

Marika Skön

DNA-eristysautomaattien käyttöönotto ja eristysmenetelmän validointi viidelle patogeeniselle bakteerille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

27.4.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Marika Skön DNA-eristysautomaattien käyttöönotto ja eristysmenetelmän validointi viidelle patogeeniselle bakteerille 33 sivua + 1 liite 27.4.2018
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Erikoistutkija Anni Vainio Tutkintovastaava Carola Fortelius
<p>Insinööriä tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Terveysturvallisuusosastolla Asiantuntijamikrobiologiayksikössä. Insinööriä tavoitteena oli ottaa käyttöön kaksi uutta DNA-eristysautomaattia patogeenisten bakteerien DNA-eristystä varten, verrata tuloksia rutiinikäytössä olleeseen manuaalisen kitin avulla tehtyihin eristystuloksiin ja validoida optimaalisin menetelmä kullekin bakteerille. Toiveena oli, että eristysautomaattien avulla saavutettaisiin lyhyemmän aktiivisen työajan lisäksi korkeampia DNA-pitoisuuksia etenkin hankalammin eristettävien grampositiivisten bakteerien kohdalla.</p> <p>Työn käytännön osuus suoritettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen BSL-2-luokan mikrobiologisessa laboratoriossa. Työhön valittiin viisi eri bakteerilajia ja yhteensä 50 bakteerikantaa. DNA-eristykset tehtiin käyttäen NorDiag Arrow -eristysautomaatilla Viral NA -kittiä ja Analytik Jena InnuPure C16 touch -eristysautomaatilla innuPREP Bacteria DNA -kittiä. Tuloksia verrattiin manuaalisella menetelmällä, Qiagen MagAttract HMW DNA -eristyskitillä, saatuihin tuloksiin. DNA-pitoisuudet mitattiin Invitrogen Qubit -laitteella ja DNA:n puhtaus arvioitiin agarosigeelielektroforeesilla.</p> <p>Insinööriä lopputuloksena saatiin validoitua kullekin patogeeniselle bakteerille optimaalisin eristysmenetelmä perustuen korkeimpaan DNA-pitoisuuteen ja DNA:n riittävään puhtauteen. Eristysautomaatteja verratessa työssä käytetyillä kiteillä Arrow-eristysautomaatti osoittautui jokaisen bakteerin kohdalla paremmaksi vaihtoehdoksi. Agarosigeelielektroforeesin avulla saatiin arvioitua, että molemmilla eristysautomaateilla saadaan tarpeeksi puhdasta DNA:ta kokogenomisekvensointia varten. Työn tuloksena syntyi myös käyttöohjeet molempien DNA-eristysautomaattien käyttöön.</p> <p>Työn tulosten perusteella DNA-eristystä voidaan alkaa tehdä Arrow-eristysautomaatin avulla. Protokollaa voi tarvittaessa vielä hioa, sillä tämän työn puitteissa ei ollut tarpeen tehdä esimerkiksi toistomittauksia. Tulosten pohjalta yksikössä on jo aloitettu eristämään Arrow'lla <i>L. monocytogenes</i> -kantojen DNA:ta. InnuPure C16 touch -eristysautomaatilla voisi olla suositeltavaa harkita valmistajan SmartExtraction-menetelmän kokeilemista, sillä DNA-pitoisuudet jäivät osin liian pieniksi kokogenomisekvensointia ajatellen.</p>	
Avainsanat	DNA-eristys, DNA, bakteeri, patogeeni

Author Title Number of Pages Date	Marika Skön Deployment of automated DNA extraction systems and validation of extraction method for each five pathogenic bacteria 33 pages + 1 appendice 27 April 2018
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Anni Vainio, Senior Researcher Carola Fortelius, Head of Degree Programme
<p>This Bachelor's thesis was carried out in the National Institute for Health and Welfare's (THL) Health Security Department in Expert Microbiology Unit. The goal of the thesis was to deploy two new automated DNA extraction systems for DNA extraction from pathogenic bacteria, compare the results to manual extraction kit extraction results and validate the most optimal method for each bacteria. The wish was to achieve shorter active working time during DNA extraction process and higher DNA concentrations especially with gram-positive bacteria of which DNA is more difficult to extract.</p> <p>The experimental part of the thesis was performed in THL's BSL-2 microbiological laboratory. Five different species of bacteria and a total of 50 bacterial strains were chosen for the task. DNA extractions were accomplished with the NorDiag Arrow automated DNA extraction system using the Viral NA extraction kit and the Analytik Jena InnuPure C16 touch automated DNA extraction system using the innuPREP Bacteria DNA extraction kit. The results were compared between the manual MagAttract HMW DNA extraction kit and automated DNA extraction systems. DNA concentrations were measured with the Invitrogen Qubit device. The purity of the DNA was evaluated with agarose gel electrophoresis.</p> <p>As the result, the most optimal extraction method was validated for each bacteria considering the highest DNA concentration and sufficient purity of DNA. Between the two automated DNA extraction systems and the kits used with them, Arrow performed better with all particular bacteria. The results of the agarose gel electrophoresis showed that a sufficient purity of DNA can be acquired with both automated DNA extraction systems. As the result of the thesis, instructions for use were also created for both devices.</p> <p>On the basis of the results, DNA extraction of pathogenic bacteria can be done with the Arrow. Extraction protocols can still be enhanced since there was no need to do repeat measurements in this thesis project. DNA extractions of <i>L. monocytogenes</i> strains have already been done with Arrow in the Expert Microbiology Unit. With the InnuPure C16 touch it could be recommendable to consider testing manufacturer's SmartExtraction method since DNA concentrations were partly too low for whole genome sequencing.</p>	
Keywords	DNA, extraction, bacteria, pathogen

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	DNA-eristysmenetelmät yleisesti	2
2.1	DNA-eristyksen päävaiheet	2
2.2	Solujen hajotus	3
2.3	DNA:n puhdistusmenetelmiä	3
2.3.1	Solunesteen puhdistus proteiineista ja RNA:sta	3
2.3.2	Fenoli-kloroformiuutto	4
2.3.3	Spin-kolonne	4
2.3.4	Magneettipartikkelit	5
2.4	DNA:n pitoisuuden ja puhtausasteen määrittäminen	6
2.4.1	Spektrofotometrisiä menetelmiä	6
2.4.2	Fluoresenssiin perustuvia menetelmiä	6
2.4.3	DNA:n puhtauden arviointi agarosigeelielektroforeesilla	7
3	DNA-eristysautomaatit	7
3.1	Eristysautomaattien toimintaperiaate	7
3.2	Eristysautomaattien hyödyt ja haitat	9
4	Patogeeniset bakteerit	10
4.1	Bakteerien jaottelu soluseinän rakenteen mukaan	10
4.2	<i>Salmonella enteritidis</i>	11
4.3	<i>Staphylococcus aureus</i> ja MRSA	12
4.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	13
4.5	Vankomysiiniresistentti <i>Enterococcus faecium</i> (VRE)	14
4.6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
5	Materiaalit ja menetelmät	16
5.1	Valitut bakteerilajit	16
5.2	Bakteerien viljely	16
5.3	Näytteiden esikäsittely	16
5.4	DNA:n eristys	18
5.4.1	Viral NA -eristyskitti	18
5.4.2	InnuPREP Bacteria DNA -eristyskitti	19

5.4.3	Eristysautomaattien valmistelu ja käyttö	19
5.5	DNA-pitoisuuden mitta	20
5.6	DNA:n puhtauden arviointi	20
5.6.1	Agarosigeelin valaminen	20
5.6.2	Näytteiden valmistelu geeliajoa varten	20
5.6.3	Geeliajo, geelin värjäys ja kuvantaminen	21
6	Tulokset	22
6.1	Eristystulokset ja geelikuvat	22
6.1.1	<i>Salmonella enteritidis</i>	22
6.1.2	MRSA	24
6.1.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	24
6.1.4	VRE	25
6.1.5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25
7	Tulosten tarkastelu	26
7.1	Eristystulosten arviointi ja puhtauden tarkastelu	26
7.2	Huomioita eristysautomaattien käytössä	28
7.3	Johtopäätökset	28
8	Yhteenveto	29
	Lähteet	31
	Liitteet	
	Liite 1. Geelikuvat	

Lyhenteet

MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> . Metisilliiniresistentti <i>S. aureus</i> .
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> . Polymeraasiketjureaktio.
VRE	<i>Vancomycin-resistant Enterococcus faecium</i> . Vankomysiiniresistentti <i>E. faecium</i> .
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> . Kokogenomisekvensointi.

1 Johdanto

Insinööriyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Terveysturvallisuusosastolla Asiantuntijamikrobiologiayksikössä bakteriologian laboriotiimissä. Bakteriologian tiimin keskeisiä toiminnankohhteita ovat mikrobilääkeresistenssi, vakavat bakteerinfektiot, ruuan ja veden kautta välittyvät bakteerinfektiot sekä mykobakteerit. Yksiköön saapuu Suomessa potilaista eristettyjä patogeenisten bakteerien puhdasviljelmiä kliinisistä mikrobiologian laboratorioista julkiselta ja yksityiseltä puolelta. Kannoille tehdään tyypitystä epidemiaselvitys- ja seurantatyötä varten.

Genomiikan ja tehosekvensointitekniikoiden kehittyessä tarve laajemmin, nopeammin ja taloudellisemmin luotaville DNA-kirjastoille lisääntyy jatkuvasti [1, s. 105]. Yksi genotyyppitysmenetelmistä on kokogenomisekvensointi (whole genome sequencing, WGS). Bakteerien eristetyn genomisen DNA:n avulla THL:llä tehdään DNA-kirjastoista kokogenomisekvensointia. DNA-kirjaston tekoa varten tarvitaan genomista DNA:ta ja eristys- ja puhdistusmenetelmiä, joilla DNA pysyy mahdollisimman ehjänä [1, s. 105]. Myös DNA-pitoisuuden tulee olla tietyissä rajoissa, jotta kokogenomisekvensointi voidaan tehdä.

Tällä hetkellä yksikössä käytössä oleva manuaalinen Qiagen MagAttract HMW DNA -eristyskiti on toimiva, mutta se vie paljon aktiivista työaika. Sen avulla voidaan eristää DNA:ta 12 bakteerikannasta yhden työpäivän aikana. DNA-eristysautomaatit voivat mahdollistaa entistä tehokkaamman ja manuaalisia työvaiheita vähentävän työskenteilyn, jolloin aktiivista työaika vapautuu muihin työtehtäviin. Lisäksi manuaalisella eristyksellä, etenkin tietyillä grampositiivisilla bakteereilla, on saatu melko pieniä DNA-pitoisuuksia. Tarkoituksena on, että eristysautomaatin avulla saavutettaisiin korkeampia pitoisuuksia näiden bakteereiden kohdalla.

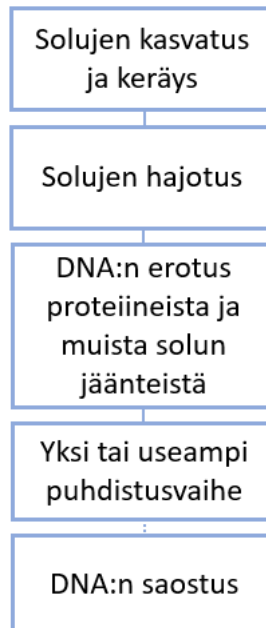
Teoreettinen osa

2 DNA-eristysmenetelmät yleisesti

Ennen kuin DNA:ta voidaan käsitellä sitä muokkaavilla entsyymeillä, monistaa polymeeraasiketjureaktiolla (polymerase chain reaction, PCR) tai sekvensoida, se täytyy eristää ja puhdistaa [1, s. 103]. Useat tekijät vaikuttavat sopivimman eristysmenetelmän valintaan; tällaisia ovat muun muassa eristetyn DNA:n laatuvaatimukset, analysoitavien näytteiden määrä, mahdolliset rajoitteet näytevolyymissa, eristetyn DNA:n käyttötarkoitus ja näytematriisi [2, s. 142]. Esimerkiksi rihmamainen ja pitkä kromosomaalinen DNA pilkkoutuu herkästi mekaanisia leikkausvoimia synnyttävissä työvaiheissa, kuten DNA-liuosta pipetoitaessa ja sentrifugoitaessa [3, s. 99]. Genomisen DNA-kirjaston valmistaminen vaatii mahdollisimman ehjänä pysynyttä eristettyä DNA:ta, kun taas PCR:ssä DNA voi olla osittain katkeillutta [1, s. 105].

2.1 DNA-eristyksen päävaiheet

DNA:n eristysprosessissa DNA vapautetaan solusta, jonka jälkeen se erotetaan solunesteestä ja proteiineista [4]. Eläinmateriaalista suurikokoista genomista DNA:ta eristettäessä eristysprosessi aloitetaan homogenisoimalla kudokset tai keräämällä soluja soluviljelmistä tai verestä [1, s. 105]. Kokonais-DNA:ta voidaan eristää myös kasveista ja bakteeriviljelmistä. Bakteerisolujen DNA:n eristäminen aloitetaan kasvattamalla bakteerisoluja maljoilla tai liemiviljelmässä. [5, s. 27–28.] Seuraavat eristyksen perusvaiheet ovat solujen hajotus ja DNA:n puhdistus [4]. Usein eristetty genomisen DNA halutaan puhdistuksen jälkeen vielä konsentroida saostamalla suolan ja alkoholin avulla, mikä ei kuitenkaan aina ole menetelmästä riippuen tarpeen [2, s. 147]. DNA-eristyksen päävaiheet ovat esitetty vielä kuvassa 1.



