaarisuus määritettiin pitoisuudeltaan tunnetusta *Y. enterocolitica*n puhdasviljelmän laimennussarjasta sekä logaritmisesti nousevalla bakteerimäärällä ympätyllä ja rikastetulla salaattinäytesarjalla.

Monistumiskuvaajasta (kuva 14) erottui selvästi IPC -kontrollien monistuminen omana kimpunaan sekä neljästä näytteestä pitoisuuksista 10^3 - 10^6 pmy/ml selvät rinnakkaisten kimput, joista voidaan erottaa eksponentiaalisen monistumisen vaihe. Pitoisuustasojen 10^0 - 10^2 tulos oli negatiivinen. Lineaarisuus laskettiin käyttämällä threshold-arvolla 0,12 saatuja Ct-arvoja (taulukko 4).

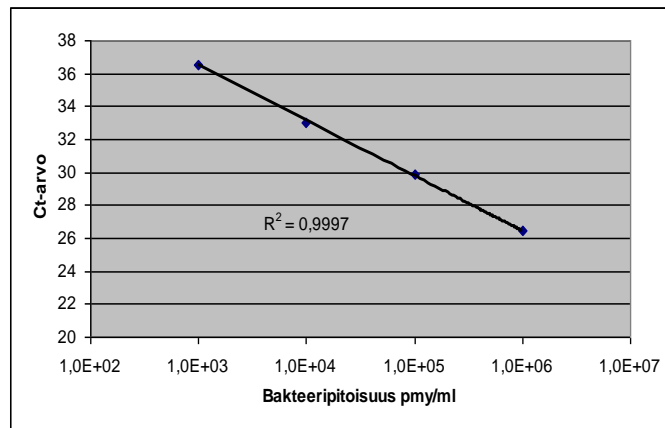


KUVA 14 Puhdasviljelmän laimennussarjasta tehtyjen eristysten perusteella määritetyn lineaarisuuden monistumiskuvaajat. Kuviassa näkyy mustana käyräkimpuna IPC:n monistuminen ja sinisinä käyrinä näytteiden monistuminen. Monistuminen tapahtui eksponentiaalisesti näytteissä, joiden pitoisuudet vastasivat tasoja 10^3 - 10^6 pmy/ml. Näytteistä, joiden pitoisuudet vastasivat tasoja 10^0 - 10^2 pmy/ml saatiin negatiivinen tulos.

TAULUKKO 4 Pitoisuudeltaan tunnetun (pmy/ml) puhdasviljelmän laimennussarjasta eristetystä DNA:sta tehdyn lineaarisuusmäärityksen Ct-arvot, joiden perusteella lineaarisuuden korrelaatiokerroin on laskettu.

Y.e. pitoisuus	10^3	10^4	10^5	10^6
Ct-arvot	36,29	32,75	29,91	26,58
	36,87	32,77	29,76	26,27
	36,45	33,01	29,97	26,43
	36,14	33,11	29,67	26,42
	36,92	33,48	29,96	26,48
Ct-arvojen ka	36,53	33,02	29,85	26,44

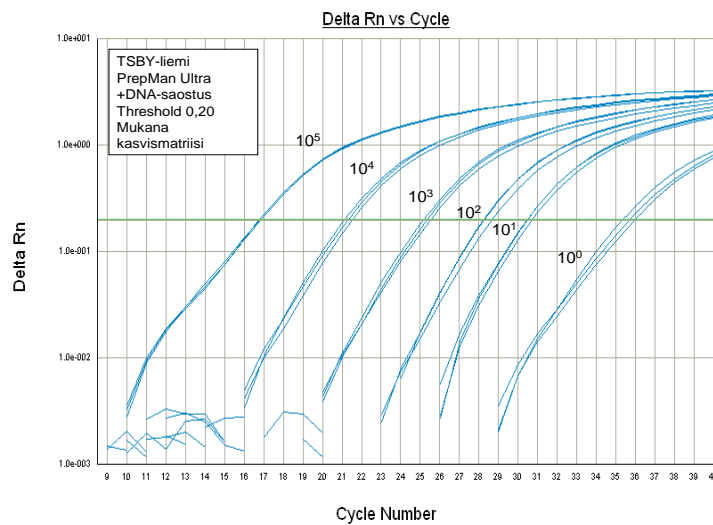
Eri laimennuksista tehtyjen eristysten lineaarisuuden korrelaatiokertoimeksi (kuva 15) saatiin 0,9997.



KUVA 15 Lineaarisuus määritettynä laimennussarjasta tehdyistä eristyksistä pitoisuusalueella 10^3 - 10^6 pmy/ml. Korrelaatiokerroin on 1,00 eli menetelmän lineaarisuus on erittäin hyvä tehtäessä eristykset laimennussarjan eri laimennuksista.

Lineaarisuus määritettiin myös ympätyillä salaattinäytteillä, jolloin nähtiin rikastusvaiheen ja kasvismatriisista tehtyjen eristysten vaikutus lineaarisuuteen. Määritettävänä olivat salaatit, joihin oli ympätty tasoja 10^0 - 10^5 pmy vastaavat pesäkemäärät. Hajontaa aiheuttavia tekijöitä (esim. eri näytteet, rikastus ja eristys) oli useita, joten tulosten tarkastelussa rinnakkaisista näytteistä valittiin lineaarisuuden kannalta parempi vaihtoehto kustakin pitoisuudesta (taulukko 5).

