

Pauliina Auvinen

Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan
näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen
Bordetella pertussikselle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

16.4.2015

| | |
|---|---|
| Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika | Pauliina Auvinen Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen <i>Bordetella pertussikselle</i> 61 sivua + 4 liitettä 16.4.2015 |
| Tutkinto | Insinööri (AMK) |
| Koulutusohjelma | Bio- ja elintarviketekniikka |
| Suuntautumisvaihtoehto | Biolääketiede |
| Ohjaaja(t) | Tuotekehitysasiantuntija Solveig Sjöblom Laboratorioasiantuntija Jenna Flinck Lehtori Juha E. A. Knuutila |
| <p><i>Bordetella pertussis</i> on pieni gramnegatiivinen sauvabakteeri ja tavallisin hinkuyskän aiheuttaja. Hinkuyskä on merkittävä syy vastasyntyneiden kuolemiin maailmanlaajuisesti. Se on edelleen yleinen kansanterveysongelma jopa maissa, joissa on kattava rokotusohjelma. <i>B. pertussiks</i>en diagnosointiin erityisesti lapsilla ja vastasyntyneillä käytetään kvantitatiivisia reaaliaikaisia PCR-menetelmiä.</p> <p>PCR:ään perustuvan diagnostiikan ongelmana ovat tutkittavista näytteistä peräisin olevat PCR-reaktiota estävät inhibiittorit. Tämä korostaa tehokkaiden näytteenkäsittely- ja nukleiinihappoeristysmenetelmien tarpeellisuutta. Magneettipohjainen nukleiinihappoeristys on yksinkertainen, tehokas ja nopea menetelmä, jota käytetään nykyään yleisesti nukleiinihappojen eristykseen.</p> <p>Orion Diagnosticalla tuotekehityksessä oleva uusi nukleiinihappojen eristykseen pohjautuva näytteenkäsittelymenetelmä perustuu paramagneettisten silikananopartikkeleiden käyttöön. Tämän insinööritöiden tarkoituksena oli kehittää kyseistä näytteenkäsittelymenetelmää <i>B. pertussis</i> -bakteerin eristämiseen käyttäen näyttemateriaalina nenäsivelynäytettä. Tavoitteena oli kehittää menetelmää mahdollisimman tehokkaaksi eristetyn DNA-määrän suhteen. Kehitettävän menetelmän DNA-saannon mittaamiseksi käytettiin kvantitatiivista reaaliaikaista PCR:ää. Lisäksi yhtenä osa-alueena oli kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu ja käytettävyyden testaus. Menetelmän testialustan visuaalista ilmettä suunniteltiin 3D-mallinnuksella ja -tulostuksella.</p> <p>Uuden näytteenkäsittelymenetelmän kehittämiseksi tehtiin kokeita, joiden perusteella menetelmän todettiin toimivan <i>B. pertussis</i> -bakteerille. Verrattaessa kaupalliseen magneettipartikkelipohjaiseen eristysmenetelmään kehitettävällä menetelmällä päästiin lähes yhtä hyviin DNA-saantoihin. Kokeiden perusteella tunnistettiin myös sellaisia menetelmän osa-alueita, joita DNA-saannon parantamiseksi tulee muun muassa optimoida: näytteenkäsittelymenetelmän pesuliuoksiin jäävä DNA-määrä ja näyttemateriaalina olevan nenäliman inhibiittorit vähentävät DNA-saantoa. Tuotekehityksen jatkuessa Orion Diagnosticalla jatkotutkimuksissa tulisi keskittyä menetelmässä käytettävien pesuliuoksien kehittämiseen DNA-saannon parantamiseksi.</p> | |
| Avainsanat | <i>Bordetella pertussis</i> , polymeerasiketjureaktio, magneettipohjainen eristys |

| | |
|---|--|
| Author(s) Title Number of Pages Date | Pauliina Auvinen Developing new nucleic acid extraction-based sample preparation method for <i>Bordetella pertussis</i> 61 pages + 4 appendices 16 April 2015 |
| Degree | Bachelor of Engineering |
| Degree Programme | Biotechnology and Food Engineering |
| Specialisation option | Biomedicine |
| Instructor(s) | Solveig Sjöblom, R&D Specialist Jenna Flinck, Laboratory Specialist Juha E. A. Knuutila, Senior lecturer |
| <p><i>Bordetella pertussis</i> is a small gram-negative coccobacillus and causative agent of whooping cough. Whooping cough is a significant cause of infant deaths worldwide, and it is a public health concern even in countries with high vaccination coverage. Quantitative real-time PCR methods are used for diagnosis of <i>B. pertussis</i> particularly among children and infants.</p> <p>One challenge with PCR-based diagnostics is impurities of clinical samples that inhibit the PCR reaction. This emphasizes the importance of an effective sample preparation method. Extraction based on magnetic beads is a simple, effective and rapid method which is widely used for extraction of nucleic acids.</p> <p>Orion Diagnostica is developing a new sample preparation method that uses paramagnetic silica-coated nanoparticles for nucleic acid extraction. The purpose of this thesis was to develop the sample preparation method for <i>B. pertussis</i> using nasal mucus as sample material. The aim was to develop the method as effective as possible in terms of DNA yield. The efficiency of the sample preparation method was determined by quantitative real-time PCR. In addition, the aim was to design the visual appearance of the sample preparation product and test its usability in practice as well. The visual appearance of the product was designed by using 3D modeling and printing.</p> <p>On the basis of the results of this thesis project, the new method proved to work for <i>B. pertussis</i> nearly as effectively as a commercial DNA extraction method. According to the results, some critical issues for increasing the DNA yield were identified, for example a large amount of DNA is left in the washing solutions, and the inhibitors of the sample material, nasal mucus, reduces the DNA yield. In future the development work of the sample preparation method should focus on for example developing the washing solutions to further increase the DNA yield of the method.</p> | |
| Keywords | <i>Bordetella pertussis</i> , polymerase chain reaction, magnetic based nucleic acid extraction |

Kiitokset

Tämä insinöörityö tehtiin yhteistyössä Orion Diagnostica Oy:n kanssa. Haluan kiittää insinöörityön Orion Diagnostica Oy:n puolesta toimineita ohjaajia: tuotekehitysasiiantuntijaa Solveig Sjöblomia ja laboratoriotyöskentelyn käytännön asioita ohjeistanutta laboratorioasiiantuntijaa Jenna Flinckiä ammattitaidosta, opastuksesta ja kannustuksesta. Kiitän Metropolia Ammattikorkeakoulun puolesta ohjaavana opettajana toiminutta lehtori Juha E. A. Knuutilaa neuvoista ja ohjeista. Haluan myös kiittää Orion Diagnostica Oy:n ohjelmapäällikköä Minna Mäkeä ja tuotekehityspäällikköä Juha Saharista asiantuntevuudesta, vinkeistä ja ideoista. Kiitän myös kaikkia niitä, jotka ovat olleet mukana työni vaiheissa ja edesauttaneet työni valmistumista; erityisesti omia insinööritöitänensä samaan aikaan Orion Diagnosticalla tehneitä Sonja Elfiä ja Karoliina Liikosta.

Lisäksi haluan kiittää terveyden ja hyvinvoinnin strategisen huippuosaamiskeskuksen (SHOK) keskittymän SaWe Oy:tä ja sen ohjelmaa ”yksilöllistetty diagnostiikka ja hoito (GET IT DONE)” insinöörityön tukemisesta.

Espoossa 14.4.2015

Pauliina Auvinen

Sisällys

Lyhenteet

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | <i>Bordetella pertussis</i> | 3 |
| 2.1 | Hinkuuskän taudinkuva | 4 |
| 2.2 | Epidemiologia | 5 |
| 3 | <i>Bordetella pertussis</i> ksen diagnostiikka | 6 |
| 3.1 | Viljely | 7 |
| 3.2 | PCR-menetelmät | 8 |
| 3.3 | Serologiset menetelmät | 9 |
| 3.4 | Muiden <i>Bordetellojen</i> erotusdiagnoosiikka | 9 |
| 4 | DNA:n eristäminen | 10 |
| 4.1 | DNA:n eristäminen <i>Bordetella pertussis</i> - ja muista kliinisistä näytteistä | 10 |
| 4.2 | Magneettipohjainen nukleiinihappoeristys | 11 |
| 4.3 | Kehitettävä menetelmä | 12 |
| 4.4 | Vertailumenetelmät | 14 |
| 4.4.1 | Qiagen EZ1 Advance XL | 14 |
| 4.4.2 | Bio Nobile QuicPick™-magneettikynä | 14 |
| 5 | PCR menetelmänä ja käyttö diagnostiikassa | 15 |
| 5.1 | PCR:n periaate | 15 |
| 5.2 | qPCR – kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio | 17 |
| 5.3 | Käyttö diagnostiikassa | 18 |
| 6 | Työn tarkoitus | 19 |
| 6.1 | Näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen | 19 |
| 6.2 | Näytteenkäsittelymenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu | 22 |
| 7 | Materiaalit ja menetelmät | 22 |
| 7.1 | <i>Bordetella pertussis</i> ksen kasvatus | 22 |
| 7.2 | qPCR:n pystytys | 24 |
| 7.3 | Standardisuora ja kvantitaatio | 27 |

| | | |
|-----|---|----|
| 7.4 | DNA:n eristys | 29 |
| 8 | Tulokset ja tulosten tarkastelu | 30 |
| 8.1 | Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään | 30 |
| 8.2 | Kehitettävän eristysmenetelmän puskureiden DNA-jäännökset | 34 |
| 8.3 | Nenäsvilynäytteen inhibiittoreiden vaikutus | 37 |
| 8.4 | Pesupuskureiden optimointi | 40 |
| 8.5 | Magneettipartikkeleiden säilyvyys | 42 |
| 8.6 | Magneettivarren ja QuicPick™-magneetikynän vertailu | 47 |
| 8.7 | Näytteenkäsittelymenetelmän testialustan suunnittelu | 50 |
| 9 | Yhteenveto | 51 |
| 9.1 | Johtopäätökset | 51 |
| 9.2 | Jatkotutkimukset | 52 |
| | Lähteet | 55 |
| | Liitteet | |
| | Liite 1. <i>Bordetella pertussiksen</i> diagnosointimenetelmät | |
| | Liite 2. PCR-ohjelma | |
| | Liite 3. Kokeiden raakadata | |
| | Liite 4. Kokeiden sulamiskäyrät | |

Lyhenteet

| | |
|----------------|---|
| BG | <i>Bordet Gengou. Bordetella pertussis</i> kasvatusalusta. |
| Cfu | <i>Colony forming unit.</i> Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä mikrolit-rassa. |
| C _T | <i>Cycles required to reach threshold.</i> Arvo kuvaa sitä syklimäärää, jolloin PCR:ssä monistuneen tuotteen signaali ylittää kynnsarvon. |
| ECDC | <i>European Centre for Disease Prevention and Control.</i> Euroopan tautivi-rasto. |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay.</i> Entsyymivälitteinen immunosor-benttimääritys. |
| FDA | <i>Food And Drug Administration.</i> Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto. |
| FRET | <i>Fluorescence resonance energy transfer.</i> Energiansiirtotekniikka, jota käytetään PCR-koettimissa. |
| GuSCN | <i>Guanidinium thiocyanate.</i> Guanidiinitiosyanaatti, kaatrooppinen suolayh-diste. |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline.</i> Fosfaattipuskuroitu suolaliuos. |
| qPCR | <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction.</i> Kvantitatiivinen reaali-aikainen polymeeriketjureaktio. |
| RFU | <i>Relative fluorescence unit.</i> PCR:ssä käytetty fluoresenssiyksikkö. |
| RL | <i>Regan Lowe. Bordetella pertussis</i> kasvatusalusta. |
| TE | <i>Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid.</i> Tris-Etyleenidiamiinitetraetikkahappo |
| T _m | <i>Melting temperature.</i> PCR-alukkeiden sulamislämpötila. |

WHO *World Health Organization.* Maailman terveysjärjestö.

SR11 *Bordetella pertussiksen* serotyyppi.

1 Johdanto

Bordetella pertussis on pieni gramnegatiivinen sauvabakteeri ja tavallisin hinkuuskän aiheuttaja. Hinkuuskä on merkittävä syy vastasyntyneiden kuolemiin maailmanlaajuisesti ja on edelleen yleinen kansanterveysongelma jopa maissa, joissa on kattava rokotushjelma. *B. pertussiksen* diagnosointiin käytetään viljelyä, PCR- ja serologisia menetelmiä.

Viimevuosina kvantitatiivisia reaaliaikaisia PCR-menetelmiä on kehitetty tartuntatautiin, erityisesti bakteeritautien, rutiinidiagnostiikkaan. PCR-menetelmiä käytetään *B. pertussiksen* diagnosointiin erityisesti pieniltä lapsilta ja vastasyntyneiltä. PCR:ään perustuvan diagnostiikan ongelmana ovat tutkittavista näytteistä peräisin olevat PCR-reaktiota estävät inhibiittorit. Tämä korostaa tehokkaiden näytteenkäsittely- ja nukleiinihappoeristysmenetelmien tarpeellisuutta. Magneettisiin silikananopartikkeleihin pohjautuva nukleiinihappoeristys on yksinkertainen, tehokas ja nopea menetelmä, jota käytetään nykyään yleisesti nukleiinihappojen eristykseen.

Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä on kehitteellä uusi nukleiinihappojen eristykseen pohjautuva näytteenkäsittelymenetelmä, joka perustuu paramagneettisten silikananopartikkeleiden käyttöön. Tämä insinöörityö oli osa kyseisen näytteenkäsittelymenetelmän tuotekehitystä. Tavoitteena oli kehittää menetelmää mahdollisimman tehokkaaksi eristetyn DNA-määrän suhteen *Bordetella pertussis* -bakteerin eristämiseen ja tutkia miten tyypillinen *B. pertussis* -näyte, nenäsivelynäyte, vaikuttaa DNA:n eristävyyteen ja PCR:ään kehitettävällä menetelmällä. Lisäksi insinöörityön yhtenä osaluueena oli kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu sekä suunnitellun testialustan käytettävyyden testaus. Kehitettävän menetelmän DNA-saannon mittaamiseksi käytettiin kvantitatiivista reaaliaikaista PCR:ää ja menetelmän testialustan visuaalista ilmettä suunniteltiin 3D-mallinnuksella ja tulostuksella.

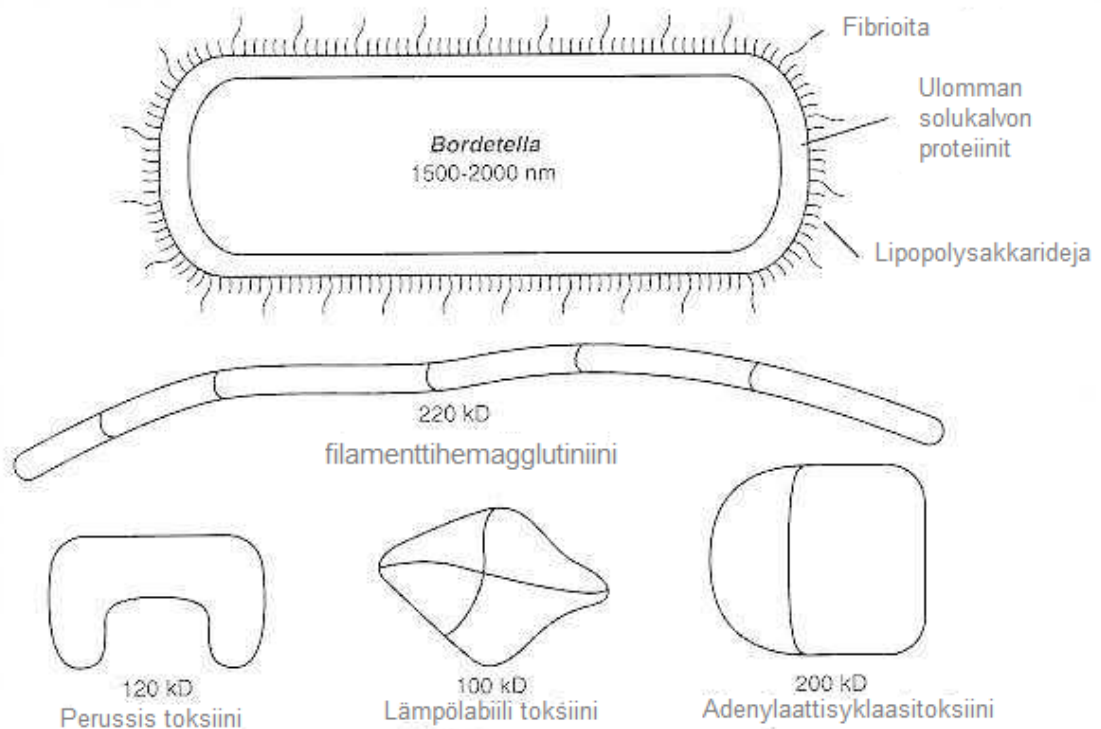
Uuden näytteenkäsittelymenetelmän kehittämiseksi tehtiin kokeita, jotka koostuivat menetelmässä käytettävien puskureiden kehittämisestä ja näytemateriaalina olevan nenäsivelynäytteen vaikutuksen selvittämisestä eristymiseen sekä magneettipartikkeleiden säilyvyyden tutkimisesta. Kehitettävää menetelmää verrattiin myös kaupalliseen silikamagneettipartikkeleihin perustuvaan Qiagenin EZ1 Advance XL -

eristysmenetelmään ja menetelmässä käytettävää magneettivartta kaupalliseen Quic-Pick™-magneetikynään.

2 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis on tavallisin hinkuyskän aiheuttaja. Se eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1906. *Bordetella* sukuun kuuluu yhdeksän lajia, joista neljä on ihmiselle patogeenisiä: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* ja *B. holmesii*. Muita *Bordetelloja* ovat: *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. ansorpii* sekä *B. petrii*. *B. pertussis* on pieni, kooltaan noin 0,4–0,8 µm pitkä gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka elää aerobisissa oloissa. Koska bakteeri on gramnegatiivinen, sen solurakenne koostuu sisä- ja ulkokalvosta ja periplasmisesta tilasta, jonka välissä on ohut peptidoglykaanikerros. Bakteerisolun ulkokalvolla on *B. pertussikselle* tyypillisiä proteiineja ja lipopolysakkarideja (kuva 1). Bakteeri on tyypillisesti liikkumaton ja järjestäytynyt yksittäin tai ryhmiin. (Finger & Wirsing von Koenig 1996; Mertsola & He 2010: 170.)

B. pertussis on tehokas patogeeni, joka tarttuu hengitysteiden kautta asettuen ylähengitysteiden limakalvojen värekarvalliseen lieriöepiteeliin. *B. pertussis*ksen patogeenisiteettitekijöihin lukeutuu useita adhesiineja ja toksiineja (kuva 1), joiden avulla se tarttuu hengitysteiden värekarvalliseen lieriöepiteeliin ja tuhoaa sitä. Bakteerin merkittävä adhesiini on filamenttihemagglutiniini, jonka avulla bakteeri pystyy sitoutumaan moniin eri soluihin, kuten epiteelisoluihin ja muihin hengitystie-epiteelin solun ulkoisiin rakenteisiin. Muita adhesiineja, jotka mahdollistavat bakteerin kolonisaation ovat fibriot, pertaktiini sekä henkitorven kolonisaatiotekijä. Adhesiinien lisäksi *B. pertussis* ilmentää useita eri toksiineja, joiden vaikutuksesta hengitysteihin syntyy paikallisia epiteelikuolioita. Pertussistoksiini lamauttaa henkitorven värekarvojen toimintaa, ja henkitorven sytotoksiini yhdessä lämpölabiilin toksiinin kanssa tuhoaa värekarvallisia soluja ja estää hengitysteiden epiteelin uudistumista. Adenylaattisyklaasitoksiinin vaikutuksesta bakteeri pystyy häiritsemään fagosytoivien solujen toimintaa. Hinkuyskälle tyypillinen hinkukuva yskä on todennäköisesti seurausta bakteereiden aiheuttamasta sitkeän liman muodostumisesta sekä limakalvovaurioista. (Guiso 2007: 3–4; Mertsola & He 2010: 170.)



Kuva 1. *Bordetella pertussis*in rakenne ja patogeenitekijöitä (Finger & Wirsing von Koenig 1996, muokattu).