Kuva 1. DNA-eristyksen päävaiheet.

2.2 Solujen hajotus

Solujen hajotuksen aikana bakteerisolujen sytoplasmassa sijaitseva kromosomaalinen ja plasmidi-DNA vapautuu liuokseen bakteerin soluseinän hajotessa [4]. Solut hajotetaan DNA-eristysprosessissa tyypillisesti kemiallisesti, fysikaalisesti mekaanisten voimien avulla tai entsyymaattisesti. Useimmissa protokollissa käytetään kemiallista solujen hajotusta joko yksistään tai yhdistettynä fysikaalisen tai entsyymaattisen hajotuksen kanssa. [2, s. 145.] Menetelmät tulevat vielä esille tarkemmin seuraavissa luvuissa.

2.3 DNA:n puhdistusmenetelmiä

2.3.1 Solunesteen puhdistus proteiineista ja RNA:sta

DNA:n puhdistamiseksi ylimääräisistä substansseista on useita erilaisia menetelmiä [1, s. 105]. Koska solujen hajotuksen jälkeen soluneste sisältää DNA:n lisäksi merkittäviä määriä proteiineja ja RNA:ta, käytetään tyypillisesti proteinaasi K:ta auttamaan DNA:n vapautumisessa ja hajottamaan proteiineja [4]. RNAasin avulla voidaan hydrolysoida RNA:t pienemmiksi [3, s. 99]. Perinteiset puhdistusmenetelmät sisältävät detergenttien ja orgaanisten liuottimien käyttöä ja ovat aikaa vieviä - useat vaihtoehtoiset menetelmät

voivat vähentää työskentelyaikaa, kuluja ja myrkyllisten kemikaalien käyttöä [2, s. 141]. Perinteisempien puhdistustekniikoiden lisäksi on saatavilla kaupallisia puhdistuskitejä, jotka voivat olla eri eliöille hyvin tarkkaan räätälöityjä [1, s. 105–106].

2.3.2 Fenoli-kloroformiuutto

Fenoli-kloroformiuutto on hyvin perinteinen puhdistusmenetelmä, joka on nykyään korvattu lähes kokonaan silikamenetelmillä [1, s. 105]. Menetelmän avulla saadaan hyvin puhdasta DNA:ta, mutta myrkyllisten liuottimien käyttö tekee menetelmästä sopimattoman suurille näytemäärille [2, s. 146]. Fenolin tai fenolin ja kloroformin seos saostaa liuksesta proteiinit, mutta nukleiinihapot (DNA ja RNA) jäävät vesiliuokseen. Kun soluneste sekoitetaan varovasti orgaanisen liuottimen kanssa ja kerrokset erotetaan sentrifugoimalla, saostuneet proteiinimolekyylit jäävät valkoisena saostumana rajapinnalle vesiliuoksen ja pohjalla olevan orgaanisen liuoksen väliin. Nukleiinihapot sisältävä vesiliuos voidaan pipetoida talteen. Jos solunesteen proteiinipitoisuus on suuri, voidaan uutto joutua toistamaan useita kertoja, mikä voi johtaa DNA-molekyylien pilkkoutumiseen. Tämä voidaan kuitenkin ehkäistä pronaasi- tai proteinaasi K -käsittelyn avulla hajottamalla polypeptidejä pienemmiksi yksiköiksi ennen uuttoa. [5, s. 32.]

2.3.3 Spin-kolonne

Spin-kolonnin avulla tehtävä DNA:n puhdistus on yksi silikamenetelmistä. Siinä silikamatriksi on yleensä sidottu pieneen kolonniin. [1, s. 106.] Nämä menetelmät perustuvat vahvaan affiniteettiin negatiivisesti varautuneen DNA:n rungon ja positiivisesti varautuneiden silikapartikkelien välillä [6]; korkea pH ja suolapitoisuus edistävät DNA:n sitoutumista tiukasti silikamatriksiin [2, s. 147]. DNA:n sitomisen jälkeen epäpuhtaudet voidaan pestä pois, ja puhdistettu DNA eluoidaan talteen matalan ionivahvuuden omaavalla puskurilla. [6.]

Spin-kolonnimenetelmässä esimerkiksi kokonais-DNA-näyte viedään kolonniin kaotrooppiliuoksessa, ja kolonne laitetaan vastaanottoputkeen. Kolonnin pohjalla on silikakalvo, jonka läpi näyteliuos sentrifugoidaan. Tämän seurauksena DNA kiinnittyy silikaan. Epäpuhtaudet poistetaan pesemällä korkeassa suolapitoisuudessa puskuroidulla 80-prosenttisella etanolilla ja pesuliuokset sentrifugoidaan silikakalvon läpi.

Puhdistettu DNA eluoidaan pienellä määrällä laimeaa puskuria kalvon läpi puhtaaseen, steriiliin vastaanottoputkeen. [1, s. 106.]

2.3.4 Magneettipartikkelit

Silikamenetelmää sovelletaan myös magneettipartikkelien käyttöön perustuvissa menetelmissä. Magneettipartikkeleita hyödyntävissä menetelmissä nukleiinihapot (DNA tai RNA) sidotaan silikakalvon sijaan paramagneettisiin partikkeleihin, jotka on päällystetty silikalla. Periaate nukleiinihappojen sitoutumisessa, pesussa ja irrottamisessa partikkeleista on samanlainen, kuin spin-kolonnimenetelmässä. [1, s. 107.] Sitomisessa suositaan pinta-alaltaan suurempia materiaaleja, kuten magneettihelmiä, niiden suuremman sitomiskapasiteetin vuoksi [6].

Erilaiset magneettipartikkeleita hyödyntävät teknologiat ovat suhteellisen helposti mahdollisia automatisoida, jolloin useita näytteitä voidaan käsitellä samanaikaisesti. Esimerkiksi magneettisen keräilykärjen avulla partikkelit saadaan siirrettyä liuoksesta toiseen putkesta tai kuoppalevyn kuopasta joko manuaalisesti tai automaattisesti. Vaiheet toistuvat menetelmän mukaisesti eri liuoksilla. On mahdollista myös kiinnittää magneetti putken tai kuoppalevyn ulkopuolelle, jolloin magneettipartikkelit sitoutuvat putken tai kuopan pohjalle, ja liuos voidaan pipetoida manuaalisesti tai automaattisesti pois. Tämän jälkeen uusi liuos pipetoidaan putkeen ja kun magneetti otetaan etäämmälle putken pohjasta, magneettipartikkelit saadaan vapautumaan liuokseen. Vaiheita toistetaan protokollan mukainen määrä. [1, s. 107.]

MagAttract HMW DNA -eristyskitti

Asiantuntijamikrobiologiayksikössä käytössä oleva manuaalinen eristyskitti Qiagen MagAttract HMW DNA perustuu magneettihelmiteknologiaan. Se on tarkoitettu DNA:n eristykseen useista erilaisista näytemateriaaleista, kuten verestä, kudoksesta tai bakteerisolusta. Kitti sisältää kaikki tarvittavat reagenssit. Magneettipartikkelit ja niihin sidottu DNA erotetaan muusta nesteestä ulkoisen magneetin avulla. [7.]

2.4 DNA:n pitoisuuden ja puhtausasteen määrittämenetelmiä

DNA:n pitoisuuden määrittämiseksi on useita erilaisia menetelmiä. Ne vaihtelevat tarkkuudessa, käytettävyydessä sekä hinnassa. [1, s. 110.]

2.4.1 Spektrofotometrisiä menetelmiä

DNA-liuoksen pitoisuus voidaan arvioida spektrofotometrisellä mittauksella DNA:n nukleotidien absorptioon perustuen aallonpituudella 260 nm, jolloin liuoksen $A_{260\text{nm}}=1,0$ vastaa kaksijuosteisen DNA:n pitoisuutta 50 $\mu\text{g DNA/ml}$ [3, s. 99]. DNA-liuosten puhtauden karkeaan mittaamiseen käytetään usein absorbanssisuhdetta 260/280 nm. Menetelmä on hieman epätarkka ja enemmän suuntaa antava [8, s. 1], mutta toteutukseen vaivaton [1, s. 111]. Puhtaan DNA:n absorbanssien suhde mitattaessa aallonpituuksilla $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ on 1,8. Jos näytteen absorbanssisuhde on matalampi, se kertoo näytteen sisältävän proteiineja, sillä ne absorboivat voimakkaasti 280 nm:ssä. Suuremmat arvot kertovat RNA-kontaminaatiosta, sillä RNA absorboi DNA:ta voimakkaammin 260 nm:ssä. [8, s. 1.]

Absorbanssisuhdetta 260/230 nm käytetään toissijaisesti nukleiinihappojen puhtautta mitattaessa. Suhdearvot puhtaille nukleiinihapoille ovat usein korkeampia kuin näytteiden vastaavat absorbanssisuhteella 260/280 nm mitatut arvot. Tavallisesti $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ -arvojen voidaan odottaa olevan välillä 2–2,2. Jos suhde on huomattavasti matalampi, se voi olla merkinä kontaminanteista, jotka absorboivat 230 nm:ssä. [9, s. 2.]

Nukleiinihappoja sisältävien liuosten pitoisuuden mittaamista varten on myös saatavilla erityisesti siihen tarkoitukseen suunniteltuja pienoisfluorometrejä ja -spektrofotometrejä. Tällaisilla pienoislaitteilla mitattaessa näytettä tarvitaan vain 1–50 μl samalla saaden arvio DNA-näytteen puhtaudesta. [1, s. 111.]

2.4.2 Fluoresenssiin perustuvia menetelmiä

Fluoresenssiin perustuvat määritykset sopivat erityisen hyvin näytteille, jotka sisältävät vähän DNA:ta. Kaksijuosteiseen DNA:han lisätään väriainetta, joka tehostaa näytteen fluoresenssia. DNA-pitoisuus määritetään tunnettuja konsentraatiota vastaan standar-

disuoralla. Myös esimerkiksi etidiumbromidia voidaan käyttää värjäävänä reagenssina. [2, s. 148.]

2.4.3 DNA:n puhtauden arviointi agarosigeelielektroforeesilla

Agarosigeelielektroforeesia voidaan käyttää DNA:n puhtauden ja pitoisuuden karkeaan arviointiin. Kun ajolaite kytketään sähkövirtaan, negatiivisesti varautuneet DNA:t lähtevät liikkumaan geelillä kohti positiivista napaa. Tunnetun molekyylipainostandardin avulla voidaan arvioida vyöhykkeiden fluoresenssien voimakkuutta. [10.]

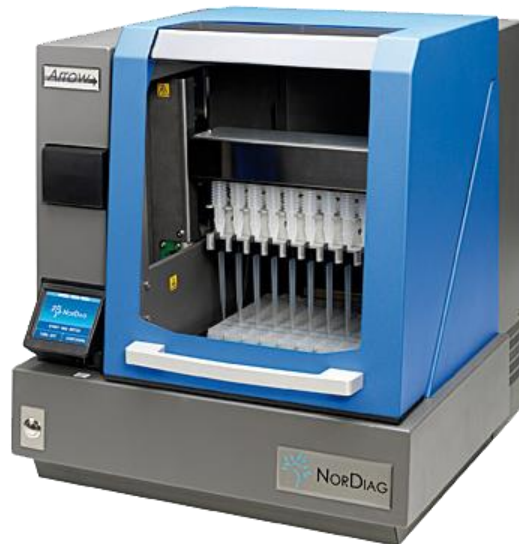
3 DNA-eristysautomaatit

Eristysautomaatit ovat usein kalliita ja monimutkaisia laitteita, jotka on suunniteltu usean näytteen samanaikaisen DNA:n eristämiseen [6]. Automaattisilla robottityöasemilla voidaan käsitellä esimerkiksi 384-kuoppalevyformaattiin ja silikamenetelmään perustuen 1000–10 000 näytettä työpäivän aikana. Nesteitä ja kuoppalevyjä käsitteleviä automaattisia työasemia voidaan hyödyntää nukleiinihappotekniikoiden lisäksi proteiinien käsittelyssä. [1, s. 108.]

Automaateista on myös yksinkertaisempia malleja, kuten tässä työssä käytetyt laitteet. Tällaiset mallit ovat usein pöydälle laitettavia, ja ohjaus ja protokollan säätö tapahtuvat laitteen näytöltä. Laitteet koostuvat muun muassa robottikädestä sekä lämpö- ja magneettiblokista. Tällaiset pienemmän näyteskaalan käsittelyyn soveltuvat laitteet ovat huomattavasti edullisempia. Monimutkaisuudesta riippumatta eristysautomaatit ovat helpottaneet ja yksinkertaistaneet nukleiinihappojen eristämisprosessia [6].

3.1 Eristysautomaattien toimintaperiaate

Arrow-eristysautomaatilla voidaan eristää DNA:ta ja RNA:ta kliinisistä näytteistä ja biologisesta materiaalista, kuten verestä, bakteereista ja viruksista. Näytteitä voidaan ajaa kerralla 1–12, ja yksi ajo kestää alle 45 minuuttia. Automaattiin ladataan lähtömateriaalille sopivin eristyskitti, joka sisältää kaikki eristysprosessissa tarvittavat reagenssit. Eristys perustuu magneettihelmien käyttöön. [11.] Automaatin työvaiheita voidaan seurata eristysajon aikana lasikannen läpi (kuva 2).