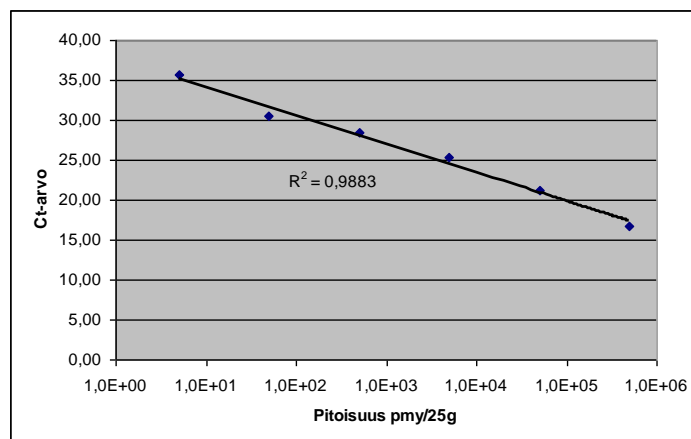
Kaikista näytteistä saatiin positiivinen tulos. Eristyksistä pipetoidut rinnakkaisnäytteet monistuivat selvästi omina kimppuinaan, eikä niiden välillä ollut merkittävää hajontaa (kuva 16). Eksponentiaaliset vaiheet olivat selvästi erotettavissa ja kuvaajien perusteella voitiin jo havaita selvät ja melko tasaiset erot näytteiden monistumiskäyrien välillä. Ct-arvojen keskiarvoista (taulukko 5) lasketuksi suoran korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9883, joka osoittaa pisteiden asettumisen lineaarisesti.



KUVA 16 Eri pitoisuuksiin ympätyistä salaateista tehdyn lineaarisuus- ja herkkyysmäärittelyn monistumiskuvauajat ympäystasoilla 10^0 - 10^5 pmy/25 g näyte.

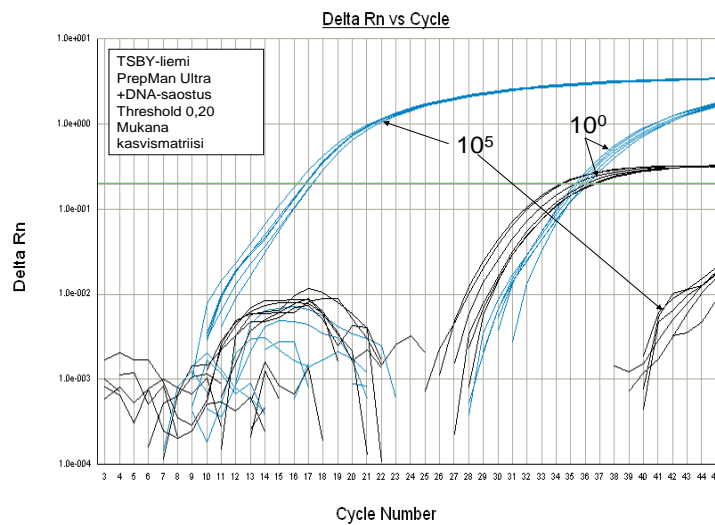
TAULUKKO 5 Ympätyillä salaattinäytteillä tehdyssä lineaarisuustarkastelussa käytetyt Ct-arvot. Rinnakkaisista salaattinäytteistä valittiin lineaarisuuden kannalta parempi vaihtoehto, koska hajontaa aiheuttavia tekijöitä oli useita.

Y. e. pitoisuus	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
Ct-arvot	35,30	30,68	28,21	25,45	21,10	16,82
	35,98	30,44	28,24	25,14	21,25	16,75
	35,68	30,42	28,64	25,27	21,48	16,71
Ct-arvojen ka	35,65	30,51	28,36	25,29	21,28	16,76



KUVA 17 Lineaarisuuden määrittäminen eri pitoisuuksiin (10^0 - 10^5 pmy) ympätyistä salaateista. Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9883.

Tuloksista oli selvästi havaittavissa varhaisilla sykleillä alkaneen vahvan (suuri delta-Rn –arvo) näytoreaktion vaikutus IPC:n reaktioon sitä heikentävästi (kuva 18). Syklimäärällä 40 viimeiset positiiviset IPC -tulokset saatiin ympäystoimitusasteella 10^3 pmy.



KUVA 18 Näytteen monistumisen vaikutus IPC:n monistumiseen. Näytteiden monistumiset näkyvät sinisinä käyriä ja IPC:n monistumiset mustina. Suurilla ympäpääspitoisuuksilla, kun näytteiden monistuminen alkoi jo varhaisilla sykleillä ja saavutettiin korkeita delta-Rn –arvoja, IPC:n reaktio jäi negatiiviseksi. Ympäpääspitoisuudella 10^0 IPC monistui eksponentiaalisesti ja tulos oli selvästi positiivinen.

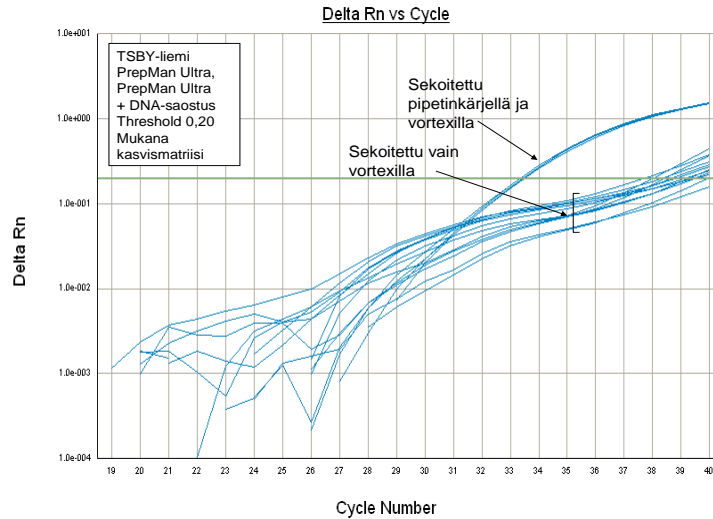
4.3.4 Menetelmän toteamisrajan määrittäminen

Toteamisrajan määrittämiseen käytettiin lineaarisuustarkastelussa saatuja tuloksia (ks. 4.3.3. Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen). Puhdasviljelmän laimennussarjasta, kun eristysmenetelmänä käytettiin PrepMan Ultra –reagenssia, alin todettu pitoisuus oli 10^3 pmy/ml, joka vastaa 5 pmy eristettyä DNA:ta yhdessä 25 μ l reaktiossa. Salaattinäytteestä todettiin 7 pmy:n ympäpääsmäärä rikastusvaiheen jälkeen, kun eristys tehtiin PrepMan Ultra -reagenssilla DNA-saostuksen kanssa.