2.1 Hinkuyskän taudinkuva

Hinkuyskän taudille tunnusomaista on jopa useita viikkoja kestävä puuskittainen, tikahduttava yskä. Puuskat esiintyvät enimmäkseen öisin. Muita oireita ovat limainen oksentelu ja sisäänhengityksen vaikeutuminen, johon liittyy hinkuyskälle tyypillinen hinkuva ääni. Potilas voi olla vähäoireinen ja hyväkuntonen yskänpuuskien välillä. Oireet vaihtelevat myös potilaan iän mukaan: Muutaman viikon ikäisillä lapsilla oireina voi olla toistuvat hengityspysähdykset, mutta ei lainkaan yskää. Kouluikäisillä lapsilla ja aikuisilla oireena on tavallisesti viikkoja tai jopa kuukausia kestävä yskä. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2013; Mertsola & He 2010: 172–173.)

Japanissa vuonna 2010 tehdyssä tutkimuksessa (Nakamura ym.) selvitettiin syitä aikuisten sekä pienten ja vastasyntyneiden lasten oireiden eroihin tutkimalla nenänielutikkunäytteiden bakteerimääriä. Tutkimuksessa mitattiin bakteerimääriä 19 aikuiselta, 21 lapselta ja 19 vastasyntyneeltä. Tulosten perusteella bakteerimäärät näytteissä vaihtelivat voimakkaasti potilaan iän mukaan. Bakteerisoluja oli aikuisilla keskimäärin

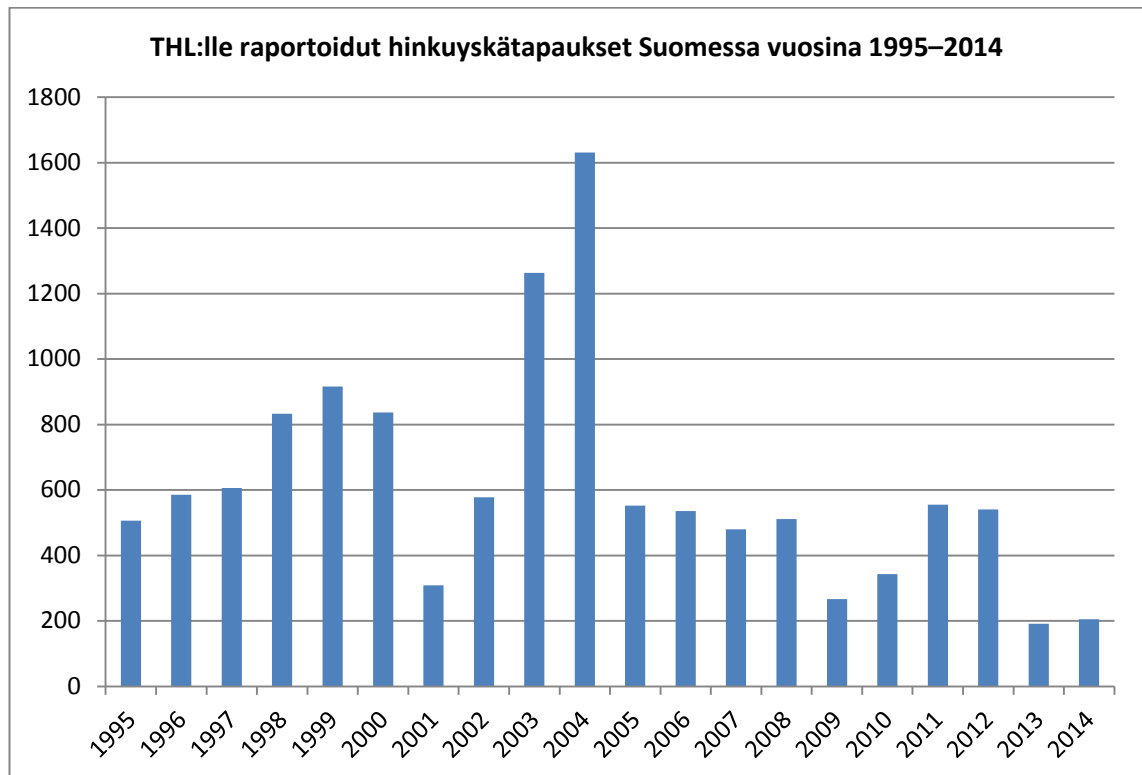
320, lapsilla $2,1 \times 10^4$ ja vastasyntyneillä $1,1 \times 10^6$. Tuloksen perusteella potilaan iällä on vaikutusta näytteen bakteerimäärään ja sitä kautta potilaan oireisiin.

Hinkuyskäinfektiota hoidetaan antibioottilääkityksellä, joka tulee aloittaa 1–2 viikkoa taudin alkamisesta. Tätä myöhemmin antibiooteista ei ole enää apua, vaan tauti paranee itsestään useiden viikkojen kuluessa. Pienten imeväisten sekä rokottamattomien lasten hoito vaatii sairaalahoitoa hengitystievaikkeuksien, oksentelun sekä kouristusrisikin takia. Hinkuyskä tarttuu helppoiten taudin alkuvaiheessa ja se tarttuu sairastavasta henkilöstä pisaratartuntana toiseen. Tarttuvuus on pienin noin kolmen viikon sairastamisen jälkeen ja viiden päivän jälkeen antibiootikuurin aloittamisesta. Rokottamattomilla lapsilla on suurin mahdollisuus saada hinkuyskäinfektio. Hinkuyskärokotus kuuluu Suomessa yleiseen rokotusohjelmaan. (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2013.) Vuonna 2003 aloitettiin kuusivuotiaiden tehosterokotukset ja vuodesta 2005 lähtien, uuden rokotusohjelman myötä, tehosterokotukset aloitettiin neljä- ja neljätoistavuotiaille (Hulkko ym. 2010: 14). Nykyään käytössä on uusia soluttomia rokotteita, jotka sisältävät *B. pertussis* -bakteerin virulenssitekijöitä: inaktivoitua pertussistoksiinia, filamenttihemagglutiniinia, pertaktiinia ja fibrioita. Rokotteet annetaan kolmen rokotteen sarjana: 3 kk:n, 5 kk:n ja 12 kk:n iässä DTaP-IPV-Hib -rokote, 4 vuoden iässä DTaP-IPV -rokote ja 14 vuoden iässä dtap-rokote. (Mertsola & He 2010: 175–176.)

2.2 Epidemiologia

Hinkuyskä on merkittävä syy vastasyntyneiden kuolemiin maailmanlaajuisesti ja on edelleen yleinen kansanterveysongelma jopa maissa, joissa on kattava rokotusohjelma. WHO:n (World Health Organization) (World Health Organization 2011) mukaan vuonna 2008 hinkuyskätapauksia oli maailmanlaajuisesti noin 16 miljoonaa, joista 95 % kehitysmaissa. Samana vuonna noin 195 000 lasta kuoli tautiin. Hinkuyskä on erityisen vaarallinen pienille rokottamattomille lapsille ja on hieman tavallisempaa naisilla kuin miehillä. Täyden peruserokotuksen sarjan *B. pertussista* vastaan Suomessa saa noin 97 % lapsista. Suoja kestää kuitenkin vain muutamia vuosia, minkä takia hinkuyskää esiintyy paljon myös kouluikäisillä lapsilla ja aikuisilla. Suomessa vuosina 1995–2014 Terveiden ja hyvinvoinnin laitokselle raportoidut hinkuyskätapaukset on esitetty kuvassa 2. Vuosina 2003–2004 oli laaja hinkuyskäepidemia, jossa valtaosan tapauksista aiheutti Ranskassa vuonna 1994 todettu uusi *B. pertussiksen* tyyppi (SR11). Epidemia kohdistui erityisesti rokottamattomiin ja puutteellisen rokotussuojan omaaviin imeväisiin ja

kouluikäisiin lapsiin. Vuoden 2004 jälkeen SR11 hävitessä epidemiologinen tilanne on ollut rauhallinen. (Hulkko ym. 2010: 14; Mertsola & He 2010: 171–172; World Health Organization 2011.)



Kuva 2. Terveystieteiden tutkimuskeskukselle raportoidut hinkuyskätapaukset Suomessa vuosina 1995–2014. Vuosina 2003–2004 oli laaja hinkuyskä epidemia, jossa valtaosan tapauksista aiheutti Ranskassa vuonna 1994 todettu uusi *B. pertussiksen* tyyppi (SR11). (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2015.)

3 *Bordetella pertussiksen* diagnostiikka

Bordetella pertussiksen diagnosointiin käytetään viljelyä, PCR- ja serologisia -menetelmiä. Viljelyä ja PCR-menetelmiä taudin diagnosointiin käytetään enimmäkseen pienillä lapsilla ja imeväisillä, jotka tuodaan usein jo taudin alkuvaiheessa hoitoon. Näitä menetelmiä ei kannata käyttää, jos tauti on kestänyt yli kolme viikkoa. Varsinkin viljelyn herkkyys huononee, mitä kauemmin oireiden alkamisesta on. Kouluikäiset lapset ja aikuiset hakeutuvat hoitoon yleensä vasta myöhemmin, jolloin hinkuyskä diagnosoidaan serologisin menetelmin. (Mertsola & He 2010: 173.) Serologisia menetelmiä ei voida käyttää vastasyntyneille, johtuen immuunisysteemin kehittymättömyydestä ja äidin vasta-aineiden läsnäolosta (Guiso 2007: 6). Vuonna 2013 Terveystieteiden ja hyvin-

voinnin laitoksen raportin (Jaakola ym. 2014: 10) mukaan kaikki alle yksivuotiaat sairastuneet diagnosoitiin PCR-tutkimuksella. Muutoin valtaosa tapauksista diagnosoitiin serologisin menetelmin.

Liitteessä 1 on esitetty Suomen sairaanhoitopiirien, pois lukien Kymenlaakson sairaanhoitopiirin, käyttämät menetelmät *B. pertussiksen* diagnosointiin, tuloksen saamiseen kuluva aika, näytemateriaalit, indikaatiot sekä lähteet. Tiedot ovat kerätty Suomen sairaanhoitopiirien internetistä löytyvistä laboratorio-ohjekäsikirjoista. Kymenlaakson sairaanhoitopiirin laboratorio-ohjekäsikirjaa ei ollut saatavilla. Mukana on myös Yhtyneet Medix laboratoriot, sekä Turun yliopiston UTUlab, joista monet sairaanhoitopiirit ostavat yksittäisten analyysien testipalveluja, mutta eivät kuitenkaan suoraan palvele yksittäistä sairaanhoitopiiriä. Kuten aikaisemmin mainittu, käytettyjä menetelmiä *B. pertussiksen* diagnosointiin ovat viljely, PCR-pohjaiset ja serologiset menetelmät. PCR-menetelmillä tulos varmistuu parhaimmillaan jo seuraavana päivänä. Viljelyllä ja serologisten menetelmien avulla tuloksen saamiseen kuluu noin viikko. *B. Pertussiksen* diagnosoinnissa viljelyä ja PCR:ää varten näytemateriaalina käytetään nenänielutikku-, nenänieluumulima- tai sylkinäytettä. Serologisissa tutkimuksissa näytemateriaalina suositellaan käytettävän pariseeruminäytettä alle yksivuotiailla potilailla. Vanhemmilla potilailla tulos voidaan saada jo yhdellä seeruminäytteellä. (Eshp; Fimlab laboratoriot Oy; Huslab; Islab; Korkeila 2014; Nordlab; Phsotey; Satadiag; Tykslab; Utulab; Vshp; Yhtyneet Medix Laboratoriot.)

3.1 Viljely

Viljelyä pidetään 100 % spesifisenä, mutta esimerkiksi näytteenoton haastavuus ja kuljetusaika vähentävät menetelmän herkkyyttä. Viljelyn herkkyys on korkeimmillaan vastasyntyneillä ja rokottamattomilla lapsilla, joilla bakteeripitoisuus on suurempi kuin nuorilla ja aikuisilla. *B. pertussiksen* viljelyssä käytössä olevia kasvatusalustoja ovat Regan Lowe (RL) ja Bordet Gengou (BG). Jokaista näytettä tulisi kasvattaa selektiivisellä, normaaliflooraa inhiboivalla kefaleksiini-antibioottia sisältävällä kasvualustalla sekä antibioottia sisältämättömällä ei-selektiivisellä kasvualustalla. Nenänielunäyte voidaan myös rikastaa Stainer-Scholte -liemessä ennen maljoilla kasvattamista. Maljoja inkuboidaan aerobisissa oloissa 35–36 °C:ssa. Inkuboinnin tulisi kestää seitsemän päivää ennen tuloksen hylkäämistä negatiivisena, mutta negatiivinen tuloskaan ei poisulje hinkuuskän mahdollisuutta. Pesäkkeiden ilmentyessä maljoille, ne eristetään ja

identifioidaan mikroskopiolla gramvärjäyksen avulla. *B. pertussikselle* tyypilliset pesäkkeet ovat BG maljalla pieniä ja hohtavan läpikuultavia ja hemolyysivyöhykkeen ympäröimiä. RL maljalla pesäkkeet ovat pyöreitä, kiiltäviä ja hopeanvärisiä. (Guiso 2007: 6–9; Riffelmann ym. 2005.)

3.2 PCR-menetelmät

PCR-menetelmä *Bordetella pertussiksen* detektoimiseen kliinisistä näytteistä kuvailtiin ensimmäisen kerran vuonna 1989 ja reaaliaikainen PCR vuonna 2001 (Loeffelholz, M. 2012). PCR-menetelmät ovat kalliimpia kuin viljely, mutta herkempiä ja nopeampia etenkin taudin myöhäisemmässä vaiheessa ja antibioottikuurin aloittamisen jälkeen. Näyte PCR:ää varten tulisi ottaa kolmen viikon kuluessa oireiden alkamisesta, mutta tarkkoja tuloksia voidaan saada neljänkin viikon jälkeen. Tätä myöhemmin bakteeri-DNA vähenee merkittävästi, mikä nostaa väärin negatiivisten tulosten riskiä. PCR-menetelmien avulla on mahdollista löytää myös oireettomia *B. pertussiksen* kantajia potilaan läheisyydestä. Kouluikäisille lapsille ja aikuisille suositellaan nenänielutikkunäytettä ja pienille lapsille nenänielunimulimanäytettä, jolla saadaan enemmän näytemateriaalia. Nenänielunäytteen näytetikuksi suositellaan dacron- tai rayon-tikkuja, jotka Cloudin ym. (2002) tutkimuksen mukaan eivät inhiboi ollenkaan PCR:ää toisin kuin kalsiumalginaattitikkujen alginaatti, joita ei suositella käytettävän. Tikku kuljetetaan steriilissä, kuivassa koeputkessa laboratorioon. (Mertsola & He 2010: 174; Riffelmann ym. 2005.)

Tällä hetkellä ei ole olemassa FDA:n (Food And Drug Administration) hyväksymiä PCR-menetelmiä *B. pertussikselle* (Loeffelholz 2012). Euroopan tautivirastolla (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) on kuitenkin ohjeet ja protokollat, joita se suosittelee reaaliaikaisen PCR:n käyttöön *B. pertussiksen* diagnosoinnissa, mukaan lukien ohjeet näytteenottoon ja tulosten tulkintaan. ECDC suosittelee käytettäväksi PCR-menetelmäksi reaaliaikaista PCR:ää, ja sekvenssispesifisiä koettimia parantamaan tulosten spesifisyyttä (Dalby ym. 2012). Useita kohdesekvenssejä on mahdollista käyttää *B. pertussiksen* tunnistamiseen, mutta useimmat niistä esiintyvät myös muissa *bordetella* lajeissa. Yleisesti kohdesekvenssinä *B. pertussiksen* diagnosoinnissa käytetään insertiosekvenssiä IS481 (Dalby ym. 2012; Riffelmann ym. 2005.) Sekvenssin on todettu olevan herkkä ja spesifinen kohdesekvenssi, jota löytyy *B. pertussiksen* genomista noin 80–100 kopiota (Reischl ym. 2001).

3.3 Serologiset menetelmät

Suurin osa hinkuuskään sairastuvista vanhemmista rokotetuista lapsista, nuorista ja aikuisista diagnosoidaan serologian avulla. Serologiaa ei kannata käyttää taudin alkuvaiheilla, sillä vasta-aineet nousevat hitaasti monen viikon kuluessa. *B. pertussiksen* vasta-aineiden tunnistuksessa käytetään yleensä ELISA-menetelmiä (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), jossa mitataan enimmäkseen IgG-, mutta myös IgA- ja IgM-luokan vasta-aineita. ELISA-menetelmissä yleisesti käytössä oleva antigeeni on pertussistoksiini. ECDC suosittelee pertussistoksiini IgG-ELISA:aa *B. pertussiksen* serologiseen diagnostiikkaan ja WHO:n standardisoimaa referenssiserumia *B. pertussis* -antigeenin vasta-aineiden mittaamiseen (Riffelmann ym. 2012). Eri tutkimuksissa pertussistoksiini-IgG-serologiasta on saatu hyviä tuloksia, mutta jos potilas on rokotettu lähiaikoina, testi ei ole käyttökelpoinen, sillä myös käytössä olevat rokotteet sisältävät pertussistoksiini-antigeenia. (Mertsola & He. 2010: 174; Riffelmann ym. 2005.)

3.4 Muiden *Bordetellojen* erotusdiagnostiikka

B. pertussis ja *B. parapertussis* ovat samankaltaisia lajeja, mutta *B. parapertussis* ei ilmennä pertussistoksiinia koodaavaa geeniä. Lajien on arvioitu kehittyneen itsenäisiksi ihmisten patogeneiksi *B. bronchiseptica*, joka on eläimistä löydetty patogeenin laji. (Guiso 2007.) *B. parapertussis* aiheuttaa myös hinkuuskäätä, mutta taudinkuva on lievempi ja sitä esiintyy enimmäkseen rokotetuilla lapsilla. Mertsolan & Hen (2010: 172) mukaan suomalaisten tekemässä tutkimuksessa joka kolmas avohoidon potilailta viljelyllä tai PCR:llä varmistettu hinkuuskääninfektio oli *B. parapertussiksen* aiheuttamaa. *B. parapertussis* diagnosoidaan omalla PCR-menetelmällä ja yleisesti käytössä oleva kohdesekvenssi on IS1001. Äskettäin USA:ssa löydettiin uusi *B. pertussiksen* sukulainen *B. holmesii*, joka aiheuttaa myös puuskittaista yskää. Se ei kasva normaalissa *B. pertussikselle* tarkoitettussa kefaleksiinia sisältämällä kasvatusalustalla, mutta sen on huomattu reagoivan ristiin tavallisimman *B. pertussis* -alukkeen, IS481, kanssa antaen vääriä positiivisia tuloksia. *B. holmesiita* ei ole kuitenkaan löydetty Suomesta. (Mertsola & He 2010: 171–172.)

4 DNA:n eristäminen

DNA:n eristys on molekyylibiologiassa käytetty perusmenetelmä. Ennen kuin DNA:ta voidaan käyttää, kuten esimerkiksi monistaa PCR:llä, täytyy se ensin monesti eristää ja puhdistaa lähtömateriaalista (Suominen ym. 2010). Lähtömateriaalina voi toimia mikä tahansa biologinen materiaali, kuten kudokset, solut tai viruspartikkelit. Tällä hetkellä on olemassa monia erikoistuneita DNA-eristysmenetelmiä erilaisille näyttemateriaaleille. Menetelmistä on kehitetty erilaisia manuaalisia kaupallisia kittejä, joista suurin osa on kuitenkin monivaiheisia ja aikaa vieviä. Viimeisten vuosien aikana vähemmän työtä vaativien automaattisten menetelmien käyttö onkin kasvanut. Vaikka DNA:ta on mahdollista eristää monilla eri menetelmillä, on niillä kaikilla yhteiset perusvaiheet: solun lyysaus ja DNA:n puhdistaminen muista solun komponenteista. Solun lyyssauksessa solun rakenne hajotetaan ja nukleiinihapot vapautetaan. Lyyssauksen jälkeen vapautuneet nukleiinihapot puhdistetaan muista solun komponenteista, kuten proteiineista, hiilihydraateista, lipideistä ja RNA:sta. DNA:n eristyksessä on tärkeää, että kohde-DNA:han jäisi mahdollisimman vähän epäpuhtauksia. (Tan & Yiap 2009.)

Orion Diagnostican Oy:n tuotekehitysvaiheessa oleva uusi näytteenkäsittelymenetelmä on nukleiinihappojen eristysmenetelmä kliiniseen diagnostiikkaan. Näytteenkäsittelymenetelmä on tarkoitus kehittää mahdollisimman nopeaksi, helpoksi ja käyttäjäystävälliseksi. Menetelmä perustuu superparamagneettisiin silikananopartikkeleihin ja Boomin ym. (1993) patentoimaan kiinteäfaasiuuttomenetelmään, jossa silikapäälyllisteiset partikkelit sitoutuvat nukleiinihappoihin kaotrooppisen suolan läsnä ollessa.