Kuva 2. Arrow-eristysautomaatti on automaattinen ja kompakti laite DNA:n eristämiseen. [11.]

Myös InnuPure C16 touch -eristysautomaatilla DNA:n ja RNA:n eristys onnistuu useasta biologisesta lähtömateriaalista, kuten kudoksesta, kasveista, bakteereista ja mykobakteereista. Laitteella käytettävät kitit hyödyntävät patentoitua matalaan suolapitoisuuteen ja kaksoiskemiaan perustuvaa teknologiaa, joka luo solujen hajotusta tehostavat olosuhteet ja vähentää riskiä siirtää suoloja eluutioon. [12, s. 9; s. 5.] Eristys perustuu Arrow-eristysautomaatin tapaan magneettisten partikkelien käyttöön; partikkelit toimivat kiinteänä faasina nukleiinihappojen sitomisessa. Näytteitä voidaan ajaa rinnakkain 1–16 [12, s. 4–5.], ja eristyksen kesto standardiprotokollalla on noin 54 minuuttia [13, s. 10–12]. Näytetarjotin työntyy automaattisesti ulos eristysautomaatin etuosan luukun kautta (kuva 3).



Kuva 3. InnuPure C16 touch -eristysautomaattia ohjataan itsenäisen tabletin kautta. [14.]

3.2 Eristysautomaattien hyödyt ja haitat

Automatisoidussa nukleinihappojen eristämisprosessissa on useita hyviä puolia. Automaatin käyttö muun muassa tehostaa näytteiden käsittelyä, vähentää aktiivista työaikaa ja samalla parantaa työturvallisuutta sekä mahdollistaa tulosten paremman toistettavuuden, laadun ja tasalaatuisuuden. Eristysprosessin nopeus, tarkkuus ja toimintavarmuus maksimoituvat [6], ja mahdollisuus suurempien näytevolyymien käsittelyyn helpottaa jälkikäsittelyä ja analyysejä [15, s. 6]. Eristysautomaatteja voidaan hyödyntää tehokkaasti erilaisissa ympäristöissä, sillä kaupallisia kittejä on monille erilaisille lähtö- materiaaleille, ja niitä voidaan käyttää samalla laitteella [11; 12, s. 3].

Lisäksi eristysautomaattien käyttö vähentää kontaminaatioita. Arrow-eristysautomaatin eristysajon protokollan aikana kärjet pestään [15, s. 6], ja InnuPure C16 Touch -laitteella käytetään jokaisella näytteellä kahta aerosolifilterikärkeä, jotka vaihdetaan automaattisesti ajon aikana. Kertakäyttöisten kärkien käyttö pienentää ristikontaminaatioiden riskiä ja vähentää huoltokuluja. [12, s. 3.] Eristysautomaattien puhdistus ja dekontaminointi sisäpuolelta on helppoa; Arrow-eristysautomaatissa on sisäänrakennettu UV-valo [15, s. 6] ja InnuPure C16 touch -laitteeseen sen saa hankittua erikseen [12, s. 3]. Automaateissa voidaan myös hyödyntää teknologiaa, jossa viivakoodien avulla kitit ovat esimerkiksi jäljitettävissä [6] ja dataa voidaan helposti siirtää [12, s. 8].

Vaikka automaateissa on paljon hyviä puolia, on niillä myös omat heikkoutensa. Laitteisiin voi tulla vikoja, ja eristysajon aikana tapahtuvia laitteesta johtuvia virhelähteitä käyttäjän on hankala omatoimisesti havaita ja korjata. Näytteiden tulee olla melko tasalaatuisia, sillä saostunut bakteeri voi tukkia laitteen pipetointikärjet. Laittevalmistajilla voi olla suosituksia sopivasta bakteerimäärästä [13, s. 13], mutta todellista bakteerimäärää on kuitenkin työlästä mitata. Lisäksi eristysautomaatit usein maksavat useista kymmenistä tuhansista euroista ylöspäin [6].

4 Patogeeniset bakteerit

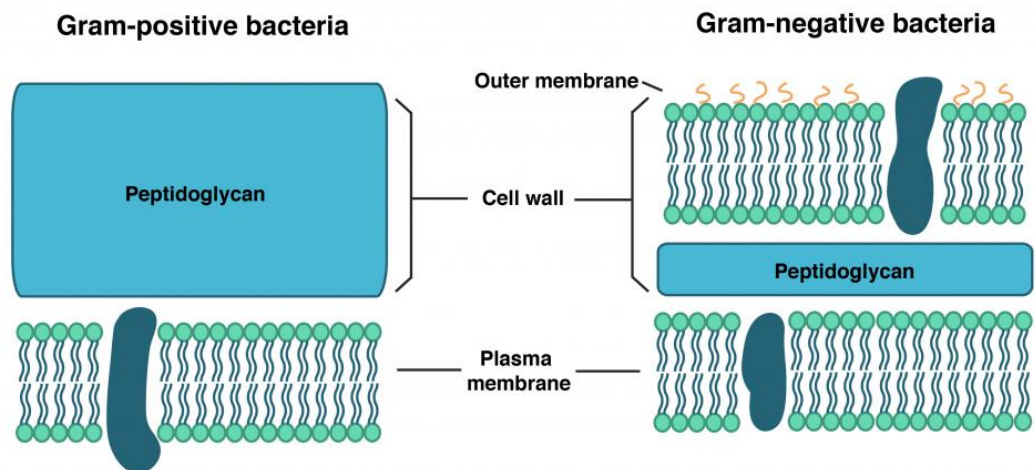
4.1 Bakteerien jaottelu soluseinän rakenteen mukaan

Erona eukaryoottisoluihin useimmilla bakteerisoluiilla on soluseinä plasmamembraanin ulkopuolella. Grampositiiviset ja gramnegatiiviset bakteerit eroavat soluseiniensä rakenteelta toisistaan, mikä tulee esille bakteerivärjäyksessä. [16, s. 21.] Menetelmä nimettiin kehittäjänsä Hans Christian Joachim Gramin mukaan, ja sitä käytetään yleisesti tutkittaessa bakteereja mikroskoopilla. Gramvärjäyksen jälkeen bakteerit voidaan tunnistaa grampositiivisiksi bakteereiksi, jotka kristallivioletilla värjätessä näkyvät tumman sinisinä tai violetteina, tai gramnegatiivisiksi, jotka safraniinilla tehdyn vasta värjäyksen jälkeen ovat punaisia tai vaaleanpunaisia. Bakteerien soluseinän rakenteet selittävät erilaisen värjäystuloksen. [17, s. 322.]

Peptidoglykaanista muodostuva soluseinä on bakteereille ominainen [16, s. 21]. Yksi peptidoglykaanikerros on noin 1 nm paksu, ja grampositiivisilla bakteereilla niitä on useita kerroksia päällekkäin. Tyypillisesti niiden soluseinä on paksuudeltaan 15–30 nm. [18, s. 6.] Grampositiivisten bakteerien soluseinä on paljon gramnegatiivisten bakteerien soluseinää paksumpi [16, s. 21], ja niiden soluseinän peptidoglykaani sisältää enemmän ristikkäissidoksia [18, s. 11]. Paksun peptidoglykaanikerroksensa vuoksi grampositiiviset bakteerit ovat herkkiä lysosyymikäsittelylle, jota voidaan käyttää soluseinän hajottamiseksi ennen DNA:n eristystä [16, s. 25]. *Staphylococcus aureus* -bakteerin kohdalla käytetään myös lysostafiinia tehostamaan solujen hajotusta [2, s. 178] - lysostafiini hajottaa stafylokokin soluseinälle ominaiset viiden glysiiniyksikön muodostamat sillat. Grampositiivisten bakteerien soluseinälle ovat tyypillisiä myös peptidoglykaaniin tai plasmamembraaniin kovalenttisella sidoksella liittynyt teikkohappo-

runko, polysakkaridirakenteiset polymeerit ja joillain bakteereilla vielä proteiinikerros näiden rakenteiden ulkopuolella. [16, s. 84; s. 26.]

Gramnegatiivisilla bakteereilla on rakenteeltaan monimutkaisempi soluseinä, joka on kuitenkin helpompi hajottaa. Soluseinän ulkopuolella ylimääräinen niin sanottu ulkomembraani, joka on rakenteeltaan lipidi-kaksoiskalvo. Ulkomembraanin ulkopinta on lipopolysakkaridia, ja sen sisälehdessä on fosfolipidejä. Lisäksi se sisältää proteiineja. Peptidoglykaaniverkko sijaitsee periplasmisessa tilassa, joksi kutsutaan tilaa plasmamembraanin ja ulkomembraanin välissä. [16, s. 26.] Kuvan 4 yksinkertaistetussa mallissa nähdään selkeästi grampositiivisten ja -negatiivisten bakteerien soluseinän eroja.



Kuva 4. Grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteerien soluseinän rakenne. Grampositiivisilla bakteereilla on soluseinässään huomattavasti gramnegatiivisia bakteereja paksumpi peptidoglykaanikerros. Gramnegatiivisten bakteerien soluseinässä on kaksi fosfolipidikaksoiskalvostoa. [19]

4.2 *Salmonella enteritidis*

Salmonellat ovat gramnegatiivisia, fakultatiivisia sauvabakteereita [17, s. 699], jotka aiheuttavat yleis- ja suolistoinfektioita. Useimmat infektiot johtuvat ulosteesta kontaminoituneen ruuan tai veden nauttimisesta. Salmonellasuvun bakteerin aiheuttaman sairauden, salmonelloosin, laatu riippuu infektoivan salmonellabakteerin serotyypin lisäksi kantajan terveydentilasta. [20, s. 2763–2764.] *S. typhi* ja *S. paratyphi* aiheuttavat yleis-

sinfektioihin kuuluvia vakavaa lavantautia ja lievempää pikkulavantautia. Nämä taudit eivät ole enää yleisiä vauriissa maissa ja Suomessa. Enteriittioireita aiheuttavat salmonellat aiheuttavat yleensä äkillistä ripulia, vatsakipua ja kuumeilua. Salmonellaenteriitti voi olla vakava henkilöllä, jonka yleinen vastustuskyky on heikentynyt. Jotkin salmonellakannat ovat toksiineja muodostavia. [16, s. 185–187.]

S. enteritidis on toinen maailmanlaajuisesti tavallisimmista salmonellojen serotyypeistä ja yleisin ulkomailta saadun salmonelloosin aiheuttaja [16, s. 184]. Vuonna 2016 Suomessa todettiin 83 kotimaista *S. enteritidis* -serotyypin aiheuttamaa salmonellatapausta [21, s. 22]. Salmonellojen esiintyvyyttä elintarvikkeissa seurataan kansallisen valvontaohjelman mukaisesti [22]. Suomessa salmonellakannat ovat hyvin hoidettavissa mikrobilääkkeillä, sillä tiukka valvonta kotieläinten antibioottien ja ihmisten mikrobilääkkeiden käytössä on ehkäissyt resistenssiä syntymästä. Lavantautia hoidetaan mikrobilääkkeillä, enteriitit parantuvat yleensä itsekseen. Pitkittyneenä tautia voidaan hoitaa antibiooteilla. [16, s. 188.]

4.3 *Staphylococcus aureus* ja MRSA

S. aureus on merkittävin patogeeni stafylokokkien joukossa [18, s. 309], ja se on yleinen sairaalainfektioiden aiheuttaja [23, s. 7]. *S. aureus* -bakteerit ovat gram- ja koagulaasipositiivisia, aerobisissa oloissa eläviä rypälekokkeja [17, s. 354–356]. Ne leviävät tavallisimmin epäsuoran tartunnan kautta, esimerkiksi infektiokohdasta puhtaaseen haavaan välittäjän käsistä tai likaisten esineiden tai instrumenttien kautta. Tartunta voi tapahtua myös suorassa kosketuksessa ja aerosolitartuntana; stafylokit voivat elää esimerkiksi sairaaloissa leijailevassa pölyssä. [24, s. 31.] *S. aureus* voi aiheuttaa infektion niin perusterveille ihmisille kuin sairaalapotilaille, joilla vastustuskyky on heikentynyt [16, s. 81]. On yleistä, että terveet henkilöt kantavat bakteeria oireettomasti nenäsään [23, s. 4].

Metisilliiniresistentit stafylokokit (MRSA:t) ja niiden aiheuttamat infektiot ovat maailmanlaajuinen ongelma [24, s. 33]. Vastustuskyky antibiooteille selittyy MRSA:n kromosomissa sijaitsevalla *mecA*-geenillä, joka tuottaa bakteerin pinnalle muuntunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia (PBP2a) [23, s. 4]. MRSA-kannat ovat lisääntyneet nopeasti viime vuosina useissa maissa. Ne ovat lisääntyneet myös Suomessa [16, s. 90]; vuonna 2016 ilmoitettiin 1 700 uudesta MRSA-tapauksesta, mikä oli edellisvuoteen verrat-

tuna huomattavasti enemmän [21, s. 34]. MRSA-tapaukset eivät aiheuta selvästi vaikeampia infektioita kuin metisilliinille herkät *S. aureus* -bakteerit, vaan tautien oireet ja vaikeusaste ovat hyvin samankaltaisia [23, s. 6]. MRSA:n aiheuttamien infektioiden hoito on kuitenkin vaikeaa, koska ne ovat vastustuskykyisiä mikrobilääkkeille [16, s. 90] ja kaikille muille beetalaktaamiantibiooteille [18, s. 465]. Bakteeri voi levitä sairaaloissa nopeasti ja saada aikaan infektio- ja tartuntaepidemioita. MRSA aiheuttaa sairaaloissa syntyviä leikkaushaava- ja luuinfektioita sekä septisiä yleisinfektioita. Ongelmallista bakteerin kannalta on myös se, että infektion saanut kantaja voi kantaa bakteeria vuosia ja sairaalahoidossa tartuttaa jatkuvasti uusia potilaita. [16, s. 90.] Sairaaloissa MRSA leviää muiden sairaalabakteerien tavoin helpoiten henkilökunnan käsien välityksellä ja ne ovat usein vastustuskykyisiä desinfiointiaineille [24, s. 33]. Tämän vuoksi tartuntojen ehkäisy on erityisen tärkeää [16, s. 6].