4.3.5 DNA:n eristysmenetelmien vertailu ja optimointi

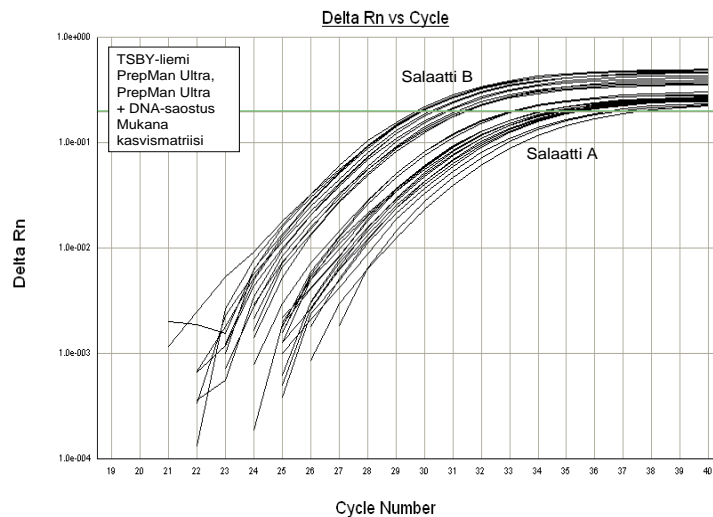
Ensimmäisessä eristyskittitestauksessa oli mukana PrepMan Ultra ja PrepMan Ultra DNA-saostuksella. Näytteinä oli kaksi 10^3 pmy:llä ympättyä porkkana-jäävuorisalaattia, joista kummastakin tehtiin rinnakkaiseristykset molemmilla menetelmillä.

Selvä positiivinen tulos eksponentiaalisella monistumiskäyrällä saatiin vain pipetinkärjellä sekoitetusta PrepMan Ultralla DNA-saostuksen kanssa eristetystä näytteestä (kuva 19). Muista DNA-saostuksella jatketuista näytteistä saatiin Ct-arvon perusteella kymmenen positiivista tulosta ja kaksi negatiivista, mutta monistuminen ei ollut eksponentiaalista. Pelkällä PrepMan Ultra-käsittelyllä saatiin positiivinen tulos sekoitetuista näytteistä, mutta huonolla monistumiskäyrällä. Sekoittamattomat näytteet olivat negatiivisia. Saatujen tulosten perusteella pelkkä PrepMan Ultra –käsittely jätettiin pois seuraavista kokeista.



KUVA 19 Riittävän näytemäärän irrotuksen vaikutus näytteen monistumiseen. Pellettä ei irronnut riittävästi DNA:ta vortex-sekoituksella ja monistuskäyrät eivät olleet eksponentiaalisia.

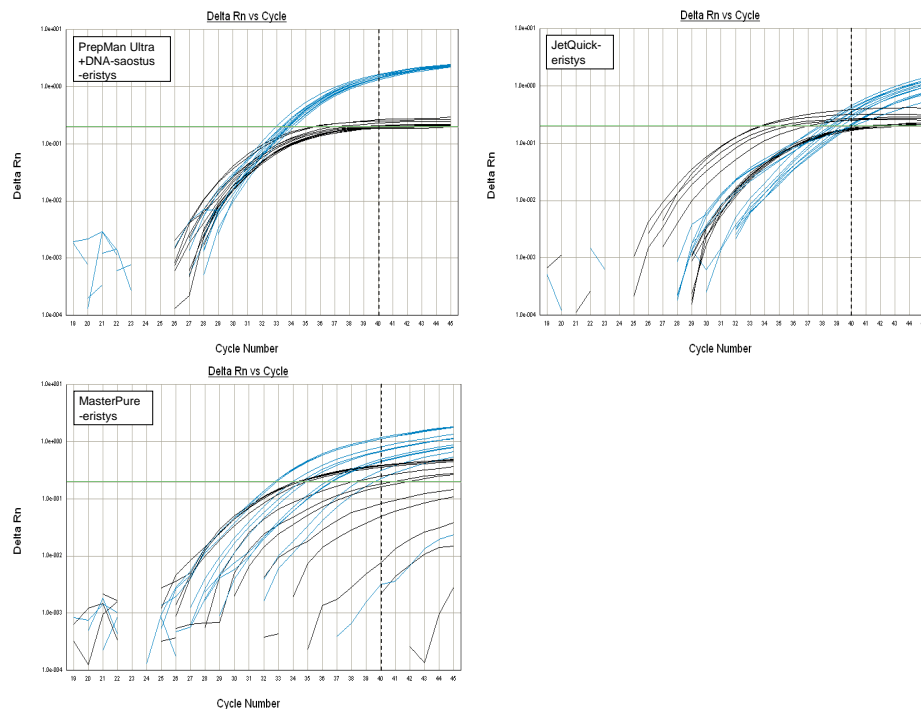
IPC -kontrollista saatiin positiivinen tulos ja se monistui eksponentiaalisesti kaikissa kaivoissa (kuva 20). IPC:n eksponentiaalinen monistuminen ei viittaa eristysmenetelmän tai pelletin irrotuksen vaikuttavan reaktioon sitä inhiboivasti. Pipetinkärjellä sekoitettujen näytteiden IPC -kontrollien Ct-arvojen keskiarvo oli 35,14 ja sekoittamattomien 34,66. Ero on niin pieni, ettei sekoittamisen voida olettaa lisäävän reaktion inhibitiota. IPC:n monistuskäyrät jakautuvat selvästi kahdeksi eri kimpuksi (kuva 20), joista toinen muodostuu salaattinäytteestä A tehdyistä eristyksistä ja toinen salaattinäytteestä B. Tulos viittaa näytteen A sisältäneen runsaammin inhiboivia tekijöitä.



KUVA 20 IPC:n monistuskäyrien jakaantuminen omiksi kimpukseen rinnakkaisissa salaattinäytteissä A ja B. Eristysmenetelmät PrepMan Ultra ja PrepMan Ultra DNA-saostuksella eivät aiheuta merkittävää eroa IPC:n monistumisille.