4.1 DNA:n eristäminen *Bordetella pertussis*- ja muista kliinisistä näytteistä

PCR:ään perustuvan diagnostiikan ongelmana on kliinisten näytteiden epäpuhtauksista johtuva inhibitio, mikä tekee DNA:n eristämisen suoraan kliinisestä näytteestä haastavaksi. Tähän mennessä esimerkiksi veren, nenäliman ja virtsan on osoitettu inhiboivan PCR:ssä käytettävää DNA-polymeraasia. Näiden inhibiittoreiden toiminta on kuitenkin huonosti tunnettua. Kliinisistä näytteistä johtuva inhibitio korostaa tehokkaiden eristysmenetelmien tarpeellisuutta diagnostiikassa. Erilaisten kliinistennäytteiden eri koostumuksista johtuen, kullekin näytteelle tulisi soveltaa niille ominaisia eristysprotokollia. (Aygan 2005.)

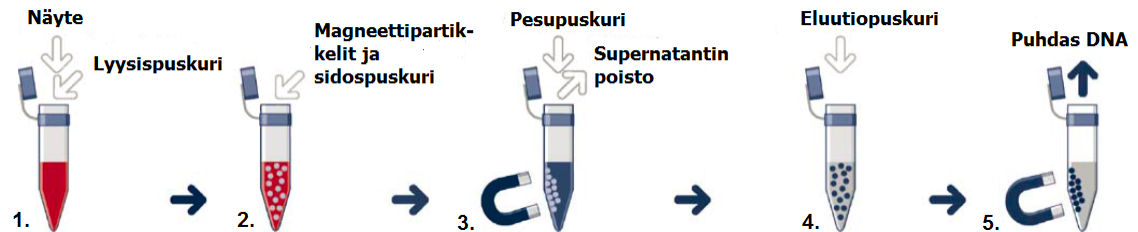
Erilaiset kaupalliset manuaaliset kitit ja automaattiset menetelmät ovat sopivia kliinisten näytteiden DNA:n eristämiseen. ECDC suosittelee *Bordetella pertussiksen* eristämiseen esimerkiksi Qiagenin QIAamp DNA mini -kittiä (Dalby 2012), joka on myös silika-pohjainen nukleinihappojen eristysmenetelmä (Qiagen 2012) sekä Rochen Pure DNA template preparation -kittiä, joka perustuu silikapartikkeleilla immobilisoiuihin spin-kolonneihin (Roche Applied Science 2008). Myös automaattista magneettisiin silikapartikkeleihin perustuvaa Rochen MagNA Pure system -eristysmenetelmää pidetään sopivana (Roche diagnostics 2012).

4.2 Magneettipohjainen nukleinihappoeristys

Magneettipartikkeleihin pohjautuva nukleinihappoeristys on yksinkertainen ja tehokas menetelmä, jota käytetään nykyään yleisesti nukleinihappojen eristykseen. Magnetismiin perustuvat menetelmät ovat nopeita ja helppoja verrattuna tavallisiin monivaiheisiin paljon pipetointia ja sentrifugointeja vaativiin eristysmenetelmiin. Eristys on mahdollista tehdä suoraan näyttemateriaalista, kuten verestä, homogeenisestä kudoksesta tai viljelyalustasta, ilman työläitä esikäsittelyvaiheita. Menetelmät ovat myös tarpeeksi herkkiä erityisesti nukleinihappojen sekä myös proteiinien ja muiden biomolekyylien eristykseen, sillä ne altistavat kohdemolekyylin vain hyvin vähäiselle mekaaniselle stressille. Magneettiset partikkelit ovat myös helposti ja valikoidusti poistettavissa jopa hyvin viskoosisista näyttemateriaaleista, kuten erilaisista kliinisistä näytteistä. Teknologia on myös helposti automatisoitavissa, mikä mahdollistaa useiden näytteiden käsittelyn samanaikaisesti. Nykyään monia eri magneettisia partikkeleita sekä niille kehitettyjä manuaalisia että automatisoituja protokollia on kaupallisesti saatavilla. (Berensmeier 2006; Saiyed ym. 2003.)

Perinteisessä manuaalisessa magneettisessa erottelussa magneettiset partikkelit pysyvät yhdessä reaktioputkessa, liikkuvana osana olevan nesteen vaihtuessa. Kuvassa 3 on esitetty DNA:n eristys magneettisilla nanopartikkeleilla. Ensimmäisessä vaiheessa lyysipuskuriin lisätään näyttemateriaali. Puskuri hajottaa näytteessä olevien solujen rakenteet ja vapauttaa nukleinihapot. Lyysauksen jälkeen putkeen lisätään sidospuskuri ja magneettipartikkelit, joihin lyysauksessa vapautuneet nukleinihapot sitoutuvat. Kolmannessa vaiheessa nukleinihapot puhdistetaan epäpuhtauksista lisäämällä pesupuskuri. Pesun jälkeen magneettipartikkelit sidotaan ulkoisen magneetin avulla putken seinämään ja muu neste poistetaan. Viimeisessä vaiheessa reaktioputkeen lisätään

eluutiopuskuri, johon nukleiinihapot irtoavat magneettipartikkeleista. Lopulta eluutiopuskuri puhtaine nukleiinihappoineen voidaan poistaa siirtämällä magneettipartikkelit putken seinään taas ulkoista magneettia käyttäen. (Berensmeier 2006.)



Kuva 3. Perinteinen magneettinen nukleiinihappoeristys. 1. Solut hajotetaan lyysispuskurissa. 2. Sidospuskuri lisätään, jolloin vapautuneet nukleiinihapot sitoutuvat magneettipartikkeleihin. 3. Reaktioputkeen lisätään pesupuskuri, jonka jälkeen magneettipartikkelit sitotaan ulkoisen magneetin avulla reaktioputken seinämää ja muu neste poistetaan. 4. Nukleiinihapot eluoidaan magneettipartikkeleista eluutiopuskuriin 5. Puhtaat nukleiinihapot voidaan poistaa. (Berensmeier 2006, muokattu.)

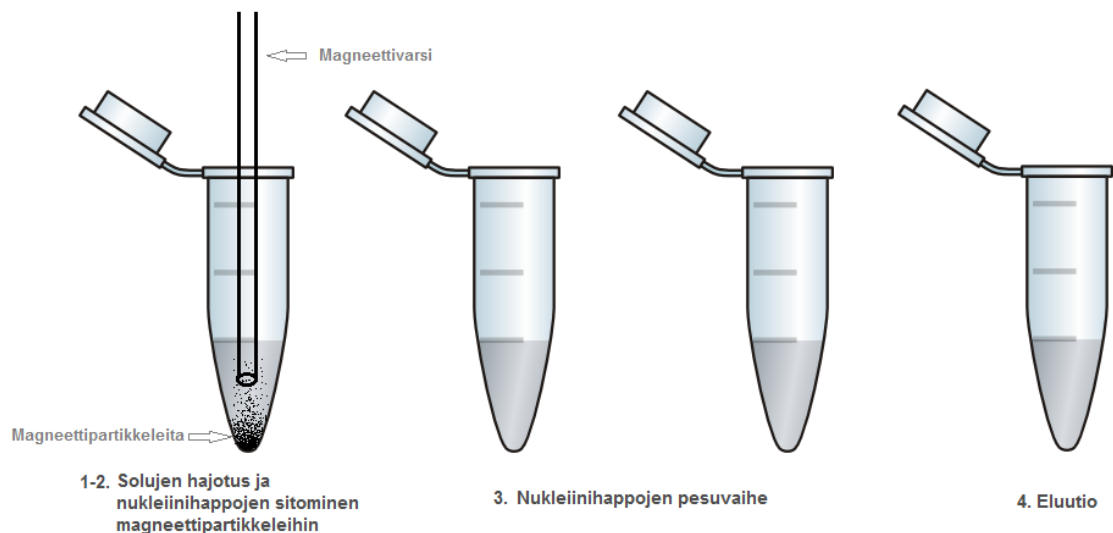
Suurin osa nykyään käytetyistä magneettipartikkeleista on superparamagneettisia eli ne voidaan helposti magnetisoida ulkoisella magneetikentällä ja palauttaa välittömästi, kun magneetikenttä poistetaan. Partikkelit ovat kooltaan noin 0,5–10 μm ja ne voidaan päällystää usealla eri tavalla eri käyttötarkoituksiin. Yleisiä magneettipartikkeleita ovat rautaoksidaista, kuten magnetiittista (Fe_3O_4) ja maghemiittistä ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) valmistetut partikkelit. Partikkelit voidaan päällystää erilaisilla materiaaleilla, kuten nukleiinihappoja sitovilla ligandeilla, synteettisillä polymeereilla, biopolymeereilla, huokoisella lasilla tai epäorgaanisilla magneettisilla materiaaleilla. (Berensmeier 2006; Tan & Yiap 2009.) Silikapäällysteiset magneettipartikkelit ovat yleisesti käytettyjä nukleiinihappojen eristykseen. Ne ovat erittäin stabiileja ja adsorboivat tehokkaasti DNA:ta pinnalleen (Grüttnner ym. 2001).

4.3 Kehitettävä menetelmä

Työssä kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä pohjautuu Boomin ym. (1990) kehittämään kiinteäfaasiuuttomenetelmään nukleiinihappojen eristykseen erilaisista kliinisistä näytteistä. Menetelmässä nukleiinihapot sitoutuvat silikapäällysteisiin nanopartikkeleihin kaatrooppisen suolan, guanidiinitiosyanaatin (GuSCN), läsnä ollessa (Boom ym. 1990). Guanidiinitiosyanaatti tehostaa nukleiinihappojen adsorptiota silikapartikkeleiden pintaan denaturoimalla proteiineja ja muodostamalla kationisillan DNA:n ja silikapartik-

keleiden välille sekä suojaamalla DNA:n negatiivista varausta (Sun ym. 2013). Guanidiinitiosyanaattilla on myös nukleaaseja inaktivoivia ja soluja hajottavia ominaisuuksia, jolloin solujen lyysaus ja nukleiinihappojen sitoutuminen silikapartikkeleihin voidaan tehdä samassa reaktiossa. Boomin metodiin perustuvissa menetelmissä solujen hajo- tusta ja nukleiinihappojen sitoutumista silikapartikkeleihin seuraa yksi tai useampi pesu- vaihe, jossa poistetaan kaatrooppisen suolan jäännökset ja muut epäpuhtaudet. Pesu- liuoksena voidaan käyttää esimerkiksi suolaa tai etanolia. Pesukerrat vaihtelevat protokollasta riippuen ja jälkimmäisissä pesuissa suola/etanolipitoisuus on yleensä pienempi. Liian monet pesut ja varsinkin liian alhainen suolapitoisuus voi johtaa kuiten- kin nukleiinihappojen eluoitumiseen pesuliuokseen ja täten nukleiinihapposaannon vähenemiseen. Lopuksi puhdistetut nukleiinihapot eluoidaan matalasuolaiseen pusku- riin, kuten TE (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid) -puskuriin PCR:ää varten. (Herzer 2001: 174–177; Sun ym. 2013)

Tuotekehityksessä olevaa näytteenkäsittelymenetelmää ja sen pusku- reiden koostu- muksia ei työssä voida yksityiskohtaisesti selostaa. Kuvassa 4 on havainnollistettu ke- hitettävässä näytteenkäsittelymenetelmässä olevat neljä eri vaihetta. Ensimmäisessä ja toisessa vaiheessa bakteerien soluseinät hajotetaan ja vapautuneet nukleiinihapot sidotaan silikapäälysteisiin paramagneettisiin partikkeleihin guanidiinitiosyanaattia si- sältävässä puskurissa. Magneettipartikkelit nukleiinihappoineen siirretään magneetti- varren avulla kolmanteen vaiheeseen, pesuvaiheeseen, joka koostuu etanolia ja natri- umkloridia sisältävistä pusku- reista. Neljännessä vaiheessa, eluutiosta, puhdistetut nukleiinihapot irrotetaan magneettipartikkeleista TE-pusku- riin.



Kuva 4. Kehitettävän eristysmenetelmän vaiheet. 1–2. Solut hajotetaan ja nukleiinihapot sidotaan magneettipartikkeleihin guanidiiniytosyanaatti-puskurissa. 3. Magneettipartikkelit nukleiinihappoineen siirretään magneettivarren avulla pesuvaiheeseen, joka koostuu etanoli- ja natriumkloridi-puskureista. 4. Eluutiovaiheessa puhdistetut nukleiinihapot irtotetaan magneettipartikkeleista.

4.4 Vertailumenetelmät

4.4.1 Qiagen EZ1 Advance XL

Vertailumenetelmänä kehitettävälle menetelmälle käytettiin Qiagenin EZ1 Advance XL -eristysmenetelmää, joka on automatisoitu menetelmä nukleiinihappojen puhdistukseen eri näytemateriaaleista sekä diagnostiseen että tutkimukselliseen käyttöön. Myös Qiagenin EZ1 Advance XL -eristysmenetelmä perustuu silikapäälysteisten magneettisten nanopartikkeleiden käyttöön. Menetelmässä esikäsiteltyyn näytteeseen lisätään ensin sidospuskuri ja vapautuneet nukleiinihapot sitoutuvat silikapäälysteisiin nanopartikkeleihin kaotrooppisen suolan läsnä ollessa. Tämän jälkeen magneettipartikkelit pestään ja lopulta puhtaat nukleiinihapot eluoidaan eluutiopuskuriin. (Himmelreich & Werner 2012.) Bakteerien DNA-eristyksessä voidaan käyttää EZ1® DNA Tissue Kit -tuotepakkausta, joka sisältää kaikki eristyksessä tarvittavat liuokset ja komponentit. Käytettävän protokollan asennukseen käytetään EZ1 Advanced DNA Bacteria -korttia. (Qiagen 2011.)

4.4.2 Bio Nobile QuicPick™-magneetikynä

Vertailumenetelmänä kehitettävän menetelmän magneettivarrelle käytettiin Bio Bobilen QuicPick™-magneetikynää. QuickPick™-teknologia perustuu kehitettävän menetelmän tavoin magneettipartikkeleiden liikuttamiseen nesteeseen sijaan. Teknologiassa nukleiinihappoja eristetään käyttäen QuicPick™-magneettista kynää yhdessä QuickPick™-regenssien kanssa. Kynää on kuitenkin mahdollista käyttää myös muihin sovelluksiin, jotka perustuvat magneettisiin partikkeleihin. (Bio-Nobile.) Kuvassa 5 on esitetty kokeessa käytetty QuicPick™ 1-M -magneetikynä ja kynän magneetin päällä käytettävät kertakäyttöiset kärjet.



Kuva 5. QuicPick™-magneetikynä ja siihen kuuluvat kärjet.

5 PCR menetelmänä ja käyttö diagnostiikassa

5.1 PCR:n periaate

Polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction, PCR) on menetelmä, jonka avulla voidaan monistaa DNA-jaksoja DNA-polymeraasin ja nukleotidijärjestykseltään tunnettujen alukkeiden avulla. Reaktiot tehdään yleensä pienissä mikrosentrifugiputkissa, joiden lämpötiloja muunnellaan PCR-laitteessa. (Mullis 1987).

PCR:ssä käytettävät alukkeet rajaavat DNA:sta alueen, joka halutaan monistaa. Alukkeet pariutuvat kaksijuosteisen DNA:n vastakkaisiin päihin emäspariperiaatteen mukaisesti. Templaattina voi toimia kaksijuosteinen DNA, mutta myös RNA, josta valmistetaan ensin käänteiskopioijaentsyymien avulla komplementaarinen DNA. Reaktioseokseen kuuluvat templaatin, polymeraasin ja alukkeiden lisäksi entsyymille sopiva pusku-

ri, nukleotidit ja vesi. Reaktioon voidaan lisätä tarvittaessa myös magnesiumioineja, joita DNA-polymeraasi tarvitsee kiinnittyessään templaattiin, alukkeisiin ja nukleotideihin. (Suominen ym. 2010: 153–162.)

PCR-sykliin kuuluu kolme vaihetta: denaturaatio, annealing ja ekstensio. Ensin templaatti denaturoidaan, yleensä noin 95 °C:ssa noin 30 sekunnin ajaksi, jolloin kaksijuosteisen DNA:n juosteet irtoavat toisistaan. Tätä seuraa annealing eli alukkeiden kiinnittyminen. Siinä lämpötilaa lasketaan sen verran, yleensä 55–74 °C:seen, että alukkeet pystyvät kiinnittymään templaattiin. Reaktion kolmannessa vaiheessa, ekstensio- eli pidennysvaiheessa, lämpötilaa nostetaan käytettävästä polymeraasista riippuen, noin 72 °C:seen, jolloin polymeraasi alkaa kiinnittää reaktioseoksessa olevia nukleotidejä paikoilleen alukkeen 3'-päästä alkaen. Templaatti-DNA:n kummallekin juosteelle muodostuu vastinjuoste, jotka taas denaturoidaan syklin ensimmäisessä vaiheessa. Alun perin kahdesta juosteesta muodostuu siis ensimmäisen syklin jälkeen neljä juostetta, toisen syklin jälkeen kahdeksan juostetta ja niin edelleen. Syklejä on yleensä 15–50. (Suominen ym. 2010: 154–163).

Alukkeiden oikea suunnittelu on PCR:ssä hyvin tärkeää. Annealing-lämpötila riippuu alukkeiden pituudesta ja nukleotidikoostumuksesta. T_m (melting temperature) eli alukkeiden sulamislämpötila kuvaa tilaa, jossa puolet alukkeista on kiinnittyneenä templaattiin ja puolet on irrallaan reaktioseoksessa. Mitä suurempi alukkeiden nukleinihappojen G ja C pitoisuus on, sitä suurempi on sulamislämpötila ja sitä voimakkaammin aluke kiinnittyy templaattiin. T_m ei saisi poiketa käytettävien alukkeiden välillä enempää kuin kaksi astetta, jotta alukkeiden sitoutuminen olisi mahdollisimman samankaltaista. Sopiva annealing-lämpötila on yleensä noin viisi astetta vähemmän kuin T_m . (Suominen ym. 2010: 158–160.) Alukkeiden oikea pitoisuus on PCR-reaktion onnistumisen kannalta myös tärkeää. Liian suuri alukepitoisuus voi aiheuttaa epäspesifistä monistumista ja alukkeiden kiinnittymistä toisiinsa (Life technologies).

PCR on erittäin altis kontaminaatioille, eli sellaiselle DNA:lle, joka ei ole peräisin alkuperäisestä näytteestä. Tämän takia varsinaisten monistusreaktioiden lisäksi tulisi tehdä negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Varsinkin diagnostiikassa negatiiviset kontrollit ovat tärkeitä, sillä kontaminaatiot voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. (Suominen ym. 2010: 156–165.)

5.2 qPCR – kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio

Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR:ssä (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) voidaan mitata spesifisesti halutun DNA:n määrä näytteessä ja monistumista voidaan tarkastella koko ajan reaktion edetessä. DNA:n monistus ja monistustuotteen tunnistaminen tapahtuvat yhdessä vaiheessa, mikä on kliinisen diagnosoinnin kannalta käyttäjäystävällistä, sillä se poistaa työläät monistuksen jälkeiset käsittelyt, kuten geelielektroforeesin. Myös kontaminaatoriski on pienempi, kun monistustuotetta ei tarvitse enää käsitellä laboratoriossa. (Suominen ym. 2010: 166–167; Yang & Rothman 2004.)

Menetelmässä monistuneen tuotteen seuraamiseen käytetään fluoresoivia merkkiaineita, joiden signaali moninkertaistuu niiden sitoutuessa syntetisoitavaan DNA-juosteeseen. Nykyiset PCR-laitteet voivat mitata jopa kuutta eri väriä. Signaali ilmoitetaan fluoresenssiyksikkönä eli RFU:na (Relative fluorescence unit), joka on jokaisella laitteella eri. Fluoresenssin voimakkuus kasvaa samassa suhteessa monistuneen tuotteen kanssa. Monistuksen alkuvaiheessa signaali on heikkoa, eikä sitä voida erottaa taustasignaalista. Tuotteen määrän kasvaessa eksponentiaalisesti, myös signaali nousee ja lopulta tasaantuu monistuksen päättyessä nukleotidien, alukkeiden ja entsyymien loppumiseen. Taustasignaalin erottamiseksi fluoresenssille voidaan asettaa kynnyisarvo (threshold), jonka ylittyessä näyte voidaan katsoa olevan positiivinen. C_T - (cycles required to reach threshold) arvo kuvaa sitä syklimäärää, jolloin monistuneen tuotteen signaali ylittää kynnyisarvon. Mitä enemmän DNA:ta on näytteessä, sitä aikaisemmin sen signaali ylittää kynnyisarvon. Monistuneen tuotteen määrää voidaan mitata vertaamalla sen C_T -arvoa DNA-kopiomääriltään tunnettuihin standardeihin. (Kubista ym. 2006: 98–102; Suominen ym. 2010: 167.)