4.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes on yleinen grampositiivinen, fakultatiivisesti anaerobinen sauvabakteeri, joka on tavallinen maaperässä, vedessä ja lähes kaikissa eläinlajeissa [17, s. 462]. Se pystyy lisääntymään laajalla lämpötila-alueella (0–45 °C) [25, s. 4]. Ihminen voi saada saastuneiden elintarvikkeiden, kuten lihan tai kasvien, välityksellä *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttaman listerioosisairauden [18, s. 473]. Terveillä aikuisilla ja lapsilla tavataan vakavia listerioositartuntoja erittäin harvoin. Ruuan kautta saatu suuri *L. monocytogenes* -pitoisuus aiheuttaa terveellä aikuisella tavanomaisen ruokamyrkytyksen oireita, kuten ripulia, kuumetta tai oksentelua. [16, s. 136–137.] Raskaana oleville naisille infektio voi aiheuttaa ennenaikaisen synnytyksen tai keskenmenon. Heikentyneen vastustuskyvyn omaavilla ihmisillä, kuten syöpään sairastuneilla, elinsiirron saaneilla tai vanhoilla ihmisillä, on kasvanut riski saada listeriainfektio. Tällaisilla henkilöillä tauti ilmenee yleisimmin septiksenä, meningiittinä tai meningoenkefaliittina. [17, s. 462–463.]

Tavallisimmin tartunta saadaan elintarvikkeesta, joka sisältää patogeeniä. *L. monocytogenes* -bakteerin merkitys infektioiden aiheuttajana on kasvanut uusien ja muuttuvien elintarvikkeiden prosessien myötä muun muassa lisäaineiden käytön vähennyttyä ja uusien pakkaustapojen lisääntyttyä. Myös tuotteiden myyntiajat ja kylmäketjut ovat pidentyneet. [16, s. 138.] Erityisen uhkan elintarviketeollisuudelle *L. monocytogenes* -bakteerista tekee myös se, että se selviää sille epäsuotuisissa olosuhteissa pidempään

verrattuna useimpiin itiöimättömiin elintarvikeperäisten infektioiden aiheuttajabakteereihin [25, s. 22]. Useimmiten yksittäistapauksina esiintyvät listeriainfektiot on usein vaikea yhdistää tiettyyn elintarvikkeeseen muun muassa bakteerin pitkän itämisajan vuoksi [16, s. 138]. Vuonna 2016 Suomessa todettiin 67 *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttamaa yleisinfektiotapausta [21, s. 20].

4.5 Vankomysiiniresistentti *Enterococcus faecium* (VRE)

Enterokokit ovat grampositiivisia, katalaasinegatiivisia kokkeja, jotka esiintyvät yksittäisinä, pareittain tai lyhyisiin ketjuihin järjestäytyneinä. Ne ovat fakultatiivisesti anaerobeja ja pystyvät kasvamaan ja elämään joustavasti erilaisissa kasvuolosuhteissa. Näitä mikro-organismeja löytyy maaperästä, kasveista, vedestä, ruuasta ja eläimistä. [17, s. 403, 405.] Ne myös ovat tärkeä osa ihmisen ja usean eläimen suolen normaaliflooraa. Enterokokit voivat esiintyä myös pienissä määrin ihmisen suussa sekä urogenitaalialueella. [16, s. 126.] Niiden kyky aiheuttaa tauti terveelle ihmiselle on pieni. Ne aiheuttavat tyypillisiä ja merkittävämpiä opportunisti-infektioita vasta henkilön vastustuskyvyn heikennyttyä [26, s. 3], antibioottikuurin jälkeen kilpailevien bakteerien vähennyttyä tai elimistön estemekanismin ohittamisen jälkeen [16, s. 126]. Yleisimmin ne aiheuttavat tulehduksia muun muassa virtsateissä, palo- ja leikkaushaavoissa sekä vatsaonteloissa [17, s. 405].

Enterokokit ovat luontaisesti resistenssejä useimmille antibiooteille [16, s. 127]. Vankomysiini on soluseinään vaikuttava antibiootti. Syystäkin vankomysiiniresistentin enterokokin syntyminen on aiheuttanut suurta huolta lääketieteellisessä yhteisössä. [18, s. 267.] Vastustuskyky vankomysiinille on hankittu ominaisuus, joka ilmentyy vähintään kolmesta geenityypistä: *vanA*, *vanB* ja *vanC* [26, s. 3]. Vankomysiini on ollut tavallisesti käytetty lääke esimerkiksi MRSA:n aiheuttamiin tartuntoihin – sen käytön lisääntyttyä myös VRE on yleistynyt maailmalla. Uudet lääkkeet ovat auttaneet hetkellisesti infektioiden hoidossa. On uskottu useimpien tartunnan saaneiden voivan jäädä VRE:n kantajiksi loppuelämäkseen, ja varsinkin antibioottien käyttö näyttäisi pitkittävän kantajuutta. Kuitenkin pitkä jakso ilman antibioottien käyttöä näyttäisi poistavan ihmiseltä VRE:n. [16, s. 128.] Vuonna 2016 Suomessa oli 71 uutta VRE-tapausta, joista 66 oli *E. faecium* -lajia [21, s. 37].

4.6 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae on merkittävä syy sekä lievempiin ylempien hengitysteiden infektoihin että vakaviin invasiivisiin bakteeriperäisiin sairauksiin etenkin hyvin nuorilla ja vanhoilla, mutta myös aikuisilla [27, s. 15; 18, s. 214]. Se on grampositiivinen ja fakultatiivisesti anaerobinen, α -hemolyyttinen streptokokki, joka nestemäisessä elatusaineessa kasvaa muodostaen pareja tai eripituisia ketjuja [17, s. 383–384; 16, s. 112]. Pneumokokkiin liittyvä sairastavuus ja kuolleisuus ovat suuria mikrobilääkkeistä huolimatta [16, s. 112; 27, s. 16]. Bakteerin elinympäristö ihmisessä on nenänielussa, josta se voi aiheuttaa infektoita keuhkoihin, vereen tai aivoihin [18, s. 214]. Infektoita on erityisesti ihmisillä, jotka ovat hieman aikaisemmin sairastaneet virusinfektion tai joiden yleiskunto on alentunut [24, s. 36]. Vuosittain miljoonia menehtyy pneumokokin aiheuttamaan keuhko-kuumeeseen, merkittävä osa on kehitysmaiden lapsia [27, s. 16]. Pneumokokki myös on tärkein taudinaiheuttaja akuuteissa välikorvatulehduksissa ennen kaikkea pienillä lapsilla sekä avohoitokeuhko-kuumeessa Suomessa ja muualla maailmassa [16, s. 112].

Vaikka hoitomuodot ovat parantuneet ja muun muassa rokotteita on saatu kehitettyä, korostuu taudin ennaltaehkäisyn tärkeys *S. pneumoniae* -bakteerin vähentyneen mikrobilääkeherkkyyden vuoksi [16, s. 112]. Suomessa pneumokokkitartuntoja vastaan on käytettävissä yksi polysakkaridirokote ja kaksi konjugaattirokotetta. Kansalliseen rokotusohjelmaan kuuluu pienille lapsille annettava 10-valenttinen konjugaattirokote. [28.] Vuonna 2016 vakavia invasiivisia pneumokokki-infektioita ilmoitettiin Suomessa 824, joissa 4 %:ssa tapauksista sairastuneet olivat alle 5-vuotiaita lapsia ja 50,8 %:ssa yli 65-vuotiaita [21, s.46].

Kokeellinen osa

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Valitut bakteerilajit

Tähän työhön valikoitui yleisiä patogeenejä, joita lähetetään paljon Asiantuntijamikrobiologiayksikköön. Niille kaikille tehdään kokogenomisekvensointia. Grampositiivisia bakteereja valittiin useampi siksi, että niiden DNA:n eristäminen manuaalisesti on osoittautunut hankalaksi. Gramnegatiivinen *Salmonella enteritidis* taas valittiin sillä perusteella, että helpommin eristettävä bakteeri olisi hyvä alku työlle työskentelymenetelmiä harjoiteltaessa ja jotta työhön saataisiin sekä grampositiivisia että -negatiivisia bakteereja. Bakteerikannoista valikoitiin työhön kantoja, joista oli saatu manuaalisella kitillä eristettynä matalampia ja korkeampia DNA-konsentraatioita.

5.2 Bakteerien viljely

Pakkaseen säilytyistä bakteerikannoista viljeltiin maljoille tuoret puhdasviljelmät. *S. enteritidis* -kannat viljeltiin R1-maljoille ja *S. pneumoniae*-, MRSA-, *L. monocytogenes*- sekä VRE-kannat verimaljoille. *S. pneumoniae* -bakteerit ja VRE:t kasvatettiin 5-prosenttisessä hiilidioksidiatmosfäärissä 37 °C:ssa, muut bakteerikannat samassa lämpötilassa lämpökaapissa. Bakteerien kasvatusaika oli noin 18–24 tuntia.

5.3 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden manuaaliset esikäsittelyt vaihtelivat hieman bakteerilajista ja eristysautomaatista riippuen. Muun muassa puskurien valinnoissa ja entsyymikäsittelyissä mukailtiin THL:n työohjetta DNA:n eristykseen MagAttract HMW DNA -kitillä. Lisäksi huomiointiin otettiin kummankin laitevalmistajan suositukset, ja näiden pohjalta lähdettiin testaamaan sopivaa protokollaa kullekin bakteerilajille. InnuPure C16 touch -automaatin kohdalla valmistajan solujen hajotusprotokollaa piti soveltaa jonkin verran, sillä se ei sisältänyt ollenkaan muun muassa RNAasi A -käsittelyä, ja valmistajan suosittelman

erikseen ostettavan lysostafiinin pitoisuus poikkesi tässä työssä käytetystä. Lisäksi protokolla suosittelee käytettäväksi kitin mukana tulevaa solujen hajotusliuosta.

Kaikkien näytteiden esikäsittelyt aloitettiin pipetoimalla 2 ml:n Eppendorf-putkiin 300 µl THL:n laboratoriotyön tukipalveluista (LATU) tilattua TE-puskuria (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, pH 8,0), jonka jälkeen putkiin kerättiin maljoilta kunkin bakteerilajin kohdalla tietty määrä bakteerimassaa. Sitten putkia sentrifugoitiin 13 000 x g (times gravity, kerta painovoima) 2 minuuttia, ja supernatantti pipetoitiin pois. Supernatantin poistamisen jälkeen bakteeripelletti liuotettiin joko LATU:ssa valmistettuun P1- (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) tai TE-puskuriin.

Kaikille muille paitsi *S. enteritidis* -kannoille tehtiin lysotsyymikäsittely (100 mg/ml, LATU), jonka jälkeen näytteitä inkuboitiin bakteerista riippuen 1–2 tuntia Eppendorf Thermomixer C -lämpöravistelijassa 37 °C:ssa kierrosnopeudella 900 rpm (revolutions per minute, kierrosta minuutissa). MRSA-kannoille lisättiin lysotsyymin lisäksi lysostafiinia (1 mg/ml, SIGMA). Tämän jälkeen InnuPurella eristettäviin näytteisiin sekoitettiin mukaan solujen hajotusliuos. Molempien eristysautomaattien näytteisiin lisättiin vielä proteinaasi K:ta; InnuPuren näytteisiin käytettiin kitin mukana tullutta (20 mg/ml) ja Arrow-näytteisiin Qiagenin entsyymiliuosta. Näytteitä inkuboitiin 30 minuuttia lämpöravistelijassa 56 °C:ssa 900 rpm:ssä. Viimeisenä vaiheena ennen varsinaista eristysajoa näytteille tehtiin vielä RNAasi A (100 mg/ml, Qiagen) -käsittely, jonka jälkeen näytteitä inkuboitiin 5–15 minuuttia huoneenlämmössä (room temperature, RT).

Esikäsittelyt on esitetty bakteerikohtaisesti tarkemmin taulukoissa kummankin eristysautomaatin osalta. Arrow-eristysautomaatilla eristettyjen näytteiden esikäsittelyt löytyvät taulukosta 1.

Taulukko 1. Näytteiden esikäsittelyt ennen Arrow-eristysautomaatilla eristämistä.