Toisessa eristyskittien testausajossa vertailtavana oli kolme eristyskittiä: PrepMan Ultra DNA-saostuksella, MasterPure ja JetQuick. Eristykset tehtiin rinnakkaisina kahdesta 7 pmy:llä ympätystä porkkana-jäävuorisalaattinäytteestä.

Tarkasteltaessa tuloksia monistumiskuvaajina (kuva 21), voitiin selvästi havaita, että PrepMan Ultralla DNA-saostuksen kanssa saatiin parhaat rinnakkaistulokset sekä *Y. enterocolitica* että IPC:stä. Ct-arvojen keskihajonta oli tällä menetelmällä vertailtavien menetelmien matalin (taulukko 6). Myös Ct-arvojen keskiarvo oli pienin, ja ainoastaan yhdestä MasterPure -kitillä tehdystä eristyksestä saatiin rinnakkaissipetoinneista matalammat Ct-arvot. MasterPure -kitillä tehtyjen eristysten tuloksien Ct-arvojen keskihajonta oli selvästi suurin (kuva 21, alin). JetQuick:n Ct-arvot olivat kaikista korkeimmat ja delta-Rn –arvot matalimmat. Monistumiskuvaajaa tarkasteltaessa (kuva 15, oik.ylä) voitiin kuitenkin huomata, että syklin 40 kohdalla monistuminen jatkuu vielä eksponentiaalisesti, eikä käyrän nousu pääty vielä 45 syklinkään kohdalla. Hajonnan ja korkeiden Ct-arvojen vuoksi JetQuick todettiin huonoimmaksi eristysmenetelmävaihtoehdoksi. JetQuick oli myös työläin suorittaa ja melko kallis.



KUVA 21 Monistumiskäyrät eri eristyskiteillä tehdystä salaattinäytteistä. Sinisinä käyriä näkyy näytteiden monistuminen ja mustina IPC:n monistuminen. Mustalla katkoviivalla merkitty sykli 40, johon monistumisen tarkastelu normaalisti lopetetaan. Yllä vasemmalla PrepMan Ultra DNA-saostuksella, jossa sekä rinnakkaisnäytteet että IPC ovat monistuneet omina selkeinä kimppuinaan. Oikealla JetQuick:llä tehty eristys, jossa hajonta on selvästi suurempaa ja monistumisen eksponentiaalinen vaihe jatkuu vielä 40 syklin kohdalla. Alin MasterPure -kitillä tehty eristys, jossa osa IPC:n reaktioista on jäänyt negatiivisiksi ja näytteiden tulosten hajonta on huomattavan suurta.

TAULUKKO 6 Eristyskittien vertailussa saatuja Ct- ja delta-Rn -arvoja. Näytteinä oli salaattit A ja B, joista tehtiin molemmista rinnakkaiseristykset kullakin menetelmällä.

	PrepMan Ultra DNA- saostuksella	Jet Quick	MasterPure
matalin Ct-arvo	32,96	37,73	32,70
suurin delta-Rn –arvo	2,47	1,38	1,83
Ct-arvojen keskiarvo ⁽¹⁾	33,63	38,97	35,40
Ct-arvojen keskihajonta ⁽²⁾	0,22	0,80	2,69

¹⁾Keskiarvo on laskettu kaikkien Ct-arvojen keskiarvona

²⁾ Keskihajonta on laskettu rinnakkaispipetointien keskiarvojen keskihajontana

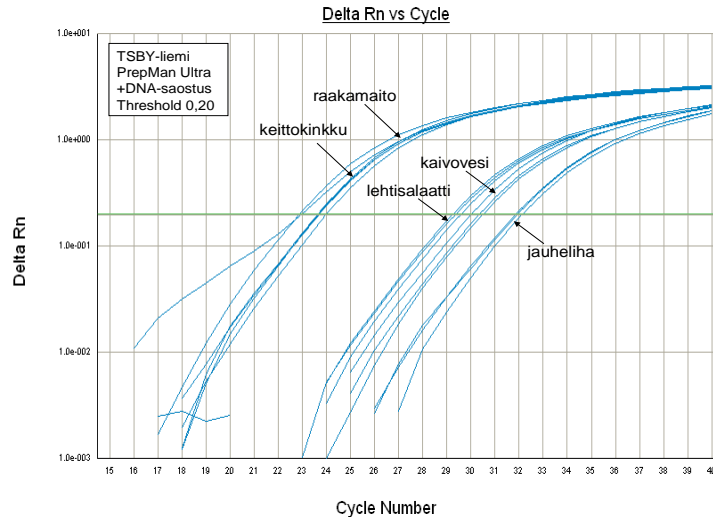
4.3.6 Elintarvikematriisiin ja taustakasvun määrän vaikutus DNA:n monistumiseen

Näytematriiseina käytettiin keittokinkkua, jauhelihaa, kaivovettä, lehtisalaattia ja raakamaitoa, joiden kokonaisbakteeripitoisuudet näkyvät taulukossa 7. Kaivoveteen ympättiin viljelytarkistuksen perusteella noin 13 pesäkettä ja muihin näytteisiin noin 130 pesäkettä, joten kaivovedestä saatua tulosta ei voi suoraan verrata muiden näytematriisien tuloksiin.

TAULUKKO 7 Testattujen näytematriisien kokonaisbakteeripitoisuuksia.

Näytematriisi	Kok. bakt. pmy/g
Raakamaito	700
Kinkkuleike	<1000
Jauheliha	40 000
Lehtisalaatti	150 000

Monistumiskäyrästä (kuva 22) havaitaan raakamaito- ja keittokinkkunäytteiden selvästi tehokkaampi (korkeammat delta-Rn –arvot) ja aiemmilla sykleillä alkanut monistuminen kuin lehtisalaatti- ja jauhelihanäytteillä. Jauhelihanäytteen, jonka kokonaisbakteerimäärä oli 40 000 pmy/g, monistuminen alkoi myöhäisimmässä vaiheessa ja delta-Rn –arvot jäivät matalimmiksi.