Menetelmässä fluoresoivia merkkiaineita voidaan käyttää joko epäspesifisesti tai spesifisesti. Spesifisessä menetelmässä käytetään fluoresoivia värejä, joista SYBR[®] Green I on yksi yleisimmin käytetty väri. Fluoresoivan värin signaali voimistuu, kun se sitoutuu polymerisoinnin jälkeen kaksijuosteiseen DNA:han (kuva 6). Sitoutuminen on epäspesifistä, sillä väri sitoutuu samalla tavalla mihin tahansa reaktioseoksessa olevaan kaksijuosteiseen DNA:han. Spesifisessä menetelmässä käytetään fluoresoivia koettimia. Koettimet ovat monistettavalle tuotteelle spesifisiä sekvenssejä, joihin merkkiaineet on valmiiksi sidottu. ECDC:n suosittelemassa PCR-menetelmässä *B. pertussiksen* diagnosointiin käytetään LightCycler[®] -koettimia ja FRET (fluorescence resonance energy

transfer) -menetelmää (Dalby ym. 2012). FRET-menetelmä on energiansiirtotekniikka, jossa koettimen sitouduttua templaatti-DNA:han toisessa koettimessa oleva fluorofori viritetään sille ominaiselle aallonpituudelle ja sen energia siirtyy vieressä olevalle toisen koettimen fluoroforille, jonka signaali mitataan. (Kubista ym. 2006: 98–102; Suominen ym. 2010: 166–168.)



Kuva 6. SYBR® Green I -fluoresoivan värin sitoutuminen kaksijuosteiseen DNA:han (NFSTC Science Serving 2015, muokattu).

5.3 Käyttö diagnostiikassa

Viime vuosina kvantitatiivisia reaaliaikaisia PCR-menetelmiä on kehitetty tartuntatautiin, erityisesti bakteeritautien, rutiinidiagnostiikkaan. PCR:ään perustuvat menetelmät ovat viljelyyn verrattuna nopeampia ja herkempiä mahdollistaen jopa yhden bakteerin tunnistuksen näytteestä. Menetelmillä voidaan myös tunnistaa niitä lajeja, joiden viljely on hankalaa tai jopa mahdotonta. Toisin kuin viljelyllä, PCR-menetelmillä on myös mahdollista diagnosoida potilaita, joiden antibioottihoito on jo aloitettu. Antibioottiresistenssin tutkiminen perinteisin keinoin viljelemällä on aikaa vievää. PCR-menetelmät mahdollistavat antibioottiresistenssigeenien ja mutaatioiden nopean tunnistamisen, mikä helpottaa potilaan hoidon optimointia. Reaaliaikaista qPCR:ää voidaan käyttää määrittämään bakteerien määrää kliinisessä näytteessä. Menetelmällä on mahdollista tunnistaa sekä elävät että kuolleet bakteerit näytteestä. Hyvin harva kaupallinen PCR-testi on kuitenkaan kehitetty ja kliinisesti validoitu bakteeri-infektioiden diagnostiikkaan. FDA on hyväksynyt PCR-pohjaiset menetelmät muun muassa bakteereille *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis* ja *Streptococcus agalactiae*. *Bordetella pertussiksen* diagnosointiin ei ole olemassa FDA:n hyväksymiä PCR-menetelmiä. (Maurin 2012; Yang & Rothman 2004.)

PCR:ään perustuvien menetelmien haittapuoli on sen alttius vääriille positiivisille ja negatiivisille tuloksille. PCR-menetelmien korkea herkkyys nostaa kontaminaatoriskiä ja pienikin määrä monistustuotetta edellisestä reaktioista voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Väärät negatiiviset tulokset voivat johtua alkuperäisen näytteen alhaisesta patogeenipitoisuudesta tai eristyksen huonosta DNA-saannosta. Kliinisen näyttemateriaalin, kuten veren, virtsan ja nenänäytteiden inhibiittorit voivat estää monistusreaktion käynnistymisen aiheuttaen vääriä negatiivisia tuloksia. Menetelmien toinen haittapuoli on niiden kallis hinta verrattuna perinteisiin menetelmiin, kuten viljelyyn. Toisaalta, kun PCR-menetelmät kehittyvät automaattisiksi ja toistettavuudeltaan tehokkaammiksi, ne tulevat olemaan kysynnän myötä hinnaltaan kilpailukykyisiä perinteisille menetelmille. (Yang & Rothman 2004.)

6 Työn tarkoitus

6.1 Näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen

Insinööriyön tarkoituksena oli kehittää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitysvaiheessa olevaa uutta nukleinihappojen eristykseen tarkoitettua näytteenkäsittelymenetelmää *Bordetella pertussis* -bakteerin eristämiseen. Tavoitteena oli kehittää menetelmää niin, että sillä saataisiin suurin mahdollinen DNA-saanto. Tavoitteena oli myös tutkia miten tyypillinen *B. pertussis* -näyte, nenäsivelynäyte, vaikuttaa DNA:n eristämiseen ja PCR:ään kehitettävällä menetelmällä.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämiseksi tehtiin kokeita, jotka koostuivat menetelmässä käytettävien puskureiden kehittämisestä ja näyttemateriaalina olevan nenäliman vaikutuksen selvittämisestä eristymiseen ja magneettipartikkeleiden säilyvyyden tutkimisesta. Kehitettävää menetelmää verrattiin myös kaupalliseen silikamagneettipartikkeleihin perustuvaan Qiagenin EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään ja menetelmässä käytettävää magneettivartta kaupalliseen Bio Nobilen QuicPick™-magneetikynään.

Työssä tehdyt kokeet jaettiin kuuteen eri osa-alueeseen:

- Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään
- Kehitettävän eristysmenetelmän puskurien DNA-jäännökset

- Nenäsivelynäytteen inhibiittoreiden vaikutus
- Pesupuskureiden optimointi
- Magneettipartikkeleiden säilyvyys
- Magneettivarren ja QuicPick™-magneetikynän vertailu

Kokeiden tavoitteet ja tarkoitukset on esitetty alla tässä luvussa.

Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään

Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän ja Qiagenin EZ1 Advance XL -eristysmenetelmän vertailukokeen tavoitteena oli saada käsitys, kuinka tehokas kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä on tällä hetkellä verrattuna kaupalliseen menetelmään, joka myös perustuu magneettisiin silikananopartikkeleihin. *B. pertussis* -nenänielunäytteen solumäärät vaihtelevat noin sadasta solusta 10^5 -soluun (Nakamura ym. 2010), joten *B. pertussis*en diagnosoimisessa pientenkin solumäärien tehokas eristyminen on tärkeää. Tästä johtuen tarkoitus oli myös selvittää, kuinka pienen solumäärän kehitettävällä menetelmällä on mahdollista eristää ja mikä on kehitettävän menetelmän DNA-saanto verrattuna kaupalliseen eristysmenetelmään. Vertailussa ei otettu huomioon näytemateriaalin vaikutusta vaan eristykset tehtiin käyttäen ainoastaan *B. pertussis* -soluja.

Kehitettävän eristysmenetelmän puskurien DNA-jäännökset

Koska Qiagen EZ1 Advanced XL -eristysmenetelmän ja kehitettävän eristysmenetelmän vertailussa tulosten perusteella todettiin kehitettävän menetelmän DNA-saannon olevan vähäisempi, päätettiin kokeilla, kuinka paljon DNA:ta jää eristysprotokollan eri puskureihin. Eristyksen jälkeen jokaisesta puskurista otettiin näytteet, jotka ajettiin PCR:ssä. Protokollassa magneettipartikkeleiden tulee siirtää guanidiinitiosyanaatti-puskurissa hajonneista soluista irronnut DNA seuraaviin vaiheisiin. Jotta nähtiin, kuinka paljon guanidiinitiosyanaatti-puskuriin jää DNA:ta magneettipartikkeleiden jälkeen, otettiin puskurista näytteet sekä ennen että jälkeen magneettipartikkeleiden.

Nenäselvitysnäytteen inhibiittoreiden vaikutus

Nenäselvitysnäytteenä on todettu olevan PCR:ää inhiboivia vaikutuksia (Aygan 2005) ja niiden vaikutusta kehitettävän menetelmän eristystehokkuuteen tutkittiin nenäselvitysnäytteen inhibiittoreiden vaikutus -kokeella. Nenäselvitysnäytteen tutkimiseen ei ollut käytössä nenäselvitysnäytteitä, joissa näyttemateriaalia olisi otettu nenäselvitysnäytteenä. Näyttemateriaalin vaikutusta eristymiseen tutkittiin kastamalla nenäselvitysnäytepurkissa olevaan nenäselvitysnäytteenä ja eristämällä se yhdessä *B. pertussis* -solujen kanssa. Vaikka aitoa kliinistä näytettä ei ollutkaan saatavilla, kokeella saatiin suuntaa antavaa tietoa näyttemateriaalin inhiboivista vaikutuksista kehitettävän menetelmän eristyvyyteen sekä PCR:ään.

Pesupuskureiden optimointi

Pesupuskureiden optimointi -kokeessa selvitettiin saadaanko DNA-saantoa nostettua muulla kuin alkuperäisellä pesutavalla. Kokeessa tehtiin neljä erilaista eristystä, jossa kolmea eri pesuvaihtoehtoa verrattiin kehitettävän menetelmän alkuperäiseen pesutapaan, jossa ensimmäinen puskurisi sisältää etanolia ja toinen natriumkloridia. Kokeessa kokeiltujen pesuvaihtoehtojen koostumuksia ei voida työssä julkaista. Samassa kokeessa kaikkia eri pesuvaihtoehtoja kokeiltiin myös nenäselvitysnäytteen kanssa. Tällä kertaa näyttemateriaalia käytettiin vähemmän kuvaamaan paremmin oikeaa nenäselvitysnäytettä.

Magneettipartikkeleiden säilyvyys

Magneettipartikkeleiden säilyvyys -kokeella selvitettiin, pystyykö magneettipartikkeleita säilyttämään näytteenkäsittelymenetelmän guanidiinitiosyanaatti-puskurissa vai huonontaako tämä liikaa partikkeleiden tehokkuutta sitoa DNA:ta. Boomien menetelmän patentin mukaan silikapartikkeleita on mahdollista säilyttää guanidiinitiosyanaatissa, mikä kuitenkin vähentää partikkeleiden käyttöikä (Boom ym. 1993). Käyttöikää selvitettiin kokeessa, jossa magneettipartikkeleita säilytettiin guanidiinitiosyanaatti-puskurissa seuraavissa ajanjaksoissa: neljä viikkoa, kolme viikkoa, kaksi viikkoa, yksi viikko ja kolme päivää. Ajanjaksoja verrattiin eristykseen, joissa käytetyt magneettipartikkelit oli lisätty vasta juuri ennen eristystä. Jos magneettipartikkeleita tullaan säilyttämään guanidiinitiosyanaatti-puskurissa, tulee näyte lisätä vasta magneettipartikkeleiden lisäämisen jälkeen, mikä poikkeaa kehitettävän menetelmän aikaisemmasta proto-

kollasta. Tämän takia kokeessa verrattiin myös näiden eri toimintatapojen merkitystä eristymiseen.

Magneettivarren ja QuicPick™-magneetikynän vertailu

Magneettivarren ja QuicPick™-magneetikynän vertailussa tavoitteena oli tutkia, kuinka kehitettävässä menetelmässä käytettävä magneettivarsi eroaa ominaisuuksiltaan kaupalliseen tuotteeseen. Vertailukokeessa haluttiin verrata ainoastaan menetelmien magneettien käyttäytymistä, joten magneetikynään kuuluvia reagensseja ei käytetty.

6.2 Näytteenkäsittelymenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu

Insinöörityön toisena osa-alueena oli kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu ja käytettävyyden testaus. Näytteenkäsittelymenetelmä on tarkoitettu nopeaan ja helposti suoritettavaan nukleiinihappojen eristykseen. Eristyksen tulisi olla mahdollista suorittaa riippumatta työskentelijän koulustaustasta. Lopullisen tuotteen tulee sisältää kaikki eristykseen tarvittavat komponentit. Visuaalisen ilmeen ja käytettävyyden suunnittelu toteutettiin Orion Diagnostican näytteenkäsittelymenetelmän protokollan toimivuudelle ja testialustan käytettävyydelle asetettujen vaatimusten mukaan.

7 Materiaalit ja menetelmät

7.1 *Bordetella pertussiksen* kasvatus

Työn toteutus alkoi *Bordetella pertussiksen* kasvatuksella. *B. pertussista* kasvatettiin Bordet Gengou -kasvatusalustalla, jota käytetään yleisesti *B. pertussiksen* viljelyyn (Guiso 2007: 7–8). Maljoja viljeltiin 3–6 vuorokautta. Jotta varmistuttiin *B. pertussis* -kasvuston olevan puhdasviljelmä, ensimmäisestä maljasta poimittiin yksi pesäke, joka siirrostettiin uudelle maljalle ja josta siirrostettiin edelleen yksi pesäke vielä kolmannelle maljalle. Kolmannella maljalla kasvanut *B. pertussis* eristettiin ja todettiin oikeaksi bakteeriksi PCR:n avulla. Kuvassa 7 on nähtävissä *B. pertussiksen* kasvustoa BG -maljalla.



Kuva 7. *Bordetella pertussis* -kasvustoa Bordet Gengou -maljalla.

Eristyskokeiluja varten *B. pertussista* olisi ollut hyvä viljellä nestemäisellä kasvatusalustalla, jotta saataisiin solususpensio, jonka bakteerimäärä olisi määritettävissä. *B. pertussikselle* sopiva nestemäinen kasvatusalusta on Stainer Scholte (SS) -kasvatusliemi, jota ei kuitenkaan ollut kaupallisesti saatavana. Stainer Scholte -lientä valmistettiin itse WHO:n *B. pertussiksen* diagnosointiin tarkoitetun laboratoriomanuaalin ohjeen mukaan (Guiso 2007: 22–23). *B. pertussista* ei kuitenkaan tällä kasvatusalustalla saatu kasvaamaan. Jotta saataisiin solususpensio, jonka bakteerimäärä on määritettävissä, muutamia pesäkkeitä *B. pertussista* suspensoitiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). Tämän solususpension pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä mikrolitrasa eli cfu-määrä (colony forming unit) määritettiin pipetoimalla suspensiosta laimennetuista laimennoksista 50 µl BG-maljoille. Maljoilla kasvaneet pesäkkeet (kuva 8) laskettiin ja cfu/µl määritettiin kaavion 1 mukaan.

$$cfu/\mu l = \frac{\text{pesäkemäärä}}{\text{pipetoitu määrä } \mu l} \times \text{laimennoskerroin}$$

Kaavio 1. Cfu-määrittämisessä käytetty laskukaava.



Kuva 8. Yksittäisiä *Bordetella pertussis* -pesäkkeitä Bordet Gengou -maljalla.

7.2 qPCR:n pystytys

Insinööriyössä kehitettävän eristysmenetelmän DNA saannon mittaamiseen käytettiin kvantitatiivista reaaliaikaista PCR:ää eli qPCR:ää. Ennen qPCR:n pystytystä *B. pertussikselle* sopivat alukkeet ja PCR-protokolla etsittiin kirjallisuudesta. Työssä kokeiltiin kahta eri alukeparia, jotka molemmat on suunniteltu *B. pertussiksen* insertiosekvenssille IS481. Toinen alukepari valittiin reaaliaikaisesta PCR-menetelmästä, jota ECDC suosittelee *B. pertussiksen* diagnosointiin (Dalby ym. 2012) ja toinen alukepari Ménardin ym. (2006) PCR-protokollasta. Käytetyt alukeparit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. *B. pertussikselle* kokeillut alukkeet, niiden sekvenssit ja lähteet.

| Alukepari | Sekvenssi (5' - 3') | Lähde |
|----------------|---------------------------|------------------|
| Forward: BP-1 | GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT | Dalby ym. 2012. |
| Reverse: BP-2 | TTCAGGCACACAACTTGTATGGGCG | |
| Forward: F1-BP | TCCGAACCGGATTTGAGAAA | Ménard ym. 2006. |
| Reverse: R1-BP | CCGGGCTCCTTGAGTGAA | |

Alukepari BP-1 ja BP-2 monistavat pidempää, 181 bp:n kokoista aluetta ja alukepari F1-BP ja R1-BP lyhyempää, 60 bp:n kokoista aluetta *B. pertussiksen* insertiosekvenssistä. Alukkeiden asettuminen *B. pertussiksen* insertiosekvenssiin IS481 on esitetty kuvassa 9.

IS481:

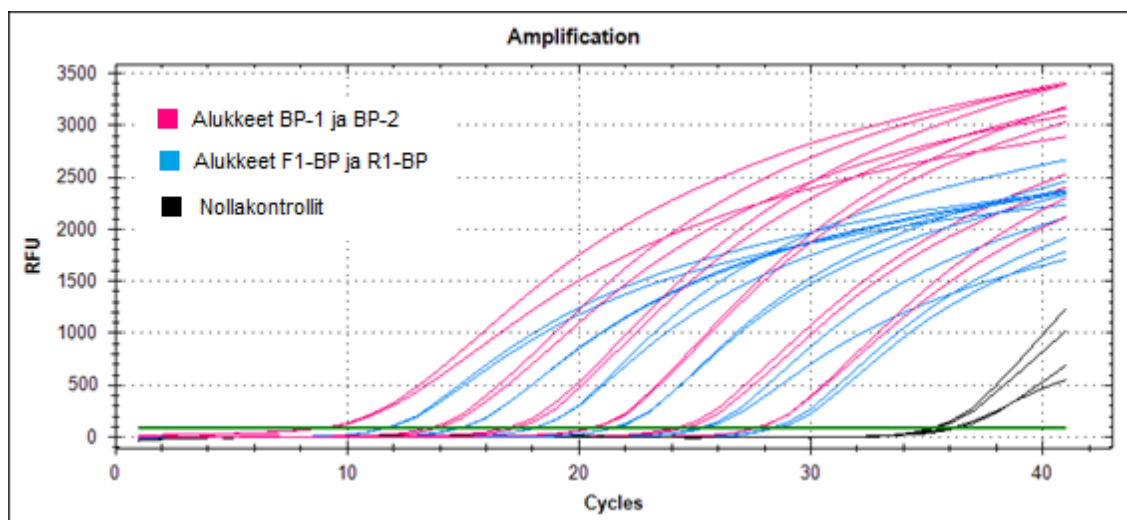
TGTGAA**GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT**CATCCGAACCGGATTTGAGAACTGGAAATCGC
CAACCCCCCAG**TCACTCAAGGAGCCCGG**CCGGATGAACACCATAAGCATGCCCGATTGAC
CTTCTACGTGACTCGAAATGGTCCAGCAATTGAT**CGCCCATCAAGTTTGTGTGCCTGAA**GC
GGCCCGCGCCTATGGGGTCACCGCGCCGACTGTGCGCAAATGGCTGGGCGCTTCCTGGCT
CAGGGCCAGGCGGCTTGGCCGATGCGTCTCGCGCCGACGGTCTCGCCCGAGCGATTG
CGCCGGCCAAGGCGCTGGCTATCGTGGAGCTGCGCCGCAAGCGGCTGACCCAAGCGCGCAT
CGCCAGGCGCTGGGCGTGTGAGCCAGCACCGTCAGCCGCGTCTGGCCCGCGCCGGTCTG
TCGCACCTGGCCGACCTGGAGCCGGCCGAGCCGGTGGTGCCTACGAGCATCAGGCCCCCG
GCGATCTGCTGCACATCGACATCAAGAAGCTGGGACGTATCCAGCGCCCTGGTCAACGGGTC
ACGGGCAACCGACGCGATACCGTTGAGGGGGCCGGCTGGGACTTCGTCTTCGTGGCCATCGA
TGACCACGCCCGCGTGGCCTTACCGACATCCACCCGACGAGCGCTTCCCAGCGCCGTCC
AGTTCTCAAGGACGCGAGTGGCCTACTACCAGCGCCTGGGCGTGACCATCCAGCGCTTGCTC
ACCGACAATGGCTCGGCCTTTCGAGCCGCGCCTTCGCCGCGCTGTGCCATGAGCTGGGCAT
CAAGCACCGCTTACCCGACCTTACCGCCACAGACCAATGGCAAGGCCGAACGCTTCATCCA
GTCGGCCTTGCGTGAGTGGGCTTACGCTCACACCTACCAGAACTCCCAACACCGAGCCGATG
CCATGAAATCCTGGCTACACCACTACAACCTGGCATCGACCCACCAAGGCATCGGGCGCGCT
GTACCCATCTCCAGACTCAACCTGGACGAATACAACCTATTGACAGTTCACAACCTAGG

Kuva 9. Alukkeiden BP-1 ja BP-2 (tummansinisellä) ja alukkeiden F1-BP ja R1-BP (vaaleansinisellä) asettuminen *Bordetella pertussiksen* insertiosekvenssiin IS481.