TYÖVAIHE	BAKTEERILAJI				
	<i>S. enteritidis</i>	MRSA	<i>L. monocytogenes</i>	VRE	<i>S. pneumoniae</i>
Bakteerin määrä	10 pesäketä	Kaapaisu 1 cm:n matkalta	Lähes koko maljallinen	2 maljallista	2 maljallista
Pelletin liuotus	225 µl P1-puskuri	225 µl P1-puskuri	225 µl P1-puskuri	225 µl P1-puskuri	225 µl P1-puskuri
Lysostafini	-	17 µl	-	-	-
Lysotsyymi	-	28 µl	20 µl	28 µl	20 µl
1. inkubointi	-	37 °C, 1 h, 900 rpm	37 °C, 1 h, 900 rpm	37 °C, 2 h, 900 rpm	37 °C, 2 h, 900 rpm
Proteinaasi K	25 µl	25 µl	20 µl	25 µl	20 µl
2. inkubointi	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm
RNAasi A	5 µl	5 µl	4 µl	5 µl	4 µl
3. inkubointi	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min

InnuPure C16 touch -eristysautomaatilla käytettiin suurempaa näytevolyyymia kuin Arrow-eristysautomaatilla, mutta muuten esikäsittelyt vastasivat pitkälti samaa kaavaa (taulukko 2). Solujen hajotusliuoksen ja muun näyteliuoksen suhteen tuli olla 1:1.

Taulukko 2. Näytteiden esikäsittelyt ennen InnuPurella eristämistä.

TYÖVAIHE	BAKTEERILAJI				
	<i>S. enteritidis</i>	MRSA	<i>L. monocytogenes</i>	VRE	<i>S. pneumoniae</i>
Bakteerin määrä	10 pesäketä	Kaapaisu 1 cm:n matkalta	Lähes koko maljallinen	2 maljallista	2 maljallista
Pelletin liuotus	200 µl TE-puskuri	200 µl TE-puskuri	200 µl P1-puskuri	200 µl P1-puskuri	200 µl p1-puskuri
Lysostafini	-	17 µl	-	-	-
Lysotsyymi	-	15 µl	20 µl	25 µl	20 µl
1. inkubointi	-	37 °C, 1 h, 900 rpm	37 °C, 1 h, 900 rpm	37 °C, 2 h, 900 rpm	37 °C, 2 h, 900 rpm
Solujen hajotusliuos	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Proteinaasi K	25 µl	20 µl	20 µl	30 µl	20 µl
2. inkubointi	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm	56 °C, 30 min, 900 rpm
RNAasi A	5 µl	5 µl	4 µl	9 µl	4 µl
3. inkubointi	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min	RT, 5–15 min

5.4 DNA:n eristys

5.4.1 Viral NA -eristyskitti

Tässä työssä käytettiin Arrow-eristysautomaatilla Viral NA -eristyskittiä. Prosessissa DNA sidotaan magneettihelmiin, jonka jälkeen helmet erotetaan muusta liuksesta magneetin avulla. Tämän jälkeen puskurit voidaan aspiroida pois ja esimerkiksi lisätä uusi pesupuskuri. [11.] Yhdelle näytteelle tarkoitettu reagenssikasetti sisältää omissa

kaivoissaan magneettihelmet säilytyspuskurissa, solujen hajotuspuskurin, kaksi erillistä pesupuskuria, eluutiopuskuria, isopropanolia ja MilliQ-vettä [15, s. 8].

5.4.2 InnuPREP Bacteria DNA -eristyskitti

Tässä työssä InnuPure C16 touch -laitteella eristämiseen käytettiin innuPREP Bacteria DNA -kittiä, joka on suunniteltu DNA-eristykseen grampositiivisten ja -negatiivisten bakteerien bakteerisolupelletistä. Eristys perustuu magneettisten partikkelien käyttöön. [13, s. 3.] Yhtenä erona Arrow-eristysautomaatilla käytettyyn eristyskittiin, innuPREP Bacteria DNA -kitin mukana tulee erillinen solujen hajotusliuos, jota suositellaan protokollan mukaisesti lisättäväksi näytteiden joukkoon manuaalisten esikäsitelyvaiheiden yhteydessä ennen automaattisen eristyksen aloittamista [13, s. 13]. Kitti sisältää pitkälti samoja liuoksia kuin Viral NA -kitti – magneettipartikkelit omassa liuoksessaan, solujen hajotuspuskurin, puskurin, jonka avulla DNA sidotaan magneettipartikkeleihin, pesupuskureita, vettä kärkien pesua varten ja etanolia [13, s. 10–12].

5.4.3 Eristysautomaattien valmistelu ja käyttö

Eristysajoa varten laitteet esivalmisteltiin lataamalla niihin tarvittava määrä reagenssikasetteja ja kärkiä. Arrow-eristysautomaattia varten tarvittiin yksi pumppukärki näytettä kohden ja InnuPure C16 touch -laitteeseen ladattiin kaksi kärkeä per näyte. Arrow-eristysautomaatin reagenssikasetin kaikki kaivot peittävä folio rei'itettiin lävistystyökalan avulla. InnuPuren kohdalla ainoastaan näytekaivo avattiin, loput reiät laite teki itse ajon aikana. Arrow-eristysautomaattiin voitiin asettaa aukinainen näyteputki sellaiseenaan, mutta InnuPurella käsiteltävä näyte pipetoitiin reagenssikasetin tiettyyn kaivoon. Lopuksi molempiin laitteisiin laitettiin tarvittava määrä eluutioputkia, jonka jälkeen eristys voitiin aloittaa.

Arrow-eristysautomaatilla voitiin valita näytevolyyminä 250 tai 550 µl. Tässä työssä käytettiin 250 µl:aa. InnuPurella näytevolyyminä ei tarvinnut erikseen valita ennen ajoa, mutta protokollan mukainen ohjeistus oli 435 µl. Tässä työssä käytettiin bakteerilajista riippuen noin 430–460 µl:aa. Eluutiovolyyminä oli Arrow-eristysautomaatilla mahdollista valita 50 tai 100 µl ja InnuPurella 20–500 µl. Molemmilla laitteilla eluutiovolyyminä käytettiin aluksi 50 µl:aa, mutta siirryttiin lopulta 100 µl:aan.

Eristysajon päätyttyä eluutioputket otettiin talteen, ja reagenssikasetit, kärjet ja näyteputket voitiin hävittää. Laitteet pyyhittiin sisältä 95-prosenttisella etanolilla ja dekontaminoitiin vielä UV-valon avulla.

5.5 DNA-pitoisuuden mittaaminen

Tässä työssä eristettyjen DNA:iden pitoisuudet mitattiin Invitrogen Qubit 2.0 -fluorometrillä, jonka kanssa käytettiin dsDNA BR Assay -kittiä. Mittausta varten sekoitettiin yhtä näytettä kohden 199 µl Qubit dsDNA BR -puskuria ja 1 µl -reagenssia työskentelyliuokseksi. Standardit 1 ja 2 valmistettiin pipetoimalla 190 µl työskentelyliuosta ja 10 µl Qubit dsDNA BR standardi 1#:tä ja 2#:ta. Mittausnäytteet valmistettiin pipetoimalla omiin putkiinsa 195 µl työskentelyliuosta ja 5 µl eristettyä DNA:ta, jonka jälkeen näytteitä sekoitettiin vorteksoimalla ja niiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 2 minuuttia. Näytteet mitattiin Qubit-lukulaitteella standardisuoraa vastaan saaden niiden DNA-pitoisuudet yksikössä ng/µl.

DNA-pitoisuudet mitattiin testimielessä myös DeNovix DS-11 FX+ -spektrofotometrillä. Mittaustulokset kuitenkin jätettiin työssä huomioimatta, sillä alhaisilla DNA-pitoisuuksilla tulokset olivat epäluotettavia.

5.6 DNA:n puhtauden arviointi

5.6.1 Agarosigeelin valaminen

Tässä työssä DNA:n puhtaus arvioitiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Geeliajota varten laimennettiin LATU:sta tilattua 5-kertaista TBE-puskuria (Tris-boraatti-EDTA) puhdistettuun veteen 1:10, jolloin saatiin 0,5-kertainen käyttöliuos. 1-prosenttinen agarosigeeli valmistettiin liuottamalla Lonza SeaKem LE -agarosia 0,5-kertaiseen TBE-puskuriin.

5.6.2 Näytteiden valmistelu geeliajota varten

Geeliajota varten näytteet valmistettiin sekoittamalla 50 ng eristettyä DNA:ta ja 1 µl 6-kertaista DNA Loading Dyeta. Tämän jälkeen lisättiin nukleaasivapaata vettä siten, että

näytteiden lopputilavuudeksi saatiin 10 µl. Jotkut DNA-pitoisuudet olivat niin matalia, että DNA:ta ei saatu 50 ng:aa. Tällöin näytteeseen laitettiin eristettyä DNA:ta 9 µl ja 6-kertaista Loading Dye:ta 1 µl.

Molekyylipainostandardi valmistettiin sekoittamalla 2 µl Invitrogen 1 Kb DNA Extension Ladderia, 1 µl 6-kertaista DNA Loading Dye:ta ja 3 µl PCR-vettä.

5.6.3 Geelijaio, geelin värjäys ja kuvantaminen

Ajossa käytettiin Bio-Rad PowerPack Basic -ajolaitetta. Geelin reunimmaisiiin kaivoihin pipetoitiin 6 µl molekyylipainostandardia ja näytteitä pipetoitiin 10 µl. Näytteitä ajettiin jännitteellä 80 V 120 minuuttia. Geelin värjäämistä varten laimennettiin 20 µl etidiumbromidivarastoliuosta (10 mg/ml) 200 ml:aan puhdistettua vettä käyttöliuokseksi. Geeliä värjättiin liuoksessa noin 10 minuuttia, jonka jälkeen sitä huuhdeltiin puhdistetulla vedellä noin 10 minuuttia. Geeli kuvattiin Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+ -laitteella hyödyntäen Image Lab 6.0 -ohjelmaa. Geelikuvasta saatiin arvioitua eristetyn DNA:n laatu.

6 Tulokset

6.1 Eristystulokset ja geelikuvat

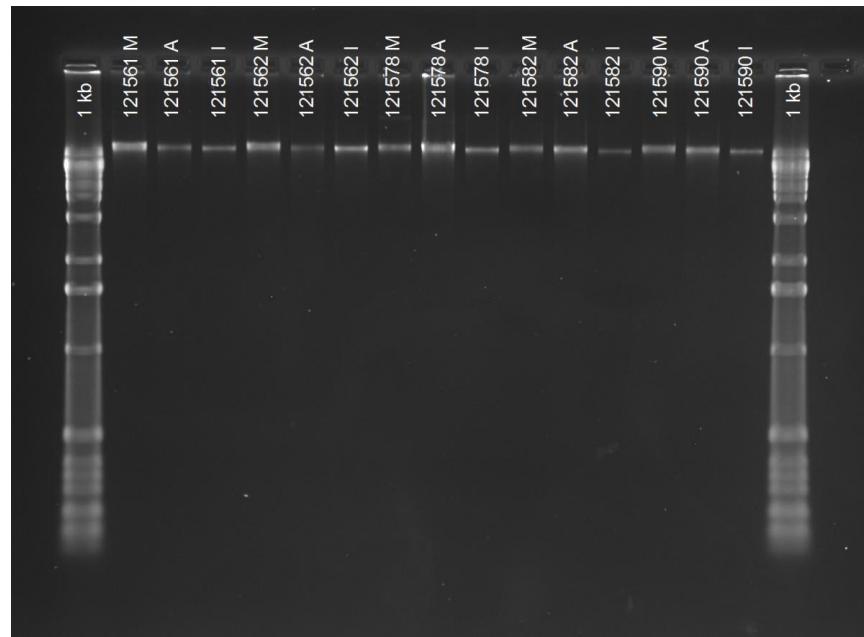
6.1.1 *Salmonella enteritidis*

Taulukossa 3 on esitetty rinnakkain manuaalisella MagAttrack-kitillä sekä Arrow- ja InnuPure-eristysautomaateilla eristettyjen *S. enteritidis* -kantojen DNA-pitoisuudet. InnuPurella eristetty DNA kannasta numero 10 oli pitoisuudeltaan niin matala, ettei Qubit-mittauslaite pystynyt ilmoittamaan sille pitoisuutta.

Taulukko 3. MagAttrackilla, Arrow-eristysautomaatilla ja Innupurella saadut DNA-eristystulokset *S. enteritidis* -kannoista yksikössä ng/ μ l. Taulukossa on lihavoitu korkein DNA-pitoisuus kaikkien menetelmien välillä.