KUVA 22 Monistuminen eri näytematriiseissa, kun näytteisiin oli ympätty 13 pmy (kaivovesi) tai 130 pmy (muut näytteet) tutkittavaa bakteeria. Monistumisreaktio oli selvästi tehokkaampi näytteissä, joissa taustakasvu oli vähäistä (kinkku ja raakamaito). Jauhelihaassa ja salaattissa taustakasvu oli huomattavasti runsaampaa, mikä inhiboi PCR -reaktiota. Myös kaivoveden taustakasvu oli vähäistä, mutta ympätty bakteerimäärä oli 1/10 muiden näytteiden ympäysmäärästä, joten tulosta ei voida suoraan verrata muiden matriisien tuloksiin.

TAULUKKO 8 Eri näytematriiseista saadut Ct-arvot suuruusjärjestyksessä. Ero suurimman ja pienimmän arvon välillä on yli 30 %, joten näytematriisilla on huomattava merkitys Ct-arvoon.

Näytematriisi	Ct-arvo (ka)
Raakamaito	23,40
Kinkkuleike	23,51
Lehtisalaatti	29,36
Kaivovesi	30,26
Jauheliha	31,98

4.4 Tulosten tarkastelu

Tavoitteena oli kehittää käytössä olevaa viljelymenetelmää nopeampi, spesifisempi ja herkempi menetelmä *Y. enterocolitica*n osoittamiseksi kasvisnäytteistä. Kehitetyllä real-time PCR-menetelmällä vastaus saatiin noin vuorokauden kuluessa, kun se viljelymenetelmällä kestää jopa kaksi viikkoa. Spesifisyys oli testattu SLV:ssä ja virulenssille välttämättömään kromosomaaliseen *ail*-geeniin perustuvalla menetelmällä voidaan erittäin spesifisesti tunnistaa patogeeniset *Y. enterocolitica*-kannat. Plasmidin geeneihin perustuvilla PCR-menetelmillä ei välttämättä saada osoitettua kaikkia patogeenisiä kantoja, koska bakteeri saattaa menettää plasmidinsa. Tässä työssä kehitetyn menetelmän spesifisyyttä lisäsi sekvenssispesifisen koettimen käyttö, jolloin monistumisreaktiossa mahdollisesti tapahtuva epäspesifinen monistuminen ei tule mitatuksi fluoresenssin muutoksena. Yhtenä oleellisena tekijänä uusien menetelmien kehittämistarpeelle on ollut viljelymenetelmän huono herkkyys. Kehitetyllä menetelmällä saatiin

todettua huomattavasti matalampia *Y. enterocolitica*-pitoisuuksia kuin referenssinä olleella viljelymenetelmällä, jolla ei saatu todettua *Y. enterocoliticaa* yhdestäkään ympätystä porkkana-jäävuorisalaattinäytteestä eikä elintarvikematriisivertailussa salaatti- eikä jauhelihanäytteestä. NMKL:n teettämään vertailututkimukseen osallistuneesta yhdeksästä laboratorionäytteestä missään ei osoitettu standardin mukaisella viljelymenetelmällä *Y. enterocoliticaa* salaattinäytteestä pitoisuudella 140 pmy/25 g ja vain yhdessä laboratoriossa voitiin osoittaa 14 000 pmy/25 g [40, s. 3]. Kehitetyllä menetelmällä saatiin osoitettua alle 10 pmy/25 g, jota pidetään tavoitteena monissa patogeenien detektiomenetelmissä. Kehitetyn menetelmän herkkyys oli siis jopa 1000 kertaa parempi kuin nykyisen referenssimenetelmän.

Tutkimuksissa havaittiin, kuten PCR-menetelmät yleensä, myös kehitetty PCR-menetelmä oli herkkä näytteissä esiintyville erilaisille tekijöille. Tehdäessä kokeet samasta salaattista menetelmä todettiin lineaarisiksi jopa rikastusvaiheen jälkeen. Testattaessa menetelmää erilaisilla elintarvikematriiseilla kuitenkin huomattiin, että näytteen taustakasvu ja näytematriisi vaikuttivat huomattavasti saatuun tulokseen, vaikka ympätty bakteerimäärä oli sama. Tämä havaittiin myös vertaamalla ensimmäisessä eristyskittien vertailussa saatuja tuloksia (4.3.5. DNA:n eristysmenetelmien vertailu ja optimointi) ja salaattinäytteillä tehdyn lineaarisuustarkastelun tuloksia (4.3.3 Menetelmän lineaarisuuden määrittäminen), joissa eristykset tehtiin samalla menetelmällä. Runsaan taustakasvun porkkana-jäävuorisalaatilla Ct- ja delta-Rn –arvot osoittivat monistumisen olevan heikompa kuin vastaavalla pitoisuudella ympätyn, vähemmän taustakasvua sisältävän lehtisalaatin reaktiot. Myös IPC monistui heikommin runsaan taustakasvun näytteissä, joka osoittaa heikomman reaktion johtuvan ainakin osittain inhiboivista tekijöistä. Taustakasvun mahdollisesti aiheuttamia eroja rikastusvaiheeseen ja DNA:n eristämiseen ei voitu osoittaa, koska käytössä ei ollut menetelmää eristettävän bakteerimäärän eikä eristetyn DNA-saaliin mittaamiseksi. Runsas taustakasvu saattaa häiritä *Y. enterocolitican* rikastumista, jolloin todellisuudessa eristettäväksi saatava DNA-määrä jäisi vähäisemmäksi kuin niukemman taustakasvun näytteissä vastaavalla *Y. enterocolitica*-pitoisuudella.

Inhiboitunut tai tuntemattomasta syystä muuten häiriintynyt reaktio voi aiheuttaa monistumiskäyriin erilaisia muutoksia. Osassa reaktioista tulos oli positiivinen, mutta monistumiskuvaajasta puuttui eksponentiaalinen vaihe. Joissakin reaktioissa Ct-arvo nousi oletetusti inhibition vaikutuksesta. Kolmannessa tilanteessa Ct-arvo pysyi samana, mutta delta-Rn –arvo oli matalampi. Tutkimuksessa ei selvinnyt, mistä kukin kokeen inhibitio johtui ja onko näissä erilaisissa tapauksissa erilainen mekanismi, joka aiheuttaa inhibition.