ECDC:n suosittelema PCR-protokolla *B. pertussiksen* diagnosointiin perustuu FRET-menetelmään, jossa käytetään LightCycler[®]-koettimia. Koettimilla on mahdollista saada spesifisempää signaalia, mutta työssä päädyttiin kokeilemaan alukkeita ilman näitä koettimia. Alukkeet ilman koettimia testattiin internetistä saatavana olevalla MFEprimer-2.0 -ohjelmalla (Wubin Qu & Chenggang Zhang), jotta varmistuttiin alukkeiden spesifisestä sitoutumisesta haluttuun kohde-DNA:han ilman koettimiakin. Alukekokeilussa käytettiin Ménardin ym. (2006) PCR-protokollaa, joka perustuu SYBR[®] Green -

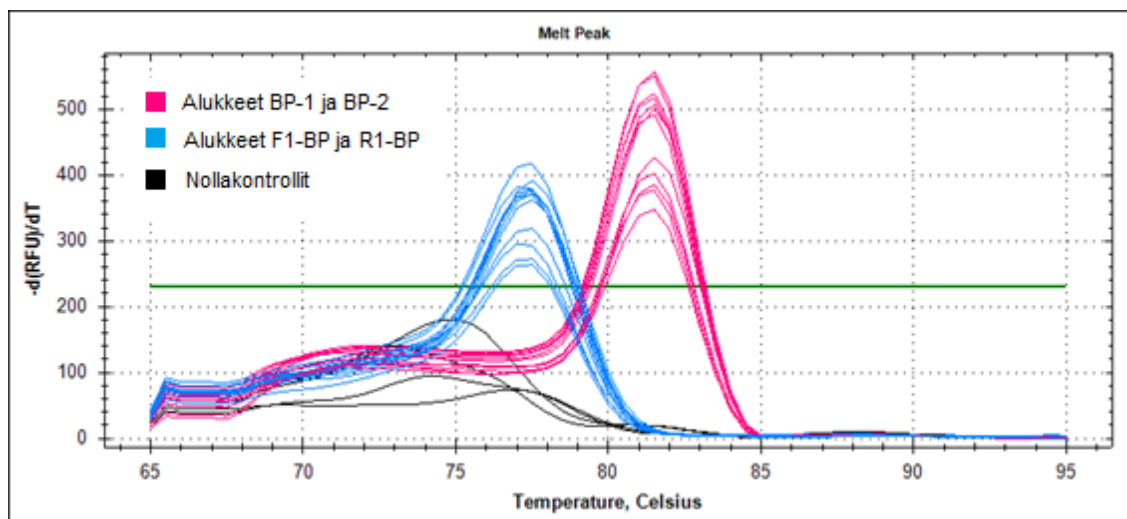
detektioon. Yhden PCR-reaktion kokonaistilavuus oli 25 μ l, joka sisälsi 12,5 μ l kaupallista Power SYBR® Green PCR Master Mixia (Applied Biosystems), 0,3 μ M kumpaakin aluketta ja 1 μ l templaatti DNA:ta. Käytetty PCR-ohjelma on esitetty liitteessä 2 (Ménard ym. 2006).

Monistusta kokeiltiin kuudella eri laimennoksella *B. pertussiksen* genomista DNA:ta. Kuvasta 10 nähdään, että alukeparilla BP-1 ja BP-2 monistuminen on parempaa kuin alukeparilla F1-BP ja R1-BP. Alukeparilla BP-1 ja BP-2 monistuminen alkaa keskimäärin noin 1,3 sykliä aikaisemmin kuin alukeparilla F1-BP ja R1-BP.



Kuva 10. *B. pertussiksen* gDNA:n monistuminen alukeparilla BP-1 ja BP-2 ja alukeparilla F1-BP ja R1-BP. Nollakontrollien monistuminen johtuu PCR-reaktiossa käytetystä suuresta alukemäärästä ja alukkeiden sitoutumisesta toisiinsa.

Kuvasta 10 nähdään myös, että PCR-ajossa mukana olleet nollakontrollit monistuvat. Tämän ei katsottu johtuvan kuitenkaan kontaminaatiosta vaan reaktiossa käytetystä alukkeiden suuresta määrästä, joka aiheuttaa alukkeiden epäspesifistä sitoutumista toisiinsa. Nollakontrollit eivät myöskin nouse sulamiskäyrässä (kuva 11) samassa lämpötilassa kuin kohde-DNA. Sulamiskäyrässä näkyvät kaksi piikkiä kuvaavat eri alukeparien monistamaa erikokoista DNA-pätkää. Alukkeiden F1-BP ja R1-BP monistamien tuotteiden sulamislämpötila on 77,5 °C ja alukkeiden BP-1 ja BP-2 sulamislämpötila on 81,5 °C.



Kuva 11. Alukekokeilun PCR-sulamiskäyrät. Alukkeiden BP-1 ja BP-2 monistamien tuotteiden sulamislämpötila on 81,5 °C ja alukkeiden F1-BP ja R1-BP monistamien tuotteiden sulamislämpötila on 77,5 °C. Nollakontrollit eivät nouse samassa lämpötilassa kuin kohde-DNA.

Koska monistuminen oli parempaa alukeparilla BP-1 ja BP-2, päädyttiin kaikissa insinööriyön kokeissa käyttämään näitä alukkeita ja tässä alukekokeilussa käytettyä PCR-protokollaa. Alukekokeilun raakadata on esitetty liitteessä 3.

7.3 Standardisuora ja kvantitaatio

Insinööriyön kokeissa eristettyjen näytteiden DNA-pitoisuuden ja käytetyn qPCR-protokollan herkkyuden selvittämiseen käytettiin standardisuoraa. Standardisuoraa varten alue *B. pertussiksen* insertiosekvenssiä IS481, jota työhön valitut alukkeet BP-1 ja BP-2 monistavat, kloonattiin *E. colista* eristetyn plasmidin avulla. Sekvenssin kloonaus tehtiin alihankkijalta Eurofins Genomics:lta. Laadun varmistamiseksi PCR:ää varten kloonattiin myös negatiivinen kontrolli, jossa plasmidiin siirrettiin alue *B. pertussiksen* insertiosekvenssistä IS481, jota valittujen alukkeiden ei kuulu monistaa. Kuvassa 12 on esitetty plasmideihin siirretyt negatiiviset ja positiiviset alueet *B. pertussiksen* sekvenssistä IS481, sekä työhön valittujen alukkeiden BP-1 ja BP-2 asettuminen positiiviseen sekvenssiin.

Sekvenssit plasmideissa:

Positiivinen:

ATGCAGGACGCCAGCGGCCAGCACAGGCTGTGGGTCCGCAACAGCGGCAGCGAGCCGGCC
 AGCGCCAACACCCTGCTGCTGGTGCAGACGCCACTAGGTGTGAA**GATTCAATAGGTTGTATG**
CATGGTCATCCGAACCGGATTTGAGAACTGGAAATCGCCAACCCCCAGTTCACCTCAAGG
 AGCCCGGCCGGATGAACACCCATAAGCATGCCCGATTGACCTTCCTACGTCGACTCGAAATG
 GTCCAGCAATTGAT**CGCCCATCAAGTTTGTGTGCCTGAA**GCGGCCCGCGCCTATGGGGTCCAC
 CGCGCCGACTGTGCGCAAATGGCTGGGCCGCTTCCTGGCTCAGGGCCAGGCGGGCTTGGC
 CGATGCGTC

Negatiivinen:

ACAATGGCTCGGCCTTTCGCAGCCGCGCCTTCGCCGCGCTGTGCCATGAGCTGGGCATCAA
 GCACCGCTTTACCCGACCTTACCGCCCACAGACCAATGGCAAGGCCGAACGCTTCATCCAGT
 CGGCCTTGCGTGAGTGGGCTTACGCTCACACCTACCAGAACTCCCAACACCGAGCCGATGCC
 ATGAAATCCTGGCTACACCACTACAACCTGGCATCGACCCACCAAGGCATCGGGCGCGCTGT
 ACCCATCTCCAGACTCAACCTGGACGAATACAACCTATTGACAGTTCACAACCTAGG

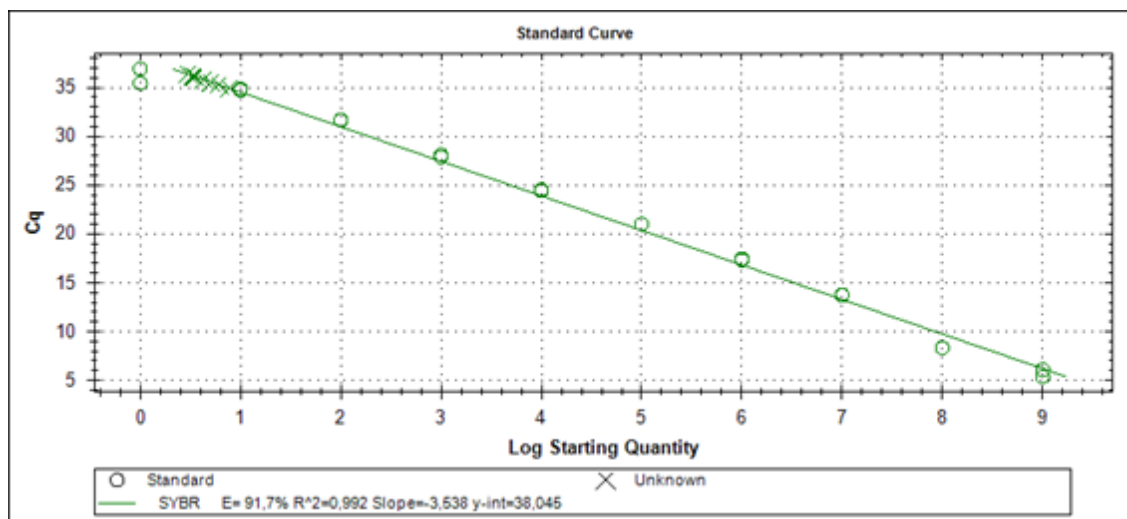
Kuva 12. Kloonatut positiiviset ja negatiiviset alueet *B. pertussis*en insertiosekvenssistä IS481. Kuvassa sinisellä näkyvät työhön valittujen alukkeiden BP-1 ja BP-2 asettuminen positiiviseen sekvenssiin.

Taulukossa 2 on esitetty positiivisen ja negatiivisen plasmidin pituus ja paino ja näistä lasketut plasmidien kopioluvut. Plasmidit saapuivat kylmäkuivattuina, joten ne liuotettiin sopivaan määrään TE-puskuria ja jaettiin pienempiin eriin.

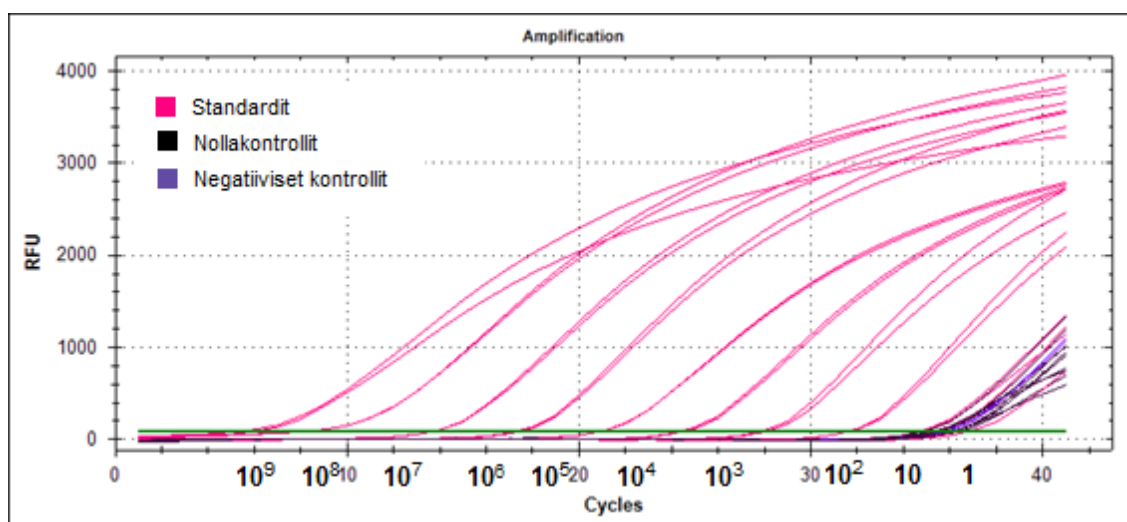
Taulukko 2. Alihankintana tilattujen positiivisen ja negatiivisen plasmidien painot, koot ja kopioluvut.

| Plasmidin nimi | Neg/pos | Paino (µg) | Plasmidi+geeni koko (Bp) | Kopiota (cp) |
|---------------------------------------|--------------|------------|--------------------------|-------------------------|
| Plasmid pEX-A2-B. pertussis IS481 | Positiivinen | 3,8 | 2827 | 1,24 x 10 ¹² |
| Plasmid pEX-A2-B. pertussis IS481 neg | Negatiivinen | 2,5 | 2753 | 8,4 x 10 ¹¹ |

Positiivisesta plasmidista laimennettiin 10 laimennoksen standardisuora (kuva 13), jossa DNA-kopioita oli 10⁹–1 mikrolitrassa. Negatiivisesta plasmidista tehtiin viisi laimennosta, jossa DNA-kopioita oli 10⁹–10⁵ mikrolitrassa. Kuvasta 14 nähdään, että kaikki muut laimennokset monistuivat, paitsi 1 kopio *B. pertussis* gDNA:ta. Negatiiviset ja nollakontrollit eivät monistuneet. Kyseistä standardisuoraa käytettiin työssä tehdyissä kokeissa kvantitoimaan qPCR:ää. Plasmidit saapuivat vasta insinööriytetyön loppuvaiheessa, joten kvantitaatiota ei sisällytetty kaikkiin kokeisiin. Kvantitaation raakadata on esitetty liitteessä 3.



Kuva 13. Insinööriyön kokeissa käytetty standardisuora, jossa 0 = 1 kopiota/ μ l, 1 = 10 kopiota/ μ l, 2 = 100 kopiota/ μ l, 3 = 1000 kopiota/ μ l, 4 = 10 000 kopiota/ μ l, 5 = 10^5 kopiota/ μ l, 6 = 10^6 kopiota/ μ l, 7 = 10^7 kopiota/ μ l, 8 = 10^8 kopiota/ μ l, 9 = 10^9 kopiota/ μ l.



Kuva 14. Insinööriyön kokeissa käytetyn standardisuoran PCR-monistuskäyrät, Negatiiviset ja nollakontrollit eivät monistuneet.

7.4 DNA:n eristys

Työssä DNA:n eristykseen käytettiin kehitettävää näytteenkäsittelymenetelmää ja vertailumenetelmää Qiagenin EZ1 Advanced XL -eristysmenetelmää. Molemmilla eristysmenetelmillä eristettäessä solujen laimentamiseen käytettiin PBS:ää. Kehitettävällä menetelmällä eristykset tehtiin tuotekehityksessä käytetyn protokollan mukaan, jota ei voida työssä selostaa. Eristyksissä käytettiin 20 μ l *B. pertussis* -solususpensiota. Qiagen EZ1

Advanced XL -menetelmällä eristykset tehtiin menetelmän ohjekirjan mukaan. Ohjeen mukaan, kun gramnegatiivisia -bakteereita, kuten *B. pertussis*, eristetään puhdasviljelmästä, ne esikäsitellään sentrifugoimalla 200 µl bakteerisuspensiota viisi minuuttia 5000 x g:ssä, jonka jälkeen supernatantti poistetaan. Eristys on myös mahdollista tehdä ilman sentrifugointia ja työssä eristykset tehtiinkin suoraan 20 µl:sta *B. pertussis* -solususpensiota. Jos bakteerit oli kasvatettu maljalla, voitiin käyttää muutamaa bakteeripesäkettä. 20 µl bakteerisoluja lisättiin 180 µl puskuri G2:sta 2 ml:n näyteputkessa. Kun eristettiin pesäkkeitä, ne suspensoitiin 200 µl:aan puskuri G2:sta. Esikäsitelyn jälkeen siirryttiin bakteerien Qiagenin EZ1 Advance XL:n prokollaan käyttäen EZ1 Advanced DNA Bacteria -korttia. (Qiagen 2011.)

8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tulosten tulkinnassa tavoitteena oli vertailla eristyskokeiden tuloksia PCR:n DNA-kopiolukujen avulla. Koska kvantitaatiota varten tilattu plasmidi saapui vasta kokeellisen osan loppupuolella, DNA-kopiolukuja ei voitu käyttää kaikkien kokeiden vertailussa. Kokeissa, jossa kvantitaatiota ei ollut mukana, tuloksia tulkittaessa vertailtiin PCR-syklien C_T -arvoja. Laadun varmistukseksi PCR:ssä jokaista näytettä pipetoitiin kaksi rinnakkaista näytettä ja eristyksiä tehtiin useilla eri laimennoksilla. Jokaisessa kokeessa nollakontrollina käytettiin templaattina TE-puskuria ja niissä kokeissa, joissa kvantitaatio oli mukana, negatiivisena kontrollina käytettiin negatiivista plasmidia. Kaikissa tässä työssä esitetyissä kokeissa negatiiviset ja nollakontrollit monistuivat noin 34 syklin jälkeen, mutta kuten aikaisemmin todettiin, monistuminen johtui alukkeiden suuresta määrästä, mikä aiheutti alukkeiden sitoutumista toisiinsa, eikä kontaminaatiosta. Kaikissa kokeissa monistuneet näytteet olivat oikeaa tuotetta sulamiskäyrien perusteella. Kokeissa monistetun DNA-sekvenssin sulamislämpötila oli noin 81,5 °C. Kaikkien kokeiden raakadatat on esitetty liitteessä 3 ja sulamiskäyrät liitteessä 4.

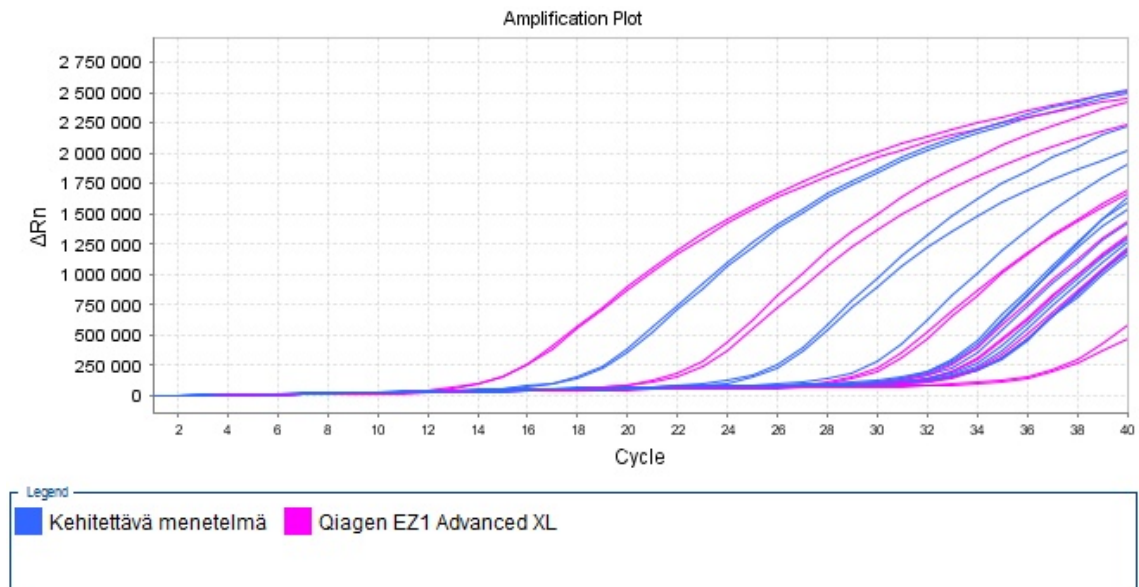
8.1 Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään

Kaupallisen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmän vertailussa tehtiin kaksi koetta. Kokeissa ei otettu huomioon näytemateriaalina olevan nenänäytteen vaikutusta eristymiseen, vaan eristykset tehtiin ainoastaan *B. pertussis* -soluista. Ensimmäisessä

kokeessa sekä kehitettävällä että vertailumenetelmällä eristettiin seitsemän eri solulaimennosta, joissa suurin käytetty solumäärä oli $1,24 \times 10^{11}$ ja pienin 12 solua/eristys.