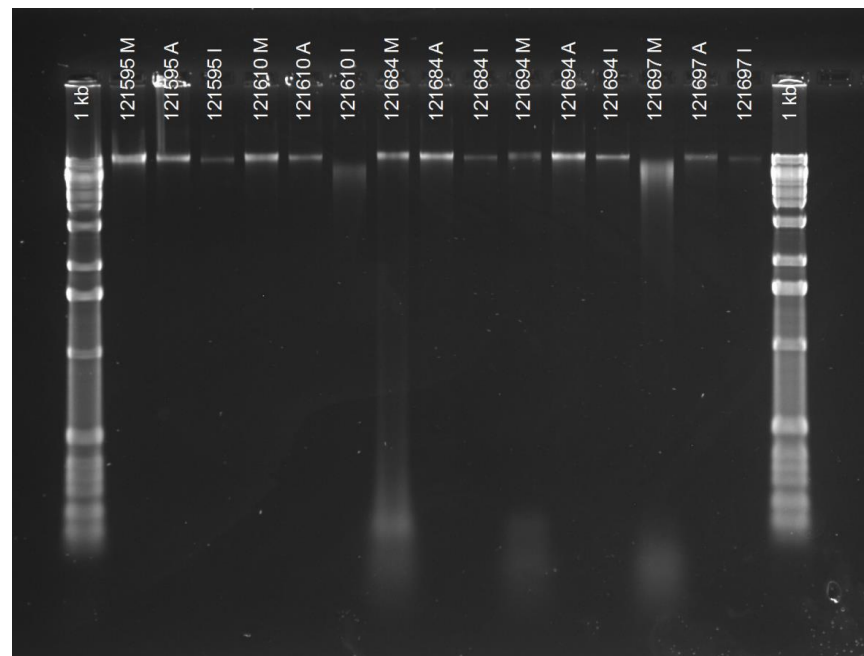
	Kanta	MagAttrack (ng/ μ l)	Arrow (ng/ μ l)	InnuPure (ng/ μ l)
1	121561	34,6	15,4	1,0
2	121562	35,5	14,2	2,5
3	121578	3,9	30,3	1,6
4	121582	3,7	20,2	0,6
5	121590	28,4	25,5	1,1
6	121595	21,2	19,8	0,6
7	121610	22,8	16,5	1,2
8	121684	5,8	20,9	0,6
9	121694	2,0	14,4	1,3
10	121697	6,1	8,3	liian alhainen pitoisuus

Kuvassa 5 nähdään salmonellakannat 1–5 ajettuina agaroosigeelille.



Kuva 5. *S. enteritidis* -kannat 1–5 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille. Kuvassa yhdestä kannasta kullakin eri menetelmällä eristetyt DNA:t ovat vierekkäin. Kantanumeron perässä kirjain "M" tarkoittaa MagAttractilla, "A" Arrow-eristysautomaatilla ja "I" InnuPurilla eristettyä DNA:ta. Reunimmaisissa näytekaivoissa ovat 1 kb:n kokomarkkerit.

S. enteritidis -kannat 6–10 geelille ajettuina ovat kuvassa 6.



Kuva 6. *S. enteritidis* -kannat 6–10 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.

6.1.2 MRSA

Eristettyjen MRSA-kantojen DNA-pitoisuudet ovat esitettyinä taulukossa 4. Eristyksen jälkeen kaikki DNA:t ajettiin geelille (liite 1).

Taulukko 4. MRSA-kantojen eristystulokset.

	Kanta	MagAttrack (ng/μl)	Arrow (ng/μl)	InnuPure (ng/μl)
1	17SA-517	2,6	26,9	2,5
2	17SA-1180	1,0	9,2	0,8
3	17SA-1207	8,4	1,7	1,2
4	17SA-1210	25,1	8,0	1,3
5	17SA-1233	7,2	4,9	0,8
6	17SA-1252	17,5	13,4	1,3
7	17SA-1255	24,2	6,3	0,7
8	17SA-1271	11,7	10,1	0,6
9	17SA-1287	1,0	2,1	0,7
10	17SA-1314	1,9	3,6	0,4

6.1.3 *Listeria monocytogenes*

Listerioiden eristystulokset ovat taulukossa 5. Geelikuva, jossa eristetyt DNA:t ovat ajettuina agarosigeelille, löytyy liitteestä 1.

Taulukko 5. Manuaalisella menetelmällä ja eristysautomaateilla eristettyjen *L. monocytogenes* -kantojen DNA-pitoisuudet.

	Kanta	MagAttrack (ng/μl)	Arrow (ng/μl)	InnuPure (ng/μl)
1	122222	2,8	20,2	7,5
2	122232	1,0	19,3	4,1
3	122261	5,6	15,9	3,1
4	122265	3,4	58,0	11,2
5	122266	1,0	28,5	5,0
6	122268	0,7	22,2	5,6
7	122312	4,5	31,0	7,2
8	122323	11,4	88,4	12,1
9	122373	7,7	34,3	8,7
10	122374	8,9	29,6	3,2

6.1.4 VRE

VRE-kantojen eristystulokset ovat taulukossa 6 ja agarosigeelielektroforeesin tulokset liitteessä 1.

Taulukko 6. Vankomysiiniresistenteistä *E. faecium* -kannoista eristettyjen DNA:iden pitoisuudet.

	Kanta	MagAttrack (ng/μl)	Arrow (ng/μl)	InnuPure (ng/μl)
1	17VRE-20	8,2	4,1	7,1
2	17VRE-37	3,9	12,9	4,3
3	17VRE-39	7,2	33,5	3,5
4	17VRE-40	5,3	13,5	26,6
5	17VRE-64	10,2	7,6	5,8
6	17VRE-67	4,9	9,7	23,7
7	17VRE-26	7,3	21,4	1,0
8	17VRE-35	11,2	3,9	2,4
9	17VRE-42	2,9	6,6	6,5
10	17VRE-43	10,7	39,8	4,6

6.1.5 *Streptococcus pneumoniae*

Taulukossa 7 on esitetty pneumokokkikantojen eristystulokset. InnuPurella eristetyistä näytteistä kannat numero 1, 3, 4 ja 10 olivat DNA-pitoisuudeltaan liian matalia, joten niiden pitoisuuksia ei saatu mitattua. Myös nämä DNA:t ajettiin rinnakkain muiden näytteiden kanssa geelille (liite 1).

Taulukko 7. Pneumokokkien eristystulokset.

	Kanta	MagAttrack (ng/μl)	Arrow (ng/μl)	InnuPure (ng/μl)
1	112538	2,2	2,7	liian alhainen pitoisuus
2	112743	1,5	3,1	0,4
3	112820	2,4	11,0	liian alhainen pitoisuus
4	112828	7,2	13,2	liian alhainen pitoisuus
5	114544	8,7	7,4	0,6
6	114627	14,1	8,2	0,5
7	117240	6,0	6,1	0,5
8	121933	11,0	19,7	1,0
9	121961	4,5	7,2	0,9
10	121962	4,5	7,8	liian alhainen pitoisuus

7 Tulosten tarkastelu

Kunakin bakteerin kohdalla verrattiin keskenään manuaalisella MagAttrack-kitillä sekä Arrow- ja InnuPure-eristysautomaateilla eristettyjen bakteerikantojen DNA-pitoisuuksia sekä tarkasteltiin eristetyn DNA:n puhtautta ja eheyttä. Jotkut konsentraatiot olivat niin matalia, ettei Qubit antanut niille mitään arvoa.

Bakteriologian tiimissä minimi DNA-pitoisuutena sekvensointityötä varten on pidetty 1 ng/μl, jolloin DNA:sta voidaan vielä tehdä laimennos. Optimaalinen pitoisuus voisi olla 5–10 ng/μl. Kaikille näytteille haluttiin tehdä samat käsittelyt, joten geelille ajettiin myös DNA:t, joiden pitoisuuksia pidettiin lähtökohtaisesti liian matalina. Tällöin ei ollut odotettavissa, että geelillä näkyisi tällaisten näytteiden kohdalla mitään. Vaihtoehtoisesti matala pitoisuus voi aiheuttaa epätarkan vyöhykkeen. Puhdas ja ehjä DNA näkyy geelillä selkeänä ja noin 40 000 bp:n (base pair, emäspari) kokoisena vyöhykkeenä.

7.1 Eristystulosten arviointi ja puhtauden tarkastelu

Salmonella enteritidis

Gramnegatiivisille salmonellakannoille oli aiempien kokemusten perusteella odotettavissa korkeita DNA-pitoisuuksia. Arrow-eristysautomaatilla saadut tulokset olivat kokonaisuudessaan varsin hyviä ja parempia kuin manuaalisella menetelmällä aiemmin saadut tulokset. Sen sijaan InnuPure C16 touch -eristysautomaatilla saadut DNA-pitoisuudet ovat matalia.

Lisäksi agarosigeelielektroforeesin avulla tarkistettiin, onko eristetyn DNA:n joukkoon jäänyt proteiineja tai RNA:ta. Etenkin kuvasta 5 nähdään, että MagAttrack-kitillä ja Arrow-eristysautomaatilla eristetyt DNA:t ovat hyvälaatuisia eikä erotettavissa ole RNA:ta tai fragmentoitunutta DNA:ta. DNA-vyöhykkeet ovat kooltaan 40 000 emäsparia [29]. Kuvassa 6 näkyy muutaman MagAttrackilla eristetyn kannan kohdalla hieman epäpuhtautta. InnuPurella eristetyistä salmonellojen DNA:ista ei saatu geelijaota varten otettua 50 ng:aa, joten osa geelillä näkyvistä DNA:ista näkyy odotetusti geelillä himmeämpinä.

MRSA

MRSA-bakteeri on ollut manuaalisen kitin kanssa haasteellinen, mutta kannoista saatiin Arrow-eristysautomaatilla hyviä tuloksia suhteessa MagAttrack-kitillä saavutettuihin DNA-pitoisuuksiin. InnuPuren eristystulokset olivat huomattavasti huonompia, ja suurilta osin liian matalia kokogenomisekvensointia ajatellen. Kaikki DNA:t näyttävät agarosigeelielektroforeesilla tarkasteltuina puhtailta.

Listeria monocytogenes

Myös listeriakannat ovat olleet haasteellisia MagAttrack-eristyskitillä eristettäessä, joten Arrow-eristysautomaatin tulokset olivat erityisen positiivisia; eristystulokset ovat todella hyviä verrattuna manuaalisen kitin tuloksiin. Myös InnuPurella saadut pitoisuudet ovat kohtalaisia. Lisäksi agarosigeelielektroforeesin avulla tarkasteltuna DNA:iden laatu on hyvä, sillä geelikuvassa erottuvat vain selkeät DNA-vyöhykkeet.

VRE

VRE-kantojen kohdalla kaikilla menetelmillä saadut DNA-pitoisuudet ovat kohtalaisia, ja joukossa on korkeitakin tuloksia. Molemmilla eristysautomaateilla saatiin joidenkin kantojen kohdalla huomattavasti MagAttrack-kittiä korkeampia pitoisuuksia. Geelikuvissa näkyy muihin bakteereihin verrattuna selkeästi enemmän epäpuhtautta.

Streptococcus pneumoniae

Myös *S. pneumoniae* -bakteerin kanssa on ollut haasteita saada korkeita DNA-pitoisuuksia manuaalisella MagAttrack-kitillä. Korkeimmat DNA-pitoisuudet saavutettiin käytettyjen pneumokokkikantojen kohdalla selkeästi Arrow-eristysautomaatilla. InnuPure C16 touch -eristysautomaatille bakteeri oli kaikista työssä käytetyistä haastavin, sillä DNA-pitoisuudet olivat todella pieniä; vain yhdelle kannalle voitaisiin tehdä kokogenomisekvensointi. Geelillä MagAttrackilla ja Arrow-eristysautomaatilla eristetetyt DNA:t näyttävät puhtaille – InnuPurella eristetetyt DNA:t näkyvät geelillä matalan pitoisuuden vuoksi hyvin heikosti.

7.2 Huomioita eristysautomaattien käytössä

Molemmilla eristysautomaateilla eristysprotokollaa hioessa 100 µl osoittautui 50 µl:aa paremmaksi eluutiovolyymiksi. 50 µl:n eluutiovolyymilla Arrow-eristysautomaatin kohdalla pieneksi ongelmaksi osoittautuivat eluution mukana satunnaisesti tulleet magneettihelmit – asia kuitenkin korjaantui suurimmilta osin, kun siirryttiin käyttämään 100 µl:n eluutiotilavuutta. Myös InnuPuren kohdalla valmistajan suositus eluution määräksi työssä käytetyn kitin kanssa oli vähintään 100–150 µl [13, s. 18].

Magneettihelmien eluutioon joutumisen lisäksi joidenkin bakteerikantojen kohdalla ongelmia aiheuttivat vielä entsyymikäsittelyidenkin jälkeen paksut, saostuvat näytteet. Etenkin VRE-kantojen kohdalla oli huomattavissa bakteerin hajoamistuotteiden saostumista. Kun bakteerimassaa on paljon, saostumia muodostuu helposti solujen hajoituksen seurauksena. Tästä seuraa helposti kärjen tukkeutuminen, mikä voi haitata koko eristysprosessia, ja eluution DNA-pitoisuus jää pieneksi. Muutaman kerran Arrow-eristysautomaatilla näytteitä ajaessa eluutioputki jäi tyhjäksi, mikä on aiheutunut luultavasti juuri pipetin kärjen tukkeutumisesta. Näytteiden saostumiseen voisi auttaa näytetilavuuden nostaminen, jotta laitteen voisi olla helpompi käsitellä näytteitä.

7.3 Johtopäätökset

Eristysautomaatteja verrattaessa Arrow-eristysautomaatilla saadut eristystulokset olivat jokaisen bakteerilajin kohdalla kiistattomasti paremmat kuin InnuPuren tulokset. Arrow pärjasi eristettyjen kantojen DNA-pitoisuuksissa hyvin myös verrattaessa manuaalisen MagAttrack-kittiin; suurin osa pitoisuuksista oli suurin piirtein samaa luokkaa tai korkeampia. Erityisen hyvät tulokset saatiin *L. monocytogenes* -kannoista, joista jokaisesta eristetty DNA oli pitoisuudeltaan suurin kaikista kolmesta menetelmästä Arrow-eristysautomaatilla eristettynä. Tulokset olivat myös merkittävästi korkeampia verrattuna manuaaliseen menetelmään.