Sisäistä kontrollia (IPC) käytetään erottamaan oikeat negatiiviset tulokset vääristä negatiivisista, jotka ovat inhibiotekijöiden aiheuttamia. IPC osoittaa, että olosuhteet monistumisreaktiolle ovat mahdolliset. IPC reagoi vapaiden nukleotidien kanssa samalla tavalla varsinaisen näytteen kanssa, joten sillä voi olla vaikutusta reaktion tehokkuuteen ja siksi IPC korvattiin vedellä ensimmäisessä kokeessa reaktion tehokkuutta määritettäessä. Re-

aktio-olosuhteissa, joissa IPC-kontrolli oli korvattu vedellä, reaktion tehokkuudeksi saatiin 99,9 %. Kokeessa, jossa IPC-kontrolli oli mukana reaktiossa, tehokkuus laski 88,3 %:iin. Tehokkuuden laskuun saattoi vaikuttaa myös mm. se, että näytteet käsiteltiin PrepMan Ultra –eristyksen jälkeen vielä DNA-saostuksella, mitä ei tehty ensimmäisessä kokeessa. IPC on suunniteltu toimimaan näytteissä, joissa ei tapahdu varsinaisen kohde-DNA:n monistumista. Optimaalisesti toimivassa reaktiossa IPC:n monistuminen estyy tai jää kokonaan negatiiviseksi, jos reaktiossa tapahtuu varsinaista monistumista. Salaattinäytteillä tehdyssä lineaarisuuskokeissa todettiin oletetusti, että tehokas näyttereaktio heikensi IPC:n reaktiota ja johti joissakin tapauksissa negatiiviseen tulokseen. Kasvisnäytteillä tehdyissä kokeissa ei todettu IPC-kontrollin vaikutusta näyttereaktioon, vaikka sen todettiin toisessa kokeessa heikentävän reaktion tehokkuutta. Toteamisrajaksi saavutettiin kuitenkin tavoiteltu alle 10 pmy/25 g:n näyte, joten IPC-kontrollin määrän vaikutusta reaktioon sitä heikentävästi ei ollut tarpeellista tutkia.

Ensimmäisessä eristyskittien testausajossa todettiin, että riittävän näytemäärän irrottaminen pelletistä on oleellista monistumisen onnistumiseksi, sillä vain pipetinkärjellä sekoitettu PrepMan Ultra-reagenssilla DNA-saostuksen kanssa eristetty näyte monistui eksponentiaalisesti. Osassa sekoittamattomiakin näytteitä tulos oli positiivinen, mutta monistuminen ei ollut eksponentiaalista. Pelkällä PrepMan Ultra –reagenssilla eristetyt näytteet olivat negatiivisia. Kuitenkin näissäkin kaivoissa IPC-kontrolli monistui eksponentiaalisesti ja tulos oli selvästi positiivinen. IPC-kontrolli ei siis tässä tapauksessa seulonut pois inhibition aiheuttamia vääriä negatiivisia tuloksia, tai näyttereaktion häiriintymisen aiheutti jokin muu tekijä kuin inhibitio, esim. vähäinen templaatin määrä. Pelkkä templaatin vähäisyys ei kuitenkaan johtanut normaalisti monistuneissa reaktioissa, esim. salaattinäytteillä tehdyssä lineaarisuustarkastelussa, samanlaiseen monistumiskuvaajaan.

PCR-komponenttien testaamiseksi tehdyssä kokeessa (4.3.1. Esiajo PCR-komponenttien testaamiseksi) laimentamattomissa näytteissä monistuminen oli häiriintynyt eikä se tapahtunut eksponentiaalisesti. BHI-liemi ei kuulu tunnettujen inhibitiota aiheuttavien rikastusliuosten joukkoon ja laimennussarjaa tehtäessä suurimpien laimennusten BHI-liemipitoisuus oli erittäin pieni. Tämä ei kuitenkaan näkynyt tuloksissa niin, että inhiboiva vaikutus olisi ollut laimeammassa näytteessä vähäisempi. Reaktion inhiboituminen olisi voinut olla lähtöisin myös laimennusliuoksen aineista tai eristysreagensseista. Eristysvaiheessa kaikkea reagenssia ei saatu pipetoitua pois DNA-pelletin päältä, mikä saattoi johtaa inhiboivien aineiden kulkeutumisen PCR-reaktioon. Sekä laimennusliuoksesta että reagensseista johtuva inhibitio selittäisi samantyyppisen reaktion kaikilla bakteeripitoisuuksilla, koska em. aineiden suhteellinen osuus eri laimennuksissa ei merkittävästi muuttunut. Eristykset tehtiin pelkällä PrepMan Ultra –reagenssilla, joka poisti testattavista menetelmistä huonoiten inhiboivia tekijöitä.

PCR-menetelmällä saadaan todettua elintarvikenäytteistä niin pieniä bakteeripitoisuuksia, että ne eivät välttämättä aiheuta terveydellistä haittaa. Äärimmäisen herkkiä menetelmiä käytettäessä ja todettaessa patogeenisiä bakteereja, joiden tarkkaa infektiivistä annosta ei tunneta, tulee ehkä eteen määrittää raja, jonka alapuolelle jäävien bakteeripitoisuuksia ei pidetä todennäköisinä ruokamyrkytysten aiheuttajina, vaikka sellainen elintarvikenäytteestä saataisiinkin osoitettua. *Y. enterocolitican* infektiivinen annos on todennäköisesti pieni, mutta osa PCR-menetelmällä todetuista pitoisuuksista voi silti olla tämän rajan alapuolella. Osoitettu bakteeripitoisuus voi vaihdella yhdestä pesäkkeestä kymmeneen tai satoihintuhansiin pesäkkeisiin ja annettu vastaus on rikastusvaiheen sisältävällä kvalitatiivisella osoitusmenetelmällä sama ("todettu"). Joissakin tutkimuksissa [41] on osoitettu bakteeri suoraan elintarvikenäytteestä ilman rikastusta. Se nopeuttaisi tutkimusta entisestään ja näin saataisiin poistettua yksi vaihe, jota ei saada vakioitua eri näytteiden välillä. Suora osoitus ei kuitenkaan olisi välttämättä yhtä herkkä kuin rikastukseen perustuva menetelmä ja vaatisi hyvin tehokkaita DNA:n puhdistusmenetelmiä. Vaikka DNA:n puhdistusmenetelmä olisi riittävän tehokas suoraan osoittamiseen, elintarvike-matriisit muodostavat hyvin heterogeenisen ryhmän ja näytematriisin sisältävien erilaisten tekijöiden aiheuttaman variaation osuus näytteiden välillä tulisi selvittää erillisten validointikokeiden avulla.