Tulokset

Ensimmäisessä vertailukokeessa kaikilla solumäärillä eristetyt näytteet monistuivat lukuun ottamatta Qiagen EZ1:llä eristettyä pienintä solumäärää (12 solua). Kuvassa 15 on esitetty ensimmäisen kokeen PCR-monistuskäyrät, joista nähdään, että Qiagen EZ1-eristysmenetelmällä eristetyt näytteet monistuvat suurilla solumäärillä paremmin kuin kehitettävällä menetelmällä. Erot kuitenkin tasaantuvat mitä pienempää solumäärää käytetään.



Kuva 15. Ensimmäisen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmän vertailukokeen PCR-monistuskäyrät. Eristykset tehty seitsemällä eri solumäärällä: $1,24 \times 10^{13}$, $1,24 \times 10^{11}$, $1,24 \times 10^9$, $1,24 \times 10^7$, 124 000, 1 240 ja 12 solua/eristys.

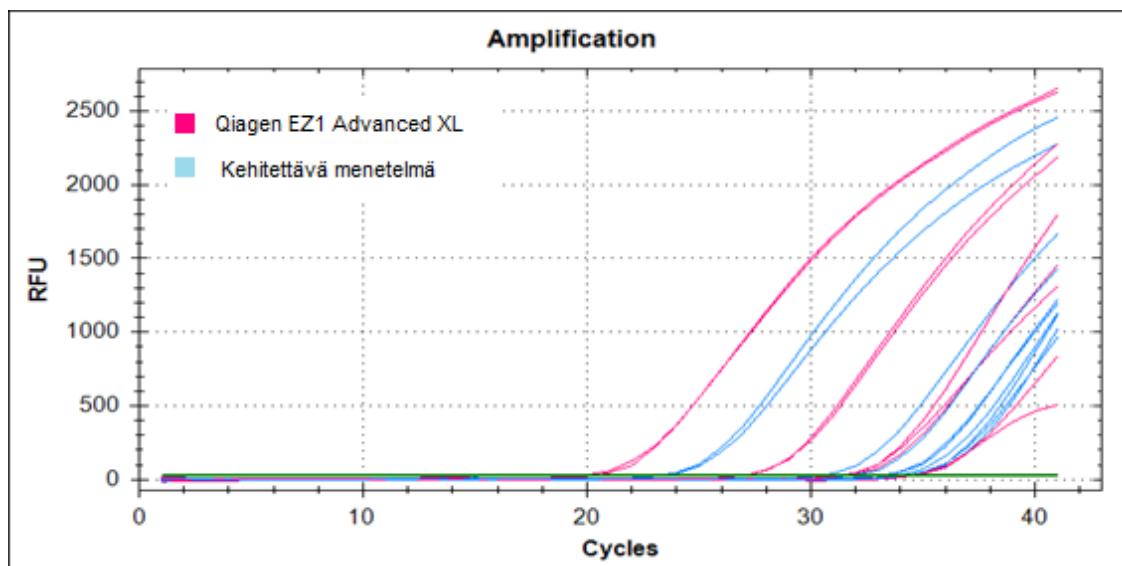
Taulukossa 3 on esitetty molemmilla eristysmenetelmillä monistuneet DNA-kopioluvut ja näistä lasketut DNA-saannot. Taulukosta nähdään, että monistuminen Qiagen EZ1:llä eristetyillä näytteillä on suurilla solumäärillä noin kymmenkertaista verrattuna kehitettävällä menetelmällä eristettyihin näytteisiin. Erot tasaantuvat kuitenkin huomattavasti pienemmällä solumäärillä. DNA-saantoa tarkasteltaessa molemmilla eristysmenetelmillä, saanto on suurilla solumäärillä pienempi kuin yksi prosentti. Saanto nousee yli yhden noin 1 200 solulla ja 12 solulla saanto on jo yli 100 %. Kokeen onnistumista alettiin epäillä, kun pienin solumäärä, joka kokeessa saatiin kehitettävällä menetelmällä

tunnistettua, oli 12 solua, mihin ei aikaisemmin kehitettävällä menetelmällä ole päästy. Myös käytettäessä pienempiä solumääriä, kopioluvut eivät laskeneet samassa suhteessa kuin käytetty solumäärä kummallakaan eristysmenetelmällä eristettäessä. Edellä mainituista syistä johtuen koe päätettiin uusiksi.

Taulukko 3. Ensimmäisen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmän vertailukokeen DNA-kopioluvut ja -saannot.

| Solua/eristys | Menetelmä | DNA-kopiota/ μ l | DNA-saanto, % |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| $1,24 \times 10^{13}$ | Kehitettävä menetelmä | 1 059 684 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 10 860 527 | < 1 |
| $1,24 \times 10^{11}$ | Kehitettävä menetelmä | 6670 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 66610 | < 1 |
| $1,24 \times 10^9$ | Kehitettävä menetelmä | 279 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 276 | < 1 |
| $1,24 \times 10^7$ | Kehitettävä menetelmä | 16 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 14 | < 1 |
| 124 000 | Kehitettävä menetelmä | 30 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 35 | < 1 |
| 1 240 | Kehitettävä menetelmä | 17 | 1,4 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 22 | 1,8 |
| 12 | Kehitettävä menetelmä | 60 | > 100 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | - | - |

Toisessa vertailukokeessa verrattiin enää viittä eri laimennosta, joissa suurin käytetty solumäärä oli $1,24 \times 10^{11}$ ja pienin 1 240 solua. Kokeessa muut paitsi kehitettävällä eristysmenetelmällä eristetyt kaksi pienintä ja Qiagenin EZ1 -eristysmenetelmällä eristetty pienin solumäärä monistuivat. Kuvassa 16 on esitetty toisen vertailukokeen PCR-monistuskäyrät. Monistuskäyristä nähdään, että myös toisessa vertailukokeessa monistuminen on parempaa suurempia solumääriä käytettäessä Qiagenin EZ1 -eristysmenetelmällä kuin kehitettävällä menetelmällä. Erot tasaantuvat mitä pienempää solumäärää käytetään.



Kuva 16. Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmän toisen vertailukokeen PCR-monistuskäyrät. Eristykset tehty viidellä eri solumäärällä: $1,24 \times 10^{11}$, $1,24 \times 10^9$, $1,24 \times 10^7$, 124 000 ja 1 240 solua/eristys.

Taulukossa 4 on esitetty toisessa vertailukokeessa monistuneet kopiomäärät sekä näistä lasketut DNA-saannot. Taulukosta nähdään, että myös toisessa kokeessa suurilla solumäärillä DNA-kopioluvut ovat vertailumenetelmällä noin kymmenkertaisia verrattuna kehitettävään menetelmään. DNA-saannot ovat alle yksi prosenttia kummallakin eristysmenetelmällä.

Taulukko 4. Toisen vertailukokeen DNA-kopioluvut ja -saannot.

| Solua/eristys | Menetelmä | DNA-kopiota/ μ l | DNA-saanto, % |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| $1,24 \times 10^{11}$ | Kehitettävä menetelmä | 7830 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 76600 | < 1 |
| $1,24 \times 10^9$ | Kehitettävä menetelmä | 39 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 599 | < 1 |
| $1,24 \times 10^7$ | Kehitettävä menetelmä | 8 | < 1 |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 27 | < 1 |
| 124 000 | Kehitettävä menetelmä | - | - |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | 26 | < 1 |
| 1 240 | Kehitettävä menetelmä | - | - |
| | Qiagen EZ1 Advance XL | - | - |

Tulosten tarkastelu

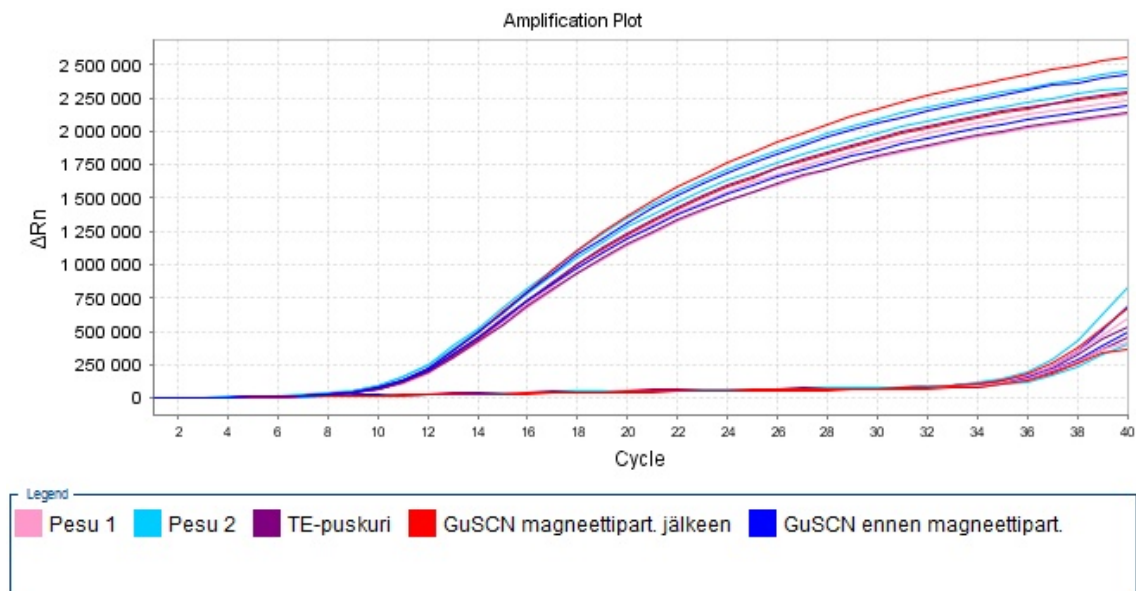
Tulosten perusteella kehitettävällä eristysmenetelmällä päästään lähes yhtä hyvään tehokkuuteen kuin vertailumenetelmällä eristettäessä pieniä solumääriä. Suurilla solumäärillä kehitettävä menetelmä ei ole kuitenkaan yhtä tehokas kuin vertailumenetelmä, mikä voi johtua esimerkiksi käytetystä magneettipartikkeleiden määrästä. Pienten solumäärien eristyvyys kehitettävällä menetelmällä on kuitenkin oleellisempaa, sillä oikeassa *B. pertussis* -näytteessä solumäärät ovat suhteellisen pieniä. Nakamuran ym. (2010) tutkimuksen mukaan *B. pertussis* -nenänielunäytteen solumäärät, varsinkin aikuisilla, voivat olla ainoastaan vain sata solua, jota kehitettävä eristysmenetelmä ei tulosten perusteella ainakaan vielä pysty eristämään. Toisaalta PCR:ää käytetään erityisesti alle yksivuotiaiden ja vastasyntyneiden diagnosoimiseen, joiden ikäisten näytteissä olevat bakteerimäärät vaihtelivat Nakamuran ym. (2010) tutkimuksessa olevilla potilailla $1,2 \times 10^5$ solusta $8,9 \times 10^6$ soluun. Pienin solumäärä, joka jälkimmäisessä kokeessa saatiin eristettyä kehitettävällä menetelmällä, oli $1,24 \times 10^7$ solua. Kehitettävän menetelmän DNA-saantoa tulee huomattavasti vielä parantaa. Molemmilla eristysmenetelmillä saatuihin heikkoihin DNA-saantoihin voi kuitenkin vaikuttaa epätarkka eristyksissä käytetyn solususpension solumäärä. Virhelähde on myös mahdollinen standardisuoran valmistuksessa. Jatkotutkimuksissa solususpension tarkempaan solumäärän määrittämiseen tulee rinnakkaisia maljauksia tehdä enemmän.

8.2 Kehitettävän eristysmenetelmän puskureiden DNA-jäännökset

DNA-jäännös-kokeessa puskureista otetut näytteet laimennettiin ionivaihdettuun veteen. Koska puskureita on eristysprotokollassa tilavuudeltaan eri määriä, laimennokset tehtiin niin, että tulokset olivat vertailtavissa. Jokaisesta puskurista otettiin myös negatiivinen ja positiivinen kontrolli, jotka laimennettiin samassa suhteessa kuin näytteet. Positiivisiin kontroleihin lisättiin vielä 2×10^5 kopiota/ μ l *B. pertussis* genomista-DNA:ta. Positiivinen kontrolli kuvaa monistuksen onnistumista, mutta myös sitä miten eri puskurit vaikuttavat monistumiseen. Esimerkiksi TE-puskuri on optimaalisempi PCR:ssä kuin inhibitiota aiheuttava guanidiiniosyanaatti-puskuri. Eristyksissä ei käytetty näytemateriaalia, vaan eristykset tehtiin suoraan *B. pertussis* -solususpensiosta. Kokeessa käytettiin solumäärää $1,24 \times 10^{13}$ solua/eristys.

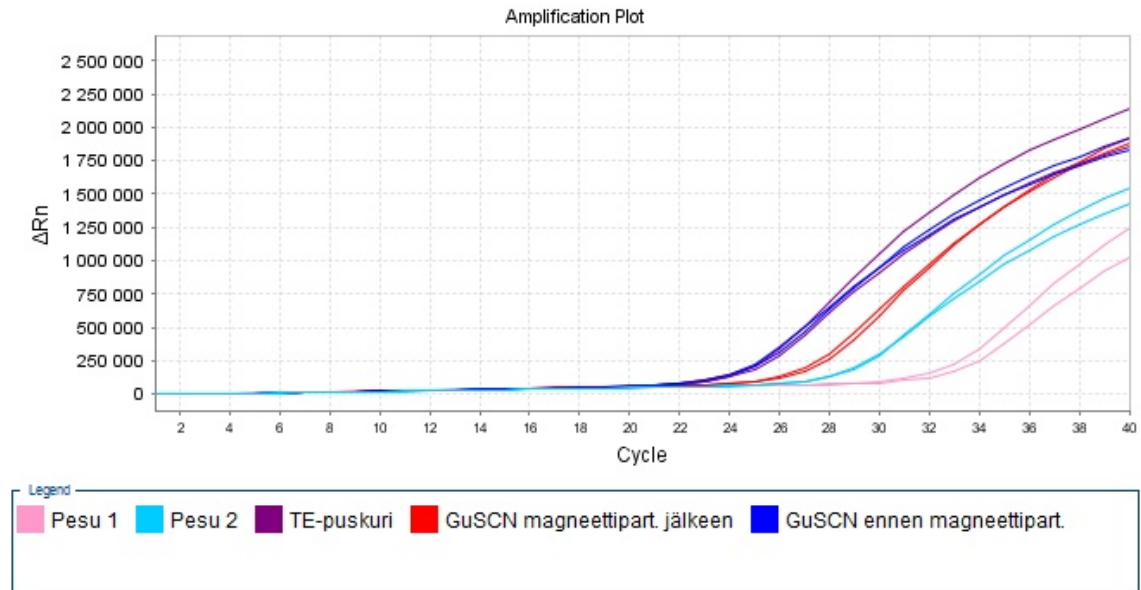
Tulokset

Kuvassa 17 on esitetty DNA-jäännös-kokeen negatiivisten ja positiivisten kontrollien sekä nollakontrollien PCR-monistuskäyrät. Kuviosta nähdään, että negatiiviset ja nollakontrollit nousevat vasta syklin 34 jälkeen eli ainoastaan alukkeet ovat monistuneet keskenään. Kaikkien puskurien positiiviset kontrollit nousevat samaan aikaan, mikä tarkoittaisi sitä, että eri puskureilla ei olisi vaikutusta PCR-monistukseen. Tämän voi kuitenkin johtua siitä, että positiivisiin kontrolleihin lisätty DNA-määrä 2×10^5 monistuu standardeissa niin hyvin, että eri puskurien vaikutus PCR-monistukseen ei tullut näkyviin. Todellisuudessa positiivisissa standardeissa oli luultavasti vielä enemmän DNA:ta, kuin 2×10^5 , sillä kvantitoinnissa tehdyssä standardisuorassa 10^5 kopiota/ μ l monistuu vasta syklin 20 jälkeen.



Kuva 17. DNA-jäännös-kokeen negatiivisten, positiivisten ja nollakontrollien PCR-monistuskäyrät. Kaikkien puskureiden positiiviset kontrollit nousevat samaan aikaan ja negatiiviset vasta syklin 34 jälkeen.

Kuvassa 18 on esitetty DNA-jäännös-kokeen PCR-monistuskäyrät, joista nähdään, että kaikissa eristysprotokollan puskureissa eristyksen jälkeen oli DNA:ta.



Kuva 18. DNA-jäännös-kokeen PCR-monistuskäyrät. Kaikissa eristysprotokollan puskureissa eristyksen jälkeen on DNA:ta.

Kyseisessä kokeessa ei ollut vielä kvantitaatiota mukana, joten tuloksista ei selviä monistuneiden tuotteiden tarkat kopiomäärät. PCR:n kvantitaatiossa monistetun standardisuoran avulla määritettiin DNA-jäännös-kokeen kopiomäärät suuntaa antavasti. Kopiomääristä laskettiin prosentuaalisesti, kuinka paljon DNA:ta eri puskureihin jäi. DNA-jäännös-kokeen C_T -arvot, arvioidut kopiomäärät sekä kopiomäärien prosentuaaliset osuudet on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. DNA-jäännös-kokeen puskurien C_T -arvot, aiemman standardisuoran avulla määritetyt suuntaa antavat kopiomäärät sekä kopiomäärien prosentuaaliset osuudet.

| | C_T | Arvioitu DNA-kopiomäärä/ μ l | Osuus, % |
|--------------------------------|-------|----------------------------------|----------|
| GuSCN ennen magneettipartik. | 23,90 | 727 000 | 45,0 |
| GuSCN magneettipartik. jälkeen | 26,26 | 156 400 | 9,7 |
| Pesu 1 | 31,97 | 3 800 | 0,2 |
| Pesu 2 | 28,10 | 47 200 | 2,9 |
| TE-puskuri | 24,00 | 681 100 | 42,2 |

Tulosten tarkastelu

Merkittävä tuloksista nähtävä asia on suuri eroavaisuus DNA-määrissä eri pesujen välillä: natriumkloridia sisältävään pesuun 2 jää enemmän DNA:ta kuin etanolia sisäl-

tämään pesuun 1. Liian alhainen suolapitoisuus pesussa 2 voi johtaa nukleiinihappojen eluoitumiseen pesuliuokseen ja täten nukleiinihapposaannon vähenemiseen. Tulosten mukaan DNA:ta jää huomattavasti myös guanidiinitiosyanaatti-puskuriin vielä magneettipartikkeleiden jälkeen. Tämä voi osittain johtua eristyksessä käytetystä suuresta solumäärästä. Kokeen tulosten tulkinnassa tulee ottaa huomioon eri puskureiden PCR:ää inhiboivat vaikutukset. Todennäköisesti guanidiinitiosyanaatti-puskurissa ennen ja jälkeen magneettipartikkeleiden sekä etanoli- ja natriumkloridipesussa on enemmän DNA:ta, kuin tuloksista nähdään. Määrät eivät tule kuitenkaan esiin johtuen puskureiden inhibiitoteikijöistä, jotka estävät PCR-monistusta.

Jatkotutkimuksissa DNA-saannon parantamiseksi tulee keskittyä näytteenkäsittelymenetelmän pesupuskureiden kehittämiseen. Erilaisia pesupuskureita kokeiltiin myöhemmin työssä esitettävässä pesupuskureiden optimointi -kokeessa. Jatkotutkimuksissa kehittävän menetelmän puskurien DNA-jäännös-koe tulee toistaa kvantitaation kanssa, jotta tarkemmat puskureihin jäävät DNA-määrät voidaan arvioida. Kokeessa eristykset tulee tehdä myös eri solumääriä käyttäen.