8 Yhteenveto

Insinööriytyössä verrattiin grampositiivisten ja -negatiivisten bakteerien DNA-eristystuloksia uusien eristysautomaattien ja käytössä olleen manuaalisen eristyskitin välillä ja pyrittiin validoimaan optimaalisin menetelmä kunkin bakteerin kohdalla. Työn tulosten perusteella eristysautomaatteja voidaan pitää erittäin kelvollisina haastajina manuaaliselle kitille. Etenkin NorDiag Arrow -eristysautomaattia voidaan suositella käytettäväksi *S. enteritidis*-, MRSA-, *L. monocytogenes*-, VRE- ja *S. pneumoniae* -bakteereille. InnuPure C16 touch -eristysautomaatti ei osoittautunut työssä käytetyn InnuPREP Bacteria DNA -kitin kanssa sellaisenaan käyttökelpoiseksi. DNA-pitoisuudet jäivät suurilta osin mataliksi ja jopa liian mataliksi kokogenomisekvensointia ajatellen.

Arrow-eristysautomaatilla eristettyjen bakteerikantojen DNA-pitoisuudet eivät olleet esimerkiksi *S. enteritidis* -bakteerin kohdalla merkittävästi parempia kuin manuaalisella MagAttrack HMW DNA -eristyskitillä saadut pitoisuudet, mutta huomattavana suotuisana tekijänä vaikuttaa aktiivisen työajan vähentyminen eristysprosessissa. Joidenkin näytteiden kohdalla geelikuvissa näkyi hieman epäpuhtautta, mikä ei kuitenkaan ollut systemaattista eikä siksi huolestuttavaa. Arrow-eristysautomaatilla saavutetut DNA-pitoisuudet ja DNA:n puhtaus olivat kaikkien bakteerien kohdalla vähintäänkin riittävällä tasolla – eristysautomaatti vastaa Asiantuntijamikrobiologiayksikön tämän hetken tarpeisiin bakteerien DNA-eristyksen suhteen.

Insinööriytyön toimeksiannon puitteissa DNA-eristystä tehdessä riitti, että kaikista bakteerikannoista saatiin kullakin menetelmällä yhdet vertailukelpoiset tulokset. Koska manuaalisella kitillä tehdyt eristystulokset olivat jo valmiina, keskityttiin lähinnä pitämään eristysautomaattien välillä menetelmät ja protokollat vertailukelpoisina. Jos toistomittauksia olisi tehty, olisi saatu kattavampi kuva eristystuloksista ja mahdollisesti luotua enemmän eroavaisuuksia DNA-pitoisuuksissa eri menetelmien välille. Työn tilaajalle kuitenkin riittivät näiden tulosten pohjalta tehdyt johtopäätökset. Myös eristysprotokollia lienee tarpeen vielä hioa, jotta saavutettaisiin entistä parempia tuloksia. Arrow-eristysautomaatin kohdalla lievänä haittana ilmaantuneet satunnaiset eluutioon joutuneet magneettihelmet saatiin suurimmaksi osaksi poistettua eluutiiovolyymia nostamalla. Molemmilla laitteilla voisi harkita esimerkiksi VRE:n kohdalla näytteiden voimakkaan saostumisen ehkäisemiseksi näytevolyymin nostamista entisestään.

Tulevaisuudessa voisi kokeilla InnuPure C16 touch -eristysautomaatille soveltuvaa valmistajan SmartExtraction-menetelmää, jolla pitäisi olla saavutettavissa korkeammat DNA-pitoisuudet. Valmistajalla on myös muun muassa oma LysisBooster-entsyymiseos, joka voi auttaa tehostamaan solujen hajottamista ja parantaa DNA-eristystuloksia. Myös Arrow-eristysautomaatille on toinenkin bakteerien DNA-eristykseen soveltuva kitti, jota voisi testata haastavampien bakteerien kohdalla.

Tällä hetkellä DNA:n puhtautta arvioidaan yksikössä karkeasti lähinnä agarosigeelelektroforeesilla, joka on ollut tähän asti ollut riittävä menetelmä. Tulevaisuudessa osa sekvensoinnista tullaan todennäköisesti ulkoistamaan ulkopuolisille palveluntarjoajille, joilla on korkeampien saantovaatimusten lisäksi tarkemmat puhtausvaatimukset. Yksikössä täytyy siis myöhemmin pohtia sopivaa menetelmää puhtausarvojen tarkempaan mittaamiseen.

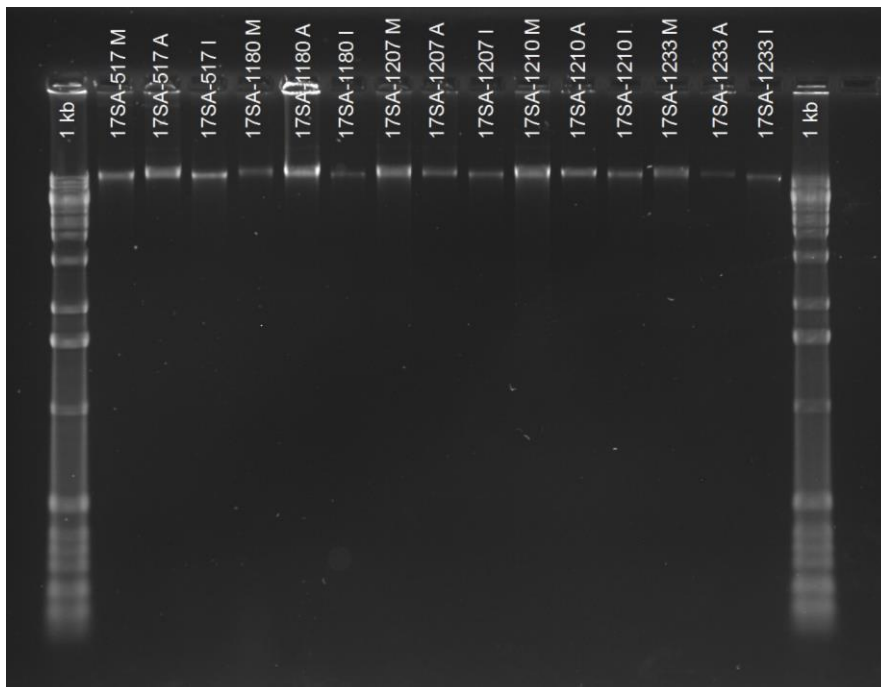
Lähteet

- 1 Haajanen, Ilari; Pelkonen, Jani; Pärssinen, Raimo & Suominen, Ilari. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- 2 Ling, Xia & Zhou, Chunxu (toim.). 2011. DNA Binding and DNA Extraction – Methods, Applications and Limitations. E-kirja. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- 3 Ollikka, Pauli & Suominen, Ilari. 1994. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Vantaa: Dark/Tummavuoren Kirjapaino Oy.
- 4 Alaska BioPREP Virtual Textbook. 2017. The Basics of DNA Extraction. Verkkoaineisto. <<https://bioprep.community.uaf.edu/learning-modules/2-dna-extraction-4/the-basics-of-dna-extraction/>>. Luettu 7.2.2018.
- 5 Brown, T.A. 1995. Gene Cloning an introduction. 3. painos. United Kingdom: Chapman & Hall.
- 6 Tan, Siun Chee & Yiap, Beow Chin. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789530/>>. Luettu 7.2.2018.
- 7 MagAttract HMW DNA Kit. Verkkoaineisto. Qiagen. <<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/magattract-hmw-dna-kit-48/#orderinginformation>>. Luettu 8.2.2018.
- 8 Nukleiinihappoliuosten (DNA/RNA) puhtauden ja pitoisuuden arviointi. Verkkoaineisto. Opetushallitus. <http://www.edu.fi/download/143334_Nukleiinihappoliuosten_puhtauden_ja_pitoisuuden_arviointi.pdf>. Luettu 9.2.2018.
- 9 2009. 260/280 and 260/230 Ratios. Verkkoaineisto. Thermo Scientific. <<http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>>. Luettu 26.3.2018.
- 10 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE). Verkkoaineisto. Opetushallitus. <http://www.edu.fi/download/143335_AGE_EtBr_ja_SYBR.pdf>. Luettu 9.2.2018.
- 11 Arrow. Isogen - Life Science. Verkkoaineisto. <<http://www.isogenlifescience.com/arrow>>. Luettu 2.1.2018.

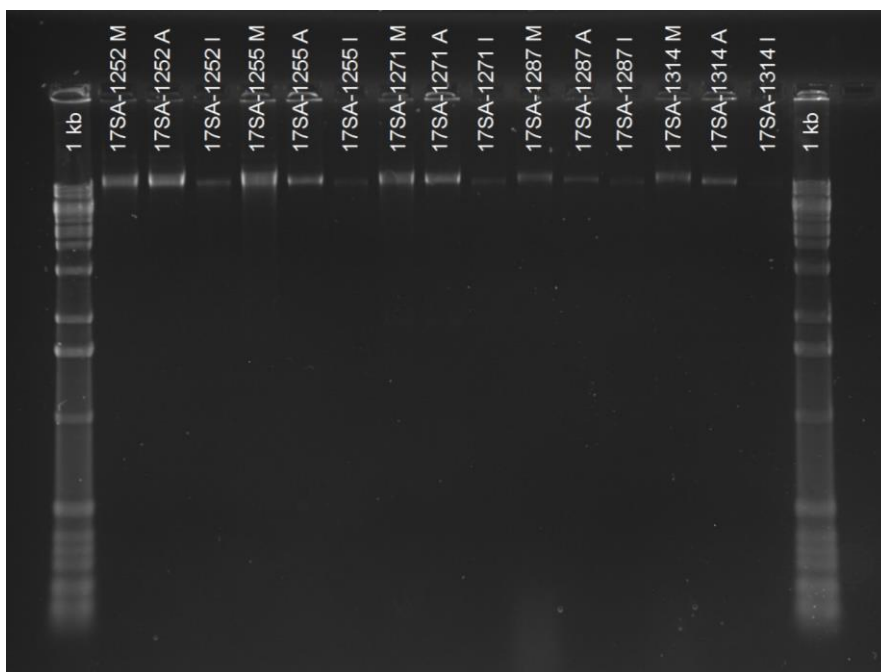
- 12 Analytik Jena. 2016. The New Standard in Automated Extraction InnuPure® C16 touch. Verkkoaineisto. <https://www.analytik-jena.de/fileadmin/content/import/imported_dam/InnuPureC16_touch_Broschuere_eng_WEB_geschuetzt.pdf>. Luettu 2.1.2018.
- 13 Analytik Jena. 2015. innuPREP Bacteria DNA Kit - IPC16. Manual. Luettu 12.2.2018.
- 14 InnuPure® C16 touch. Verkkoaineisto. Analytik Jena. <<https://www.analytik-jena.de/en/life-science/products/prod/cat/automated-extraction/prod/innupure-c16-touch.html>>. Luettu 28.3.2018.
- 15 DiaSorin, The Diagnostic Specialist. 2016. Viral NA Extraction Kit. Instructions For Use. Verkkoaineisto. <<http://uk.werfen.com/~media/il%20uk/docs/diasorin/ifu%2012%2008%2002v11%20%20viral%20na%20english%201.pdf>>. Luettu 2.1.2018.
- 16 Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti; Järvinen, Asko; Meri, Seppo & Vaara, Martti (toim.). 2010. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Kirja 1, Mikrobiologia. Mikrobiologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 17 Carroll, Karen; Funke, Guido; Jorgensen, James; Landry, Marie Louise; Pfaller, Michael; Richter, Sandra & Warnock, David. 2015. Manual of Clinical Microbiology Volume 1. 11. painos. Washington, D.C.: ASM Press.
- 18 Ferretti, Joseph J.; Fischetti, Vincent A.; Novick, Richard P.; Portnoy, Daniel A. & Rood, Julian I. 2000. Gram-Positive Pathogens. Washington, D.C.: ASM Press.
- 19 Karki, Gaurab. 2017. Bacterial Cell wall: Structure, Composition and Types. Verkkoaineisto. <<http://www.onlinebiologynotes.com/bacterial-cell-wall-structure-composition-types/>>. Luettu 28.3.2018.
- 20 Curtiss, Roy; Ingraham, John L.; Lin, Edmund C.C.; Low, K. Brooks; Magasanik, Boris; Reznikoff, William S.; Riley, Monica; Schaechter, Moselio & Umberger, H. Edwin. 1996. *Escherichia Coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology volume 2. Washington, D.C.: ASM Press.
- 21 Jaakola, Sari; Jalava, Jari; Liitsola, Kirsi; Lyytikäinen, Outi; Löflund, Jan-Erik; Kuusi, Markku; Nohynek, Hanna; Rimhanen-Finne, Ruska; Salminen, Mika; Salminenlinna, Saara; Savolainen-Kopra, Carita; Toropainen, Maija & Virtanen, Mikko (toim.). Tartuntataudit Suomessa 2016. 2017. Raportti 5/2017. Verkkoaineisto. Terveystieteiden tutkimuskeskus. <<http://www.julkari.fi/handle/10024/135229>>. Luettu 6.3.2018.
- 22 Salmonelloosi. Verkkoaineisto. Evira. <<https://www.evira.fi/elaimet/zoonoosikeskus/zoonoosit/bakteerien-aiheuttamat-taudit/salmonelloosi/>>. Luettu 13.2.2018.