Tässä tutkimuksessa tehdyssä DNA:n eristysmenetelmien vertailussa parhaaksi osoittautui PrepMan Ultra DNA-saostuksella, mutta myös MasterPurella saatiin lupaavia tuloksia. MasterPure –kittiä käytettäessä ei ollut mahdollisuutta käyttää valmistajan ohjeenmukaista kylmäsentrifugointia, mikä saattoi heikentää tuloksia. Menetelmän kehittämissä vaiheissa PrepMan Ultra -reagenssin valintaa vahvisti sen suorittamisen helppous ja reagenssien edullinen hinta. Lisäksi PrepMan Ultra DNA-saostuksella on käytössä muissakin kyseisen laboratorion PCR-menetelmissä ja DNA-saostus suoritetaan liuoksilla, joita ei tarvitse hankkia reagenssivalmistajalta.

Menetelmä todettiin lineaariseksi ja sillä saavutettiin toteamisraja alle 10 pmy/25 g näyte, mutta parhaaksi todetullakin eristysmenetelmällä monistumiset alkoivat suhteellisen myöhään eli Ct-arvot olivat melko korkeita ja toisaalta monistumiset eivät olleet kovin tehokkaita delta-Rn –arvojen jäädessä melko mataliksi. Monistumisen alkaminen myöhäisillä sykleillä saattaa johtaa väärin negatiivisiin tuloksiin ja matalat delta-Rn –arvot pienentävät threshold-ajan määrittämisväliä ja saattavat johtaa epäspesifisen kiinnittymisen aiheuttamaan väärään positiiviseen tulokseen. Paremmalla eristysmenetelmällä voidaan saavuttaa matalampia Ct-arvoja ja korkeampia delta-Rn –arvoja, jolloin negatiivisten ja positiivisten näytteiden välille saadaan selvempi ero. Tämän vuoksi menetelmän kehittämistä jatkettiin laboratoriossa testaamalla vielä muita DNA-eristysmenetelmiä sekä tekemällä lisätestauksia MasterPure-eristyskitillä. Validoinnin jatkokokeisiin valittiin uusintakokeiden jälkeen MasterPure-kitti, jolla testattiin vielä menetelmän toistettavuutta ja vastaavuutta referenssimenetelmään, sekä varmistettiin menetelmän toteamisraja erilaisilla kasvismatriiseilla ja muilla elintarvikenäytteillä.

4.5 Johtopäätökset

Tässä työssä kehitettiin real-time PCR –menetelmä *Y. enterocolitican* osoittamiseksi kasvisnäytteistä. Testattavana oli neljä eri eristysmenetelmää (PrepMan Ultra, PrepMan Ultra DNA-saostuksella, MasterPure ja JetQuick), joista parhaaksi todettiin PrepMan Ultra DNA-saostuksella. Tällä menetelmällä rinnakkaismääritysten keskihajonta oli pieni, monistumiset alkoivat varhaisimmassa vaiheessa (matalimmat Ct-arvot) ja monistumisilla saavutettiin suurimmat delta-Rn –arvot, jotka kuvaavat monistumisen tehokkuutta fluoresenssin muutoksena.

Reaktion tehokkuus ilman IPC -kontrollia puhdasviljelmällä oli optimaalinen (99,9 %). IPC -kontrollin mukanaolo heikensi reaktion tehokkuutta laskien sen 88,3 %:iin.

Menetelmä todettiin lineaariseksi puhdasviljelmästä tehdystä laimennussarjasta eristetyn DNA:n määrittämisen perusteella pitoisuusalueella 10^3 - 10^6 pmy/ml. Menetelmä säilyi lineaarisena myös rikastusvaiheen jälkeen, kun lineaarisuus määritettiin eri pitoisuuksiin (10^0 - 10^5 pmy /25 g näyte) ympäryillä salaattinäytteillä.

Puhdasviljelmän laimennussarjasta toteamisrajaksi saatiin pitoisuus 10^3 pmy/ml, joka vastaa 5 pmy eristettyä DNA:ta yhdessä reaktiossa. Kasvisnäytteiden toteamisrajaksi saatiin vuorokauden rikastusvaiheen jälkeen TSBY -liemessä +25 °C:ssa alle 10 pmy/25 g näyte.

Keskeisiä tekijöitä kehitetyn menetelmän toimivuudelle oli eristysvaiheessa riittävän näytemäärän irrottaminen pelletistä ja käytettäessä eristysmenetelmää, joka jättää näytteeseen inhiboivia tekijöitä, näytteiden laimentaminen PCR -pipetointivaiheessa 1:10 poistaa tehokkaasti inhibition vaikutusta. Näytematriisi ja sen sisältämä taustamikrobisto vaikuttivat merkittävästi monistumisreaktioon.