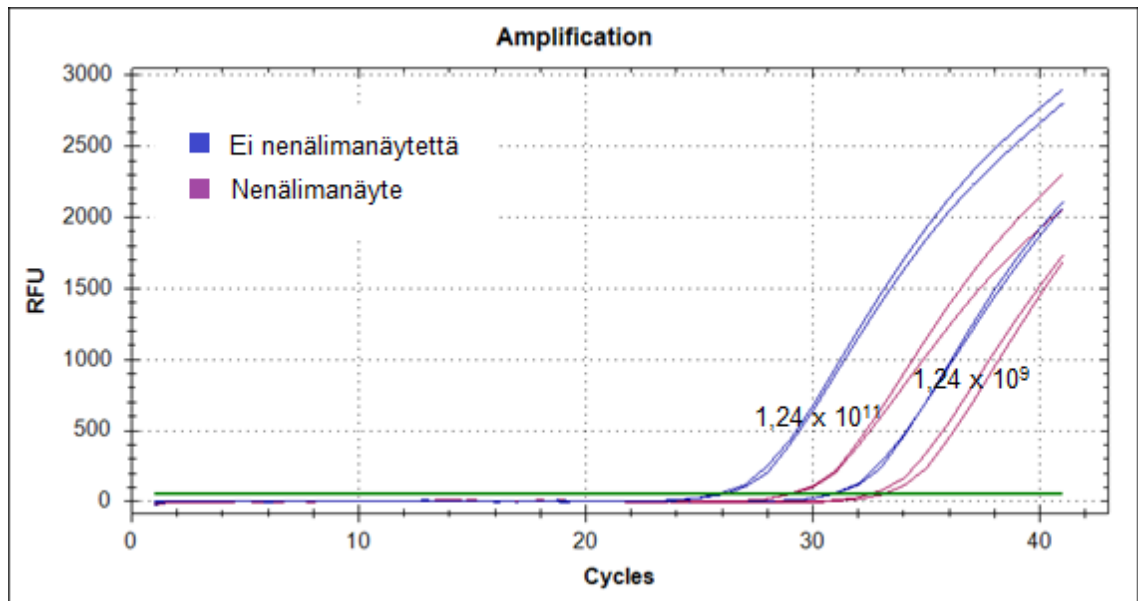
8.3 Nenäsivelynäytteen inhibiittoreiden vaikutus

Nenäsivelynäytteen inhibiittoreiden vaikutus -kokeessa tehtiin kolmea eri laimennosta käyttäen eristykset näytetikuista, jotka olivat kastettu näytemateriaaliin ja näytetikuista, joissa näytemateriaalia ei ollut. Näytetikkuna käytettiin Copanin FLOQSwabs™-nylontikkuja. Käytetyt solumäärät olivat $1,24 \times 10^{11}$, $1,24 \times 10^9$ ja $1,25 \times 10^7$ solua/eristys. Koska solut ja näytemateriaali, oikeasta nenänielunäytteestä poiketen, jouduttiin lisäämään erikseen, kaikilla laimennoksilla bakteerisolujen lisäys tehtiin toisissa näytteissä näytetikkua ennen ja toisissa näytteissä näytetikon jälkeen. Näin varmistettiin siitä, että näytetikki ei voi mahdollisesti imaista jo lisättyjä soluja väärentäen näin tuloksia. Kontrolleina kokeessa eristettiin myös nenälیمانäyte ilman bakteerisoluja, sekä ainoastaan bakteerisolut ilman nenälیمانäytettä.

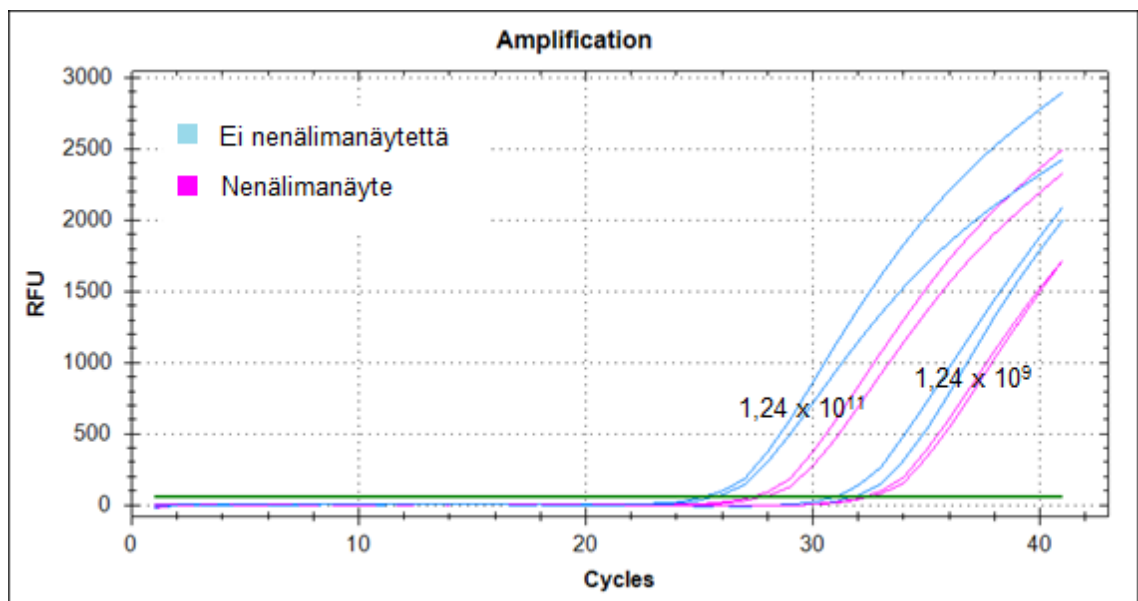
Tulokset

Koetta tehdessä standardisuoraa ei vielä ollut, joten tuloksissa vertaillaan PCR-syklien C_T -arvoja. Kokeessa pienin käytetty solumäärä ei monistunut ollenkaan. Kontrollinäyte ilman soluja ei monistunut, joten eristyksissä käytetty nenälیمانäyte ei oletetusti sisältänyt *B*

pertussis -bakteeria. Eristys, jossa oli ainoastaan käytetty *B. pertussis* -soluja, monistui kuten aiemmissa kokeissa. PCR-monistuskäyrät kahdella eri solulaimennoksella, joissa solut on lisätty näytetikon jälkeen, on esitetty kuvassa 19 ja PCR-monistuskäyrät, joissa solut on lisätty ennen näytetikkua kuvassa 20. Molemmilla tavoilla eritettäessä nenälimaa sisältäneet näytteet monistuivat myöhemmin kuin nenälimaa sisältämättömät näytteet.



Kuva 19. Inhibiittoreiden vaikutus -kokeen PCR-monistuskäyrät, joissa solut on lisätty näytetikon jälkeen solumäärillä $1,24 \times 10^{11}$ ja $1,24 \times 10^9$ eritettäessä. Näytteet, joissa nenälimaa on mukana, monistuvat myöhemmin kuin näytteet joissa nenälimaa ei ole mukana.



Kuva 20. Inhibiittoreiden vaikutus -kokeen PCR-monistuskäyrät, joissa solut on lisätty ennen näytetikkua solumäärillä $1,24 \times 10^{11}$ ja $1,24 \times 10^9$ eristettäessä. Näytteet, joissa nenälimaa on mukana, monistuvat myöhemmin kuin näytteet joissa nenälimaa ei ole mukana.

Taulukossa 6 on esitetty inhibitiokokeen C_T -arvot molemmilla eristystavoilla. Taulukossa on myös laskettu C_T -arvojen ero niiden näytteiden välillä, joissa nenälimanäyte on mukana ja joissa ei ole. Tuloksista nähdään, että riippumatta siitä onko solujen lisäys tehty ennen näytetikkua vai näytetikon jälkeen, nenälimaa sisältäneet näytteet monistuvat huomattavasti huonommin kuin näytteet ilman nenälimaa. Sykliä väliset erot olivat huomattavampia suuremmalla solumäärillä. Keskimäärin kummallakin tavalla eristettäessä C_T -arvot olivat noin 2 sykliä suurempia, kun näytematriisi oli mukana.

Taulukko 6. Inhibitiokokeen C_T -arvot molemmilla eristystavoilla ja C_T -arvojen ero niiden näytteiden välillä, joissa nenälima on mukana ja joissa nenälimaa ei ole mukana.

| | Solua/eristys | Nenälimanäyte C_T | Ei nenälimanäytettä C_T | Ero C_T |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|-----------|
| Solut lisätty näytteen jälkeen | $1,24 \times 10^{11}$ | 29,14 | 26,06 | 3,08 |
| | $1,24 \times 10^9$ | 32,92 | 31,01 | 1,91 |
| Solut lisätty ennen näytettä | $1,24 \times 10^{11}$ | 27,63 | 25,47 | 2,16 |
| | $1,24 \times 10^9$ | 32,44 | 31,43 | 1,01 |

Tulosten tarkastelu

Nenälimalla näyttää tulosten perusteella olevan pieni vaikutus monistumiseen. Kokeessa käytettyä näytemateriaalia ei kuitenkaan voida suoraan verrata oikeaan *B. pertussis* -nenänielutikkunäytteeseen. Oikeassa tilanteessa nenänielusta ei irtoa niin paljon limaa kuin mitä kokeen näytetikkunäytteenä tuli, kun se kastettiin nenälimanäytteeseen. Tuloksista on kuitenkin nähtävissä, että nenäliman inhibiittoreilla on vaikutusta kehitettävän menetelmän eristystehokkuuteen ja lopputuotteen puhtausasteeseen. Jatkotutkimuksissa tulee eristämistä kokeilla näytetikulla, jossa näytemateriaali on kerätty nenänielusta kuten oikeat *B. pertussis* -näytteet.

8.4 Pesupuskureiden optimointi

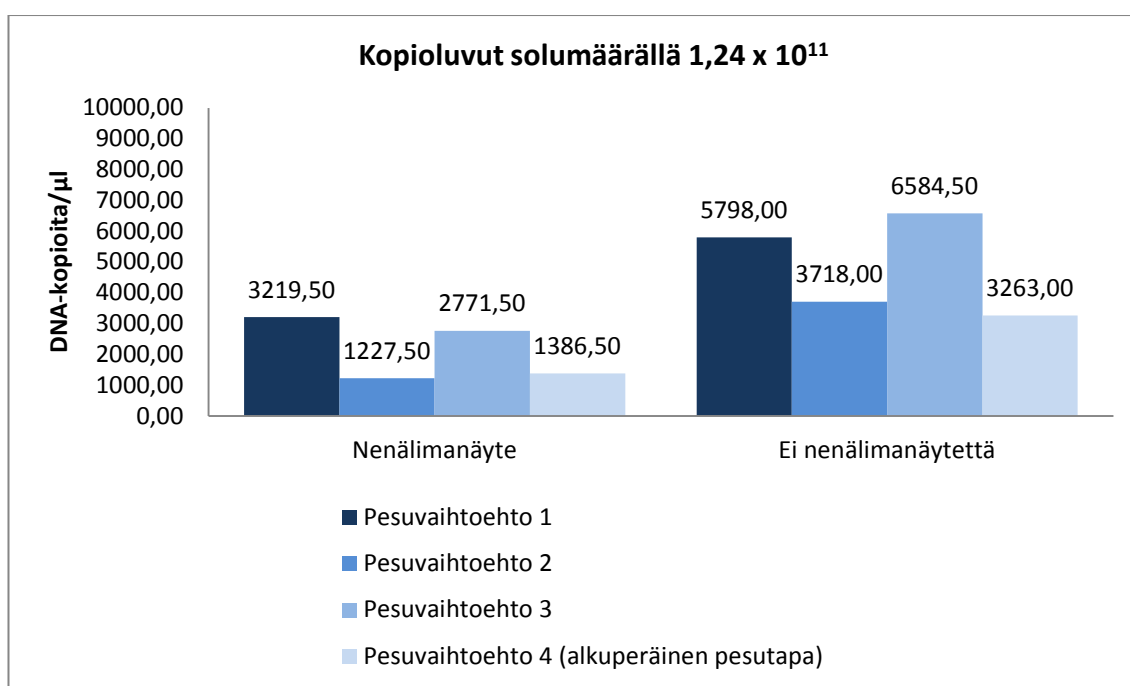
Pesupuskureiden optimointi -kokeessa jokaista neljää eri pesuvaihtoehtoa eristettiin kahdella eri solumäärällä; $1,24 \times 10^{11}$ ja $1,24 \times 10^9$ solua/eristys. Molemmilla solumäärillä ja kaikilla pesuvaihtoehdoilla eristettäessä mukana olivat myös näytteet, joissa näytemateriaalia ei ollut ja näytteet, joissa näytemateriaali oli mukana. Jotta näytetikkuihin saatiin todenmukaisempi määrä näytettä, näytetikkuja ei tällä kertaa kastettu suoraan nenälیمانäytteeseen, vaan materiaalia kerättiin näytetikulla astian reunoilta. Tästäkin kokeesta näytetikkuina käytettiin Copanin FLOQSwabs™-nylontikkuja. Taulukossa 7 on esitetty kokeessa eristetyt näytteet ja käytetyt pesuvaihtoehdot. Kokeessa kokeiltujen pesuvaihtoehtojen koostumuksia ei voida työssä julkaista, joten käytetyt pesuvaihtoehdot numeroitiin 1–4.

Taulukko 7. Pesupuskureiden optimointi -kokeessa eristetyt näytteet ja käytetyt pesuvaihtoehdot.

| Näyte | Soluja/eristys | Näyte/ei näytettä | Pesu |
|-------|-----------------------|-------------------|--|
| 1 | $1,24 \times 10^{11}$ | Nenälima | Pesuvaihtoehto 1 |
| 2 | $1,24 \times 10^9$ | Nenälima | |
| 3 | $1,24 \times 10^{11}$ | Tyhjä näytetikku | |
| 4 | $1,24 \times 10^9$ | Tyhjä näytetikku | |
| 5 | $1,24 \times 10^{11}$ | Nenälima | Pesuvaihtoehto 2 |
| 6 | $1,24 \times 10^9$ | Nenälima | |
| 7 | $1,24 \times 10^{11}$ | Tyhjä näytetikku | |
| 8 | $1,24 \times 10^9$ | Tyhjä näytetikku | |
| 9 | $1,24 \times 10^{11}$ | Nenälima | Pesuvaihtoehto 3 |
| 10 | $1,24 \times 10^9$ | Nenälima | |
| 11 | $1,24 \times 10^{11}$ | Tyhjä näytetikku | |
| 12 | $1,24 \times 10^9$ | Tyhjä näytetikku | |
| 13 | $1,24 \times 10^{11}$ | Nenälima | Pesuvaihtoehto 4 (Alkuperäinen pesutapa) |
| 14 | $1,24 \times 10^9$ | Nenälima | |
| 15 | $1,24 \times 10^{11}$ | Tyhjä näytetikku | |
| 16 | $1,24 \times 10^9$ | Tyhjä näytetikku | |

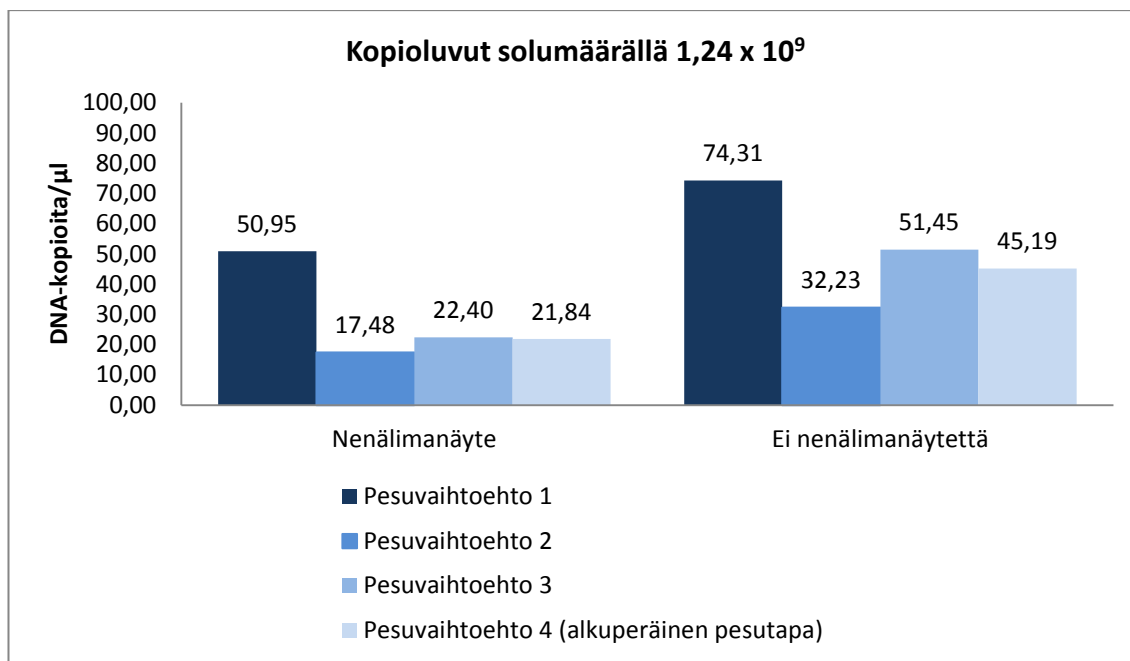
Tulokset

Kokeessa eri pesuvaihtoehtoja ja näytemateriaalin vaikutusta verrattiin PCR:ssä monistuneiden kopiolukujen avulla. Kuvasta 21 nähdään miten eri pesuvaihtoehdot vaikuttivat DNA kopiolukuihin solumäärällä $1,24 \times 10^{11}$. Tulosten perusteella näytteet monistuivat parhaiten, kun eristys tehtiin joko pesuvaihtoehdolla 1 tai pesuvaihtoehdolla 3. Huonoiten monistuivat näytteet, jotka olivat eristetty pesuvaihtoehdolla 2 ja alkuperäisellä pesutavalla. Kuvasta 21 nähdään myös, että vaikka näytemateriaalia oli eristyksissä tällä kertaa mukana vähemmän, nenälimaa sisältäneet näytteet monistuivat huominkin kuin näytteet ilman nenälimaa kaikilla pesuvaihtoehdoilla.



Kuva 21. Pesupuskureiden optimointi -kokeen kopioluvut solumäärällä $1,24 \times 10^{11}$. Parhaaseen DNA-saantoon päästiin pesuvaihtoehdolla 1.

Kuvassa 22 on esitetty kokeen PCR:ssä monistuneet kopiolukumäärät solumäärällä $1,24 \times 10^9$. Kuvasta nähdään, että myös pienemmällä käytetyllä solumäärällä parhaiten monistuivat näytteet, joiden pesussa oli käytetty pesuvaihtoehtoa 1. Huonoiten pienellä solumäärällä eristettävistä näytteistä monistuivat näytteet, joiden pesussa oli käytetty pesuvaihtoehtoa 2. Nenänäytettä sisältäneet näytteet monistuivat pienemmälläkin solumäärällä huominkin kuin ilman nenänäytettä kaikilla pesuvaihtoehdoilla.



Kuva 22. Pesupuskureiden optimointi -kokeen kopioluvut solumäärällä $1,24 \times 10^9$. Parhaaseen DNA-saantoon päästiin pesuvaihtoehdolla 1.

Tulosten tarkastelu

Tulosten perusteella parhaaseen DNA-saantoon päästiin pesuvaihtoehdolla 1 ja huonompaan pesuvaihtoehdolla 2. Vaikka eri pesuvaihtoehtojen välillä havaittiinkin eroja, erot olivat hyvin pieniä. Tulosten perusteella alkuperäinen pesutapa on kuitenkin mahdollista vaihtaa kokeessa kokeiltuun pesuvaihtoehtoon 1, joka hieman paransi DNA-saantoa. Jatkotutkimuksissa on hyvä mitata eluutiopuskuriin kulkeutuvat guanidiinitiosyanaatti-, etanoli- ja suolapitoisuudet ja kuinka paljon puskuri sisältää muita epäpuhauksia kuten proteiinjäämiä.

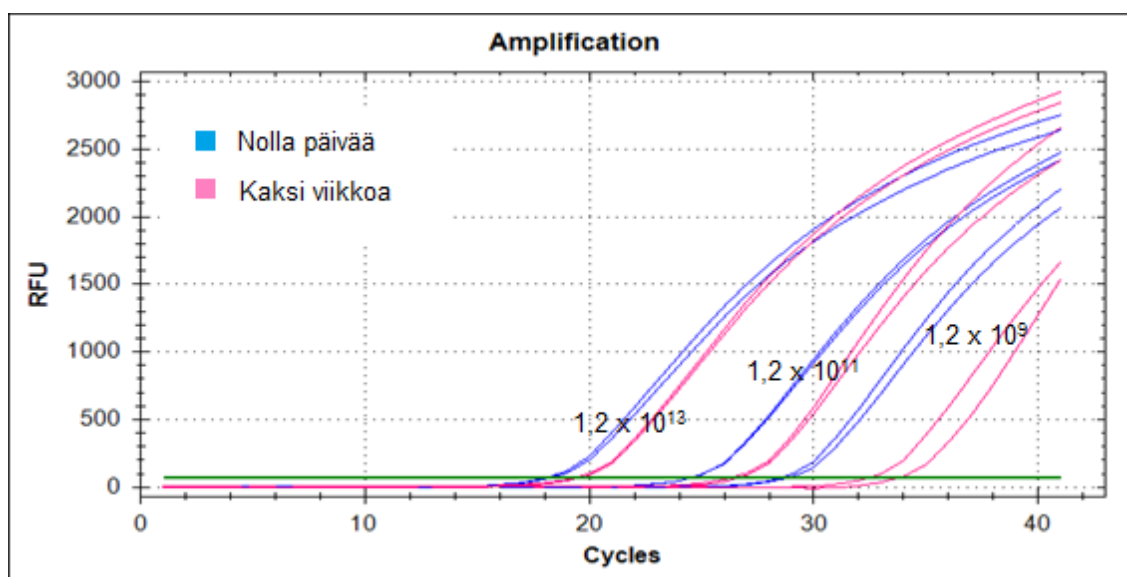
8.5 Magneettipartikkeleiden säilyvyys

Magneettipartikkeleiden säilyvyys -kokeella tutkittiin magneettipartikkeleiden säilyvyyttä guanidiinitiosyanaatti-puskurissa. Magneettipartikkelit lisättiin guanidiinitiosyanaatti-puskuriin ja annettiin seistä huoneenlämmössä eri aikoja. Ajankäytöllisistä syistä säilyvyyskoe tehtiin kahdessa osassa, jossa ensimmäisessä kokeessa eristettiin näytteet, joissa magneettipartikkeleita oli säilytetty guanidiinitiosyanaatti-puskurissa kaksi viikkoa, yksi viikko, kolme päivää ja nolla päivää. Lisäksi vertailuksi eristettiin myös nolla päivää säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteet, jossa magneettipartikkelit lisättiin

guanidiinitiosyanaatti-puskuriin vasta solujen lisäämisen jälkeen. Toisessa kokeessa eristettiin guanidiinitiosyanaatti-puskurissa neljä viikkoa säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteet ja vertailuksi vielä nolla päivää säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteet. Jokaisen ajanjakson näytteet eristettiin kolmella eri solulaimennoksella, joissa oli $1,2 \times 10^{13}$, $1,24 \times 10^{11}$ ja $1,24 \times 10^9$ solua/eristys.

Tulokset

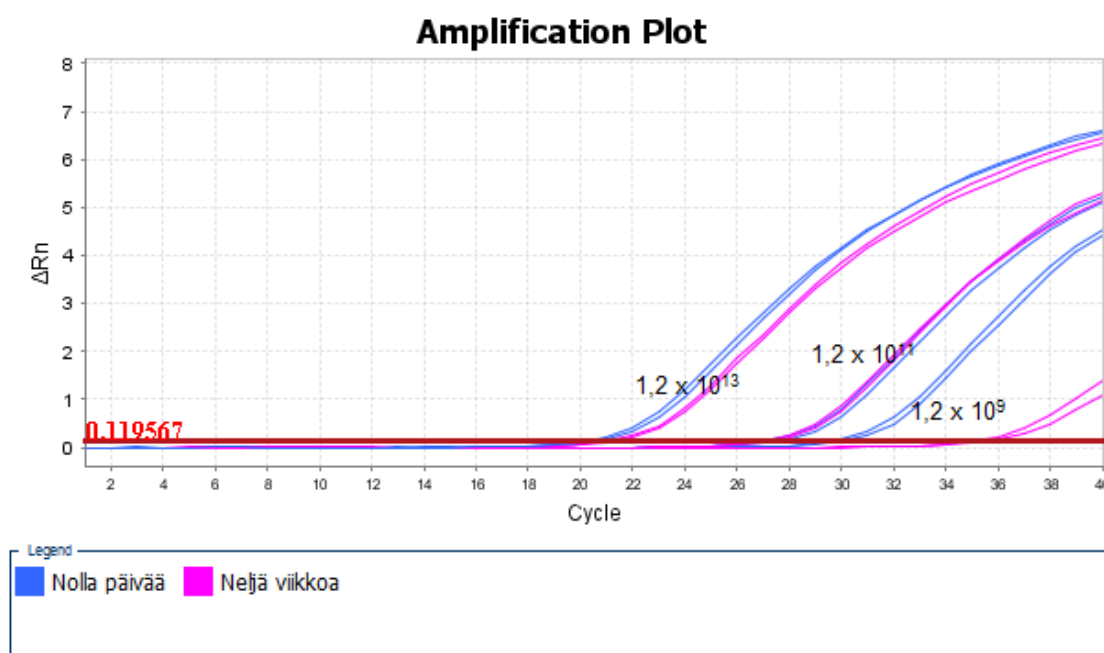
Ensimmäisen kokeen tulosten mukaan monistuminen oli huonompaa, mitä pidempään magneettipartikkelit olivat säilyneet guanidiinitiosyanaatti-puskurissa. Suurin ero syklien välillä oli kaksi viikkoa säilyneillä näytteillä ja nolla päivää säilyneillä näytteillä. Erot suurenivat, kun eristettiin pienempiä solumääriä. Kuvasta 23 nähdään eri solulaimennoksilla eristettyjen puskurissa kaksi viikkoa säilyneiden näytteiden ja nolla päivää säilyneiden näytteiden PCR-monistuskäyrät. Kaksi viikkoa säilyneet näytteet monistuivat suurimmalla solumäärällä noin 1,3 sykliä, toiseksi suurimmalla 1,9 sykliä ja pienimmällä 4,4 sykliä myöhemmin kuin nolla päivää säilyneet näytteet.



Kuva 23. Guanidiinitiosyanaatti-puskurissa kaksi viikkoa säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteiden ja nolla päivää säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteiden PCR-monistuskäyrät solumäärillä $1,2 \times 10^{13}$, $1,2 \times 10^{11}$ ja $1,2 \times 10^9$ eristettäessä.

Toisessa kokeessa tutkittiin guanidiinitiosyanaatti-puskurissa neljä viikkoa säilytettyjen magneettipartikkeleiden sitomiskykyä eristyksessä. Kuvassa 24 on esitetty kokeen PCR-monistuskäyrät, joista nähdään, että puskurissa neljä viikkoa säilyneiden näyttei-

den ja nolla päivää säilyneiden näytteiden välillä ei havaittu niin suurta eroa kuin aikaisemmassa kokeessa kaksi viikkoa säilyneiden näytteiden ja nolla päivää säilyneiden näytteiden välillä. Suurimmalla solumäärällä eristettäessä neljä viikkoa säilyneet näytteet monistuivat noin 0,76 sykliä aikaisemmin kuin nolla päivää säilyneet näytteet. Toiseksi suurimmalla solumäärällä eristettäessä neljä viikkoa säilyneet näytteet monistuivat jopa paremmin kuin nolla päivää säilyneet näytteet: noin 0,2 sykliä aikaisemmin. Kuitenkaan pienimmällä solumäärällä eristettäessä neljä viikkoa säilyneet näytteet eivät monistuneet ollenkaan.



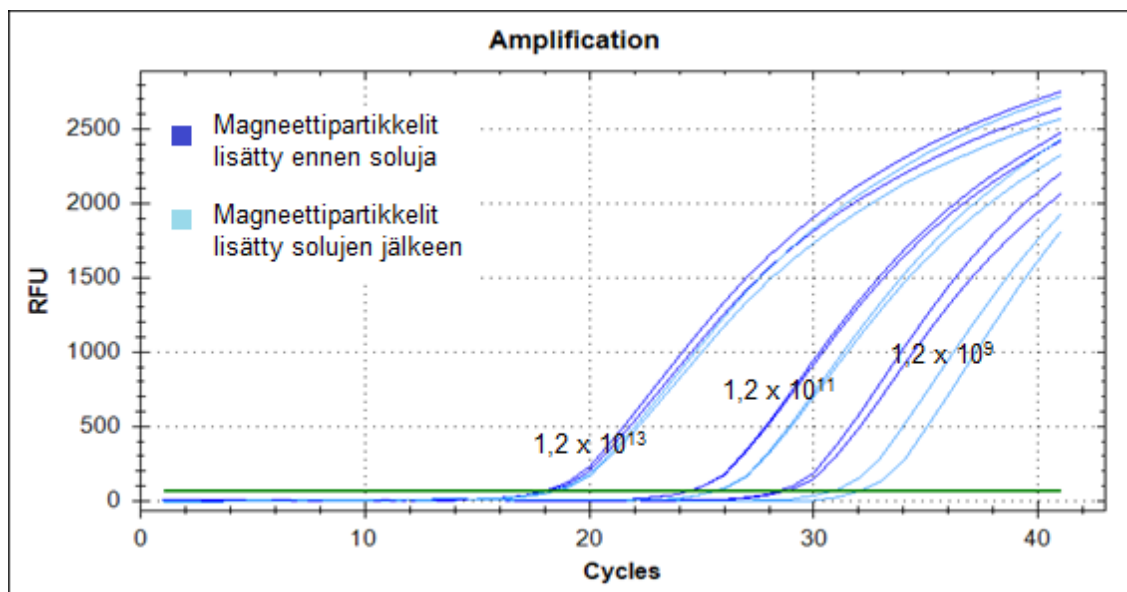
Kuva 24. Toisen kokeen guanidiinitiosyanaatti-puskurissa neljä viikkoa säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteiden ja nolla päivää säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteiden PCR-monistuskäyrät solumäärillä $1,2 \times 10^{13}$, $1,2 \times 10^{11}$ ja $1,2 \times 10^9$ eristettäessä.

Taulukosta 7 nähdään molempien kokeiden DNA-kopiomäärät ja C_T -arvot. Taulukosta nähdään, että jälkimmäisessä kokeessa monistuminen on ollut huomattavasti parempaa kaikilla solumäärillä eristettäessä. Ensimmäisen ja toisen kokeen välillä C_T -arvoja ei voi verrata toisiinsa.

Taulukko 8. Magneettipartikkeleiden säilyvyys -kokeiden DNA-kopiomäärät ja C_T-arvot.

| Solua/eristys | Ajankohta | DNA-kopiota/ μ l | | C _T -arvo | |
|-------------------------|-----------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | Ensimmäinen koe | Toinen koe | Ensimmäinen koe | Toinen koe |
| 1,24 x 10 ¹³ | 0 päivää | 296 150 | 11 541 571 | 18,195 | 20,344 |
| | 3 päivää | 138 300 | | 19,37 | |
| | 1 viikko | 82 930 | | 20,16 | |
| | 2 viikkoa | 128 950 | | 19,48 | |
| | 4 viikkoa | | 5 115 832 | | 21,1015 |
| 1,24 x 10 ¹¹ | 0 päivää | 4 814 | 7 364 | 24,54 | 27,258 |
| | 3 päivää | 2 418 | | 25,615 | |
| | 1 viikko | 1 710 | | 26,13 | |
| | 2 viikkoa | 1 369 | | 26,485 | |
| | 4 viikkoa | | 9 067 | | 27,054 |
| 1,24 x 10 ⁹ | 0 päivää | 321 | 545 | 28,715 | 29,6935 |
| | 3 päivää | 24 | | 32,68 | |
| | 1 viikko | 24 | | 32,735 | |
| | 2 viikkoa | 20 | | 33,125 | |
| | 4 viikkoa | | - | | - |

Ensimmäisessä kokeessa tarkoitus oli vielä vertailla, miten magneettipartikkeleiden lisääminen guanidiinitiosyanaatti-puskuriin ennen näytettä vaikuttaa eristymiseen. Kuvasta 25 nähdään näytteiden, joissa magneettipartikkelit on lisätty ennen soluja, monistuvan PCR:ssä paremmin kuin näytteiden, joissa partikkelit on lisätty vasta solujen jälkeen. Erot suurenevät pienempiä solumääriä käytettäessä. Ero on suurimmalla solumäärällä eristettäessä noin 0,3 sykliä, toiseksi suurimmalla noin 1,2 sykliä ja pienimmällä noin 2,9 sykliä.



Kuva 25. Magneettipartikkeleiden lisääminen guanidiinitiosyanaatti-puskuriin ennen soluja verrattuna magneettipartikkeleiden lisäämiseen vasta solujen jälkeen solumäärillä $1,2 \times 10^{13}$, $1,2 \times 10^{11}$ ja $1,2 \times 10^9$ eristettäessä.

Tulosten tarkastelu

Ensimmäisen kokeen tulosten mukaan DNA-saanto väheni, mitä kauemmin magneettipartikkelit olivat olleet guanidiinitiosyanaatti-puskurissa. Suurin ero oli guanidiinitiosyanaatti-puskurissa kaksi viikkoa säilyneiden magneettipartikkeleiden ja nolla päivää säilyneiden magneettipartikkeleiden näytteiden välillä. Eli kuten Boomin -menetelmän patentissa (Boom ym. 1993) todetaan, magneettipartikkeleiden sitomiskyky heikkenee, jos niitä säilytetään guanidiinitiosyanaatti-puskurissa. Toisessa kokeessa, jossa magneettipartikkeleita oli säilytetty puskurissa neljä viikkoa ja nolla päivää ei kuitenkaan havaittu yhtä suurta sitomiskyvyn heikkenemistä. Vertailtaessa ensimmäisen ja toisen kokeen tuloksia, tulee ottaa huomioon, että kokeet on tehty eri aikaan ja eri PCR-laitteella, mikä voi osaltaan vaikuttaa tuloksiin. Molempien kokeiden eristyksissä käytettiin kuitenkin samoja reagensseja ja samaa solususpensiota. Tulosten vaihtelevuudesta johtuen koe tulee jatkotutkimuksissa toistaa ja uusi koe on hyvä tehdä myös pidempää aikaväliä käyttäen.

Ensimmäisen kokeessa verrattiin myös kannattaako magneettipartikkelit lisätä guanidiinitiosyanaatti-puskuriin ennen näytettä vai näytteen jälkeen. Tulosten perusteella magneettipartikkelit kannattaa lisätä puskuriin jo ennen näytettä, mikä on myös Boomin menetelmässä käytetty toimintatapa (Boom ym. 1993). Kokeessa eristykset tehtiin kui-

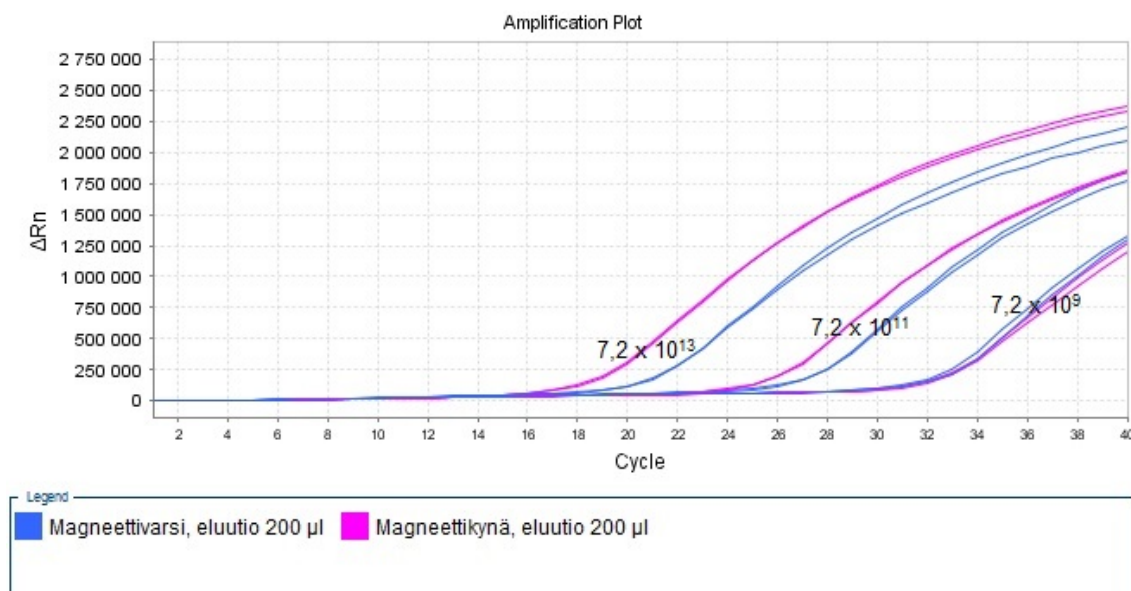
tenkin ilman näytemateriaalia käyttäen vain *B. pertussis* -soluja. Jatkotutkimuksissa sama koe tulee toistaa myös näytetikun ja näytemateriaalin kanssa.

8.6 Magneettivarren ja QuicPick™-magneettikynän vertailu

Kehitettävän menetelmän magneettivarren ja QuicPick™-magneettikynän vertailussa eristykset molemmilla magneeteilla tehtiin kolmella eri solulaimennoksella, joissa oli $7,2 \times 10^{13}$, $7,2 \times 10^{11}$ ja $7,2 \times 10^9$ solua/eristys. Eristyksissä ensin käytetyn eluutiotilavuuden 100 µl huomattiin olevan liian vähäinen, sillä QuicPick™-magneettikynän kärki ei mahtunut Eppendorf-putken pohjaan asti. Jotta varmistuttiin, että eluutiotilavuus ei vaikuta tuloksiin, eristykset tehtiin vielä käyttäen suurempaa eluutiotilavuutta 200 µl.

Tulokset

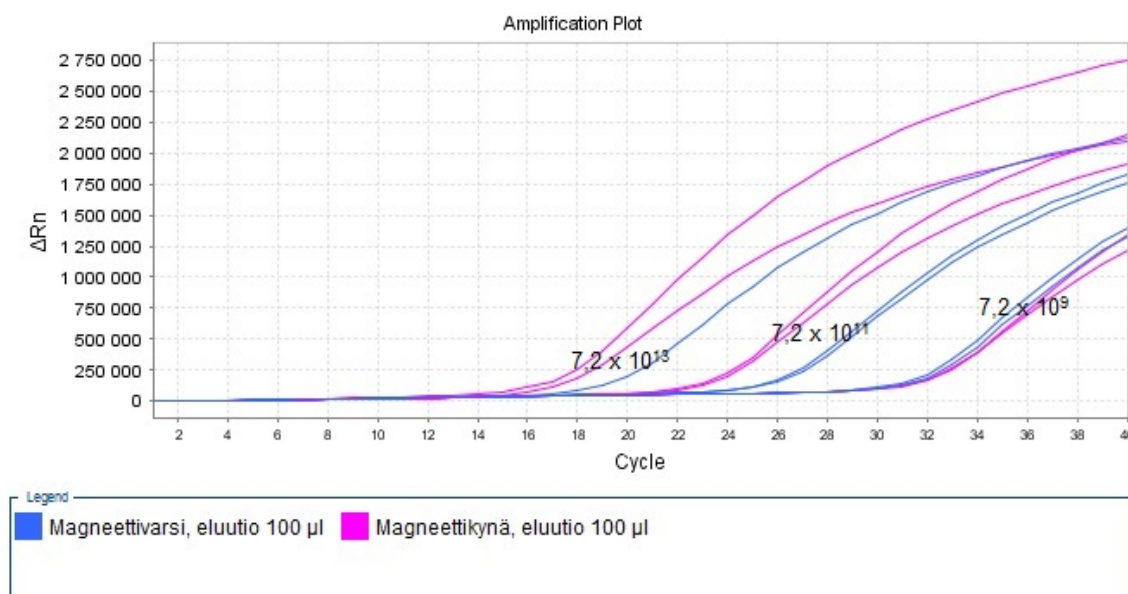
Kokeessa ei ollut kvantitaatiota mukana, joten tuloksia vertaillaan monistuskäyrien C_T -arvojen avulla. Kuvasta 26 nähdään magneettivarren ja QuicPick™-magneettikynän vertailukokeen PCR-monistuskäyrät eluutiotilavuudella 200 µl. Suurempia solumääriä eristettäessä monistuminen on parempaa magneettikynällä eristetyillä näytteillä. Ero tasaantuu pienempiä solumääriä käytettäessä.



Kuva 26. Magneettivarren ja QuicPick™-magneettikynän vertailukokeen PCR-monistuskäyrät solumäärillä $7,2 \times 10^{13}$, $7,2 \times 10^{11}$ ja $7,2 \times 10^9$ ja eluutiotilavuudella 200 µl eristettäes-

sä. Suuremmilla solumäärillä eristettäessä monistuminen on parempaa magneettikynällä eristetyillä näytteillä. Ero tasaantuu pienempiä solumääriä käytettäessä.

Tulokset olivat samansuuntaisia myös eluutiotilavuudella 100 µl. Erot magneettivarren ja magneettikynän välillä ovat suurempia, mitä enemmän soluja on käytetty (kuva 27). Koska tulokset olivat samansuuntaisia molemmilla eluutiotilavuuksilla, nähdään, että magneettikynällä eristettäessä eluutiotilavuus 100 µl ei ollut liian alhainen.



Kuva 27. Magneettivarren ja QuicPick™-magneettikynän vertailukokeen PCR-monistuskäyrät solumäärillä $7,2 \times 10^{13}$, $7,2 \times 10^{11}$ ja $7,2 \times 10^9$ ja eluutiotilavuudella 100 µl eristettäessä. Suuremmilla solumäärillä eristettäessä