- 23 MRSA-asiantuntijaryhmä. 2004. Ohje metisilliiniresistenttien *Staphylococcus aureusten* torjunnasta. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja C1/2004. Helsinki: Kansanterveyslaitos.
- 24 Ericson, Elsy & Ericson, Thomas.1992. Kliininen mikrobiologia ja infektioaudit. Keuruu: Otava.
- 25 Marth, Elmer H. & Ryser, Elliot T. 1991. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 26 VRE-asiantuntijaryhmä. 1997. Ohje vankomysiinille resistenttien enterokokkien torjunnasta. Kansanterveyslaitoksenjulkaisuja C1/1997. Helsinki: Askonpaino.
- 27 Kaijalainen, Tarja. 2006. The Identification of *Streptococcus pneumoniae*. Publications of the National Public Health Institute 11/2006. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 28 Pneumokokkrokote. Verkkoaineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/web/rokottaminen/rokotteet/pneumokokkrokote>>. Päivitetty 8.6.2017. Luettu 6.3.2018.
- 29 2003. 1 Kb DNA Extension Ladder. Verkkoaineisto. Invitrogen life technologies. <<http://101.200.202.226/files/prod/manuals/201305/28/10357001.pdf>>. Luettu 6.3.2018.

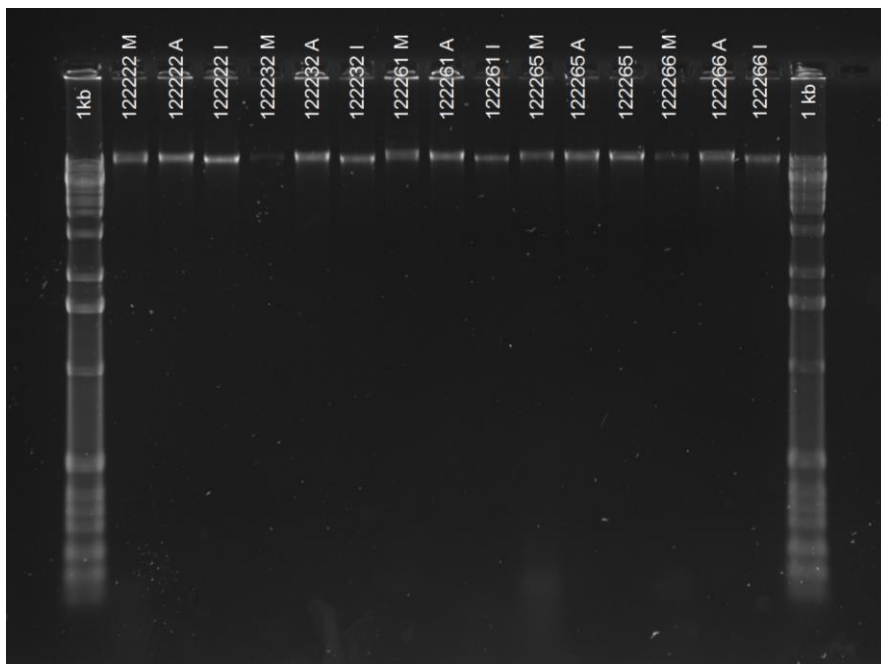
Geelikuvat



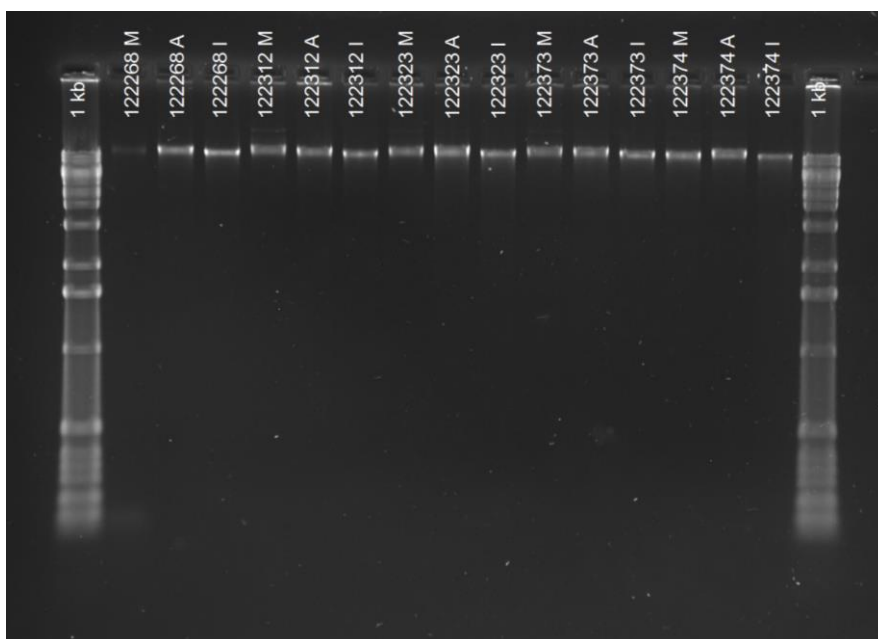
Kuva 1. MRSA-kannat 1–5 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



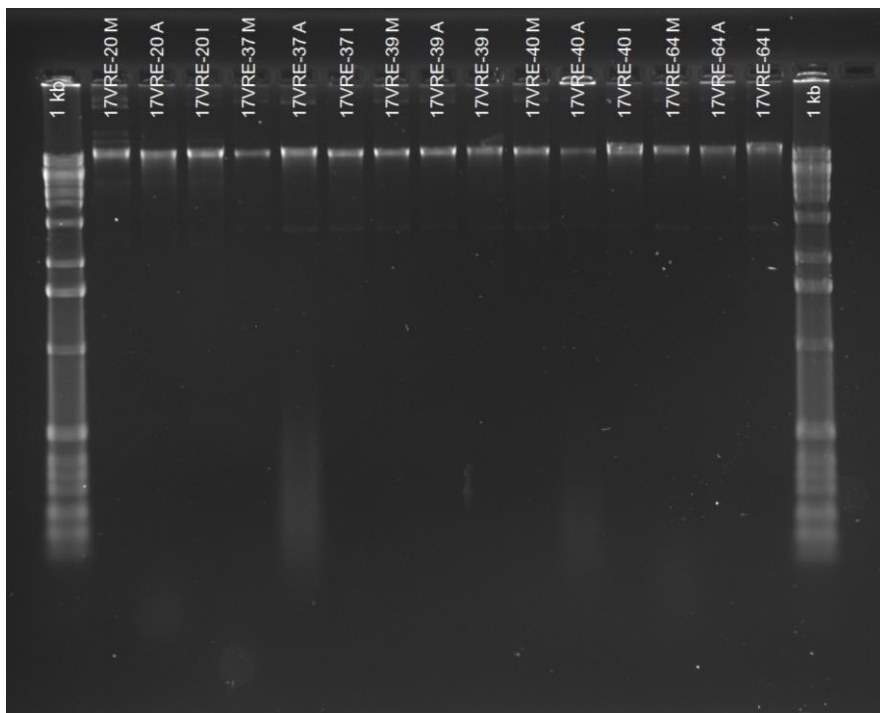
Kuva 2. MRSA-kannat 6–10 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



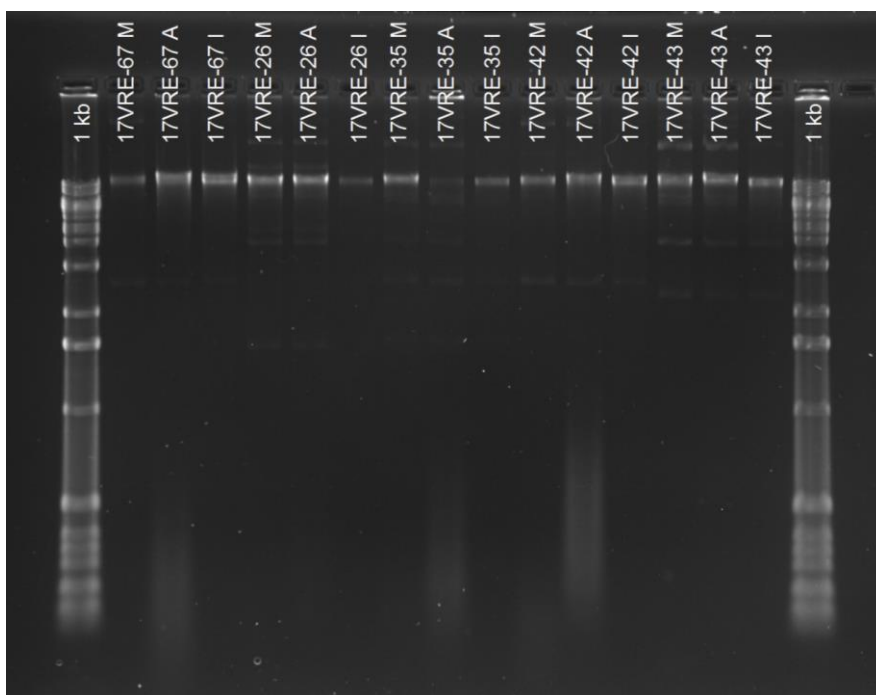
Kuva 3. *L. monocytogenes* -kannat 1–5 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



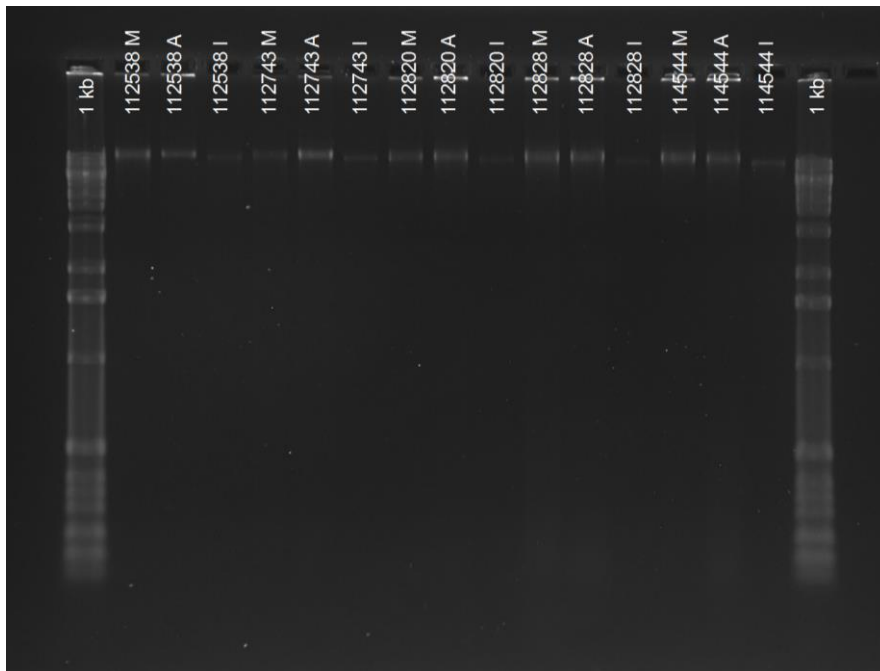
Kuva 4. *L. monocytogenes* -kannat 6–10 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



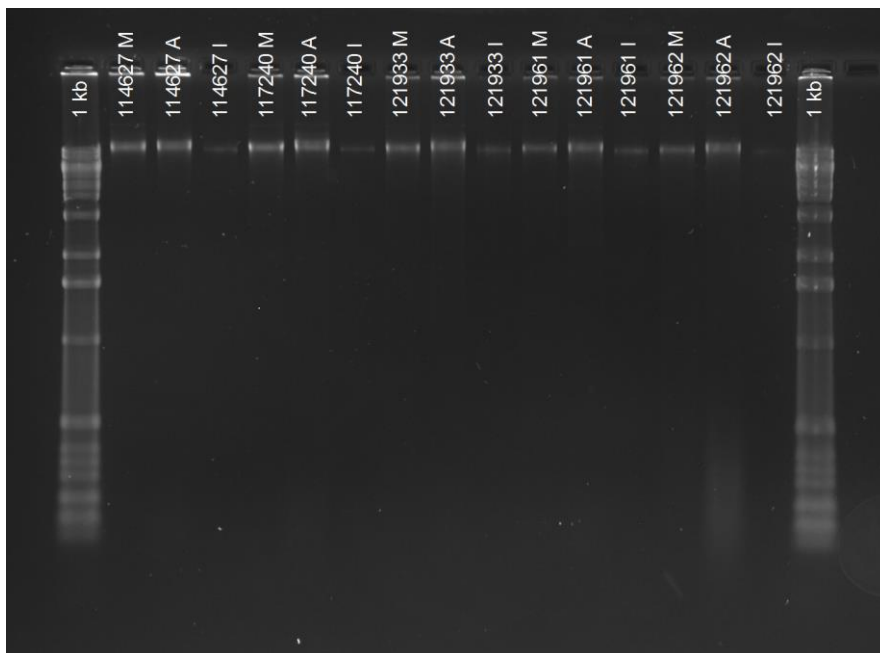
Kuva 5. VRE-kannat 1–5 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



Kuva 6. VRE-kannat 6–10 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



Kuva 7. *S. pneumoniae* -kannat 1–5 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.



Kuva 8. *S. pneumoniae* -kannat 6–10 ajettuina 1-prosenttiselle agarosigeelille.