LÄHTEET

- [1] Niskanen, T., Johansson, T., Siitonen, A. & Kuusi, M., Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2006. Eviran julkaisu 21/2007. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. Viitattu 18.2.2008.
http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/valvonta_ja_yritt_j_t/ruokamyrkytysepide mioiden_raportointi/
- [2] Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., Bergey's Manual of Determinative bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, USA 1994.
- [3] ISO 10273:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*.
- [4] Anonymous, Opas elintarvikkeiden ja talousveden mikrobiologisista vaaroista. Evi-Eela opas 1/2003. Helsinki 2003.
- [5] Anonymous, Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. PCR methods for detection in foods. Nordic Committee on Food Analysis, No. 163, 1998.
- [6] Anonymous, PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent. Protocol. Applied Biosystems. 8/2005. Viitattu 31.3.2008.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042136.pdf
- [7] Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I., von Weymarn, N., Bioprosessiteknikka. Porvoo: WSOY. 2002.
- [8] Malorny, B., Tassios, P. T., Rådström, P. Cook, N., Wagner, M. & Hoorfar, J., Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology 83 (2003), s. 39-48.
- [9] Suominen, I., Ollikka, P., Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus. Helsinki: Hakapaino Oy. 1997.
- [10] McPherson, M. & Møller, S., PCR. Second edition. Cornwall, UK: Taylor & Francis Group. 2006.
- [11] Turner, P., McLennan, A., Bates, A., White, M., Molecular Biology. Third edition. University of Liverpool, UK. 2005.
- [12] Anonymous, SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR. Protocol. Chapter 2: PCR. Applied Biosystems 2002. Viitattu 18.2.2008.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041053.pdf
- [13] Ulmanen, R., Valste, J., Viitanen, P., Geeni. Porvoo: WSOY. 1995.

- [14] Scott, E. Hanna, Christopher, J. Connor, Hua H. Wang, Real-time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations. *Journal of Food Science* 70 (2005), s.49-53.
- [15] Sambrook, J. & Russell, D. W., *Molecular Cloning, A laboratory manual*. Chapter 8. Third Edition. Cold Spring Harbor, 2001. Viitattu 9.3.2008.
www.MolecularCloning.com,
<http://www.realread.com/pageview/browse.cgi?site=97499611&book=0879695773>
- [16] Anonymous, Real-Time PCR Systems. Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems. Chemistry Guide. Chapter 8. Applied Biosystems. 2005. Viitattu 9.3.2008.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041440.pdf
- [17] Vierstraete, A. Päivitetty 8.11.1999. Viitattu 18.2.2008.
<http://users.ugent.be/~avierstr/pdf/PCR.pdf>
- [18] Anonymous, Reconstituting and Diluting Primers and TaqMan® Probes. Support. Tools, Tutorials, Maintenance & Troubleshooting. Applied Biosystems. Viitattu 9.3.2008.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_043004.pdf
- [19] Anonymous, Applications. Testing and Identification. Applied Biosystems. Viitattu 4.3.2008.
https://www2.appliedbiosystems.com/applications/testing_identification/food.cfm
- [20] Rychlik, W., Spencer, W.J. & Rhoads, R.E, Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research* 18 (1990): 21.
- [21] Anonymous, Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Absolute Quantification Getting Started Guide. Applied Biosystems. 2006. Viitattu 31.3.2008.
<http://www.genomics.bham.ac.uk/Documents/Absolute%20quantification%20guide.pdf>
- [22] Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J & Vitzthum F., Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32 (2004), s. 1-10.
- [23] Anonymous, Office of Technology Transfer, Public Health Research Institute University of Medicine and Dentistry of New Jersey, 225 Warren Street, Newark, New Jersey 07103, USA. Viitattu 19.1.2008. www.molecular-beacons.org
- [24] Anonymous, Premier Biosoft International, TaqMan® Probes. Viitattu 20.1.2008.
http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html
- [25] Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M. J., Klsnilová, L., Petrová, K. & Rybníkář A., Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 52 (2006) s. 143-148.

- [26] Fredriksson-Ahomaa, M. & Korkeala, H., Low Occurance of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (2003), s. 220-229.
- [27] Anonymous, Sample reparation and reaction set up. Koulutusmateriaalia. Applied Biosystems. 2006.
- [28] Di Pinto, A., Forte, V. T., Guastadisegni, M. C., Martino, C., Schena, F. P. & Tantillo, G., A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18 (2007), s. 76-80.
- [29] Lantz, P-G., Knutsson, R., Blixt, Y., Abu Al-Soud, W., Borch, E. & Rådström, P., Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *International Journal of Food Microbiology* 45 (1998), s. 93-105.
- [30] Anonymous, Kasvisten patogeeneit 2004-2005. Oulun seudun ympäristövirasto, raportti 7/2005. Oulu. Viitattu 15.3.2008.
<http://www.ouka.fi/ymparisto/julkaisut/raportit.htm>
- [31] Bottone, E. J., *Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues. *Clinical Microbiology Reviews* 10 (1997), s. 257-276.
- [32] Anonymous, Evira. Elintarvikkeet, Ajankohtaista. Viitattu 21.3.2008.
<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/ajankohtaista/?a=ViewMessage&id=251>
- [33] Anonymous, Protocol for the validation of alternative microbiological methods, NordVal Validation, Denmark, 01.01.2004.
- [34] ISO 4833:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the enumeration of microorganisms –Colony-count technique at 30 degrees C.
- [35] Anonymous, TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents, VIC™ Probe, Protocol. Applied Biosystems. 2001. Viitattu 22.3.2008.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041040.pdf
- [36] Anonymous, MasterPure™ DNA Purification Kit. Protocol. Epicentre Biotechnologies. Viitattu 31.3.2008. <http://www.epibio.com/pdftechlit/113pl027.pdf>
- [37] Anonymous, Purification of genomic DNA from tissue samples with JetQuic. Protocol. Viitattu 31.3.2008. [http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/Protocol%20Tissue%20\(standard\).pdf](http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/Protocol%20Tissue%20(standard).pdf)
- [38] Anonymous, Real-time PCR Instruments. Products & Services. Applied Biosystems. Viitattu 1.11.2007.
<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601250&tab=TechSpec>

[39] Anonymous, Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 2004. Applied Biosystems. Viitattu 21.3.2008.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf

[40] Anonymous, Collaborative validation for detection of *Yersinia enterocolitica* in foods. Newsletter for The Nordic Committee on Food Analysis. No 63. NMKL. 12/2006.

[41] Ramesh, A., Padmapriya, B. P., Chandrashekar A. & Varadaraj, M. C., Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes* 16 (2002), s. 307-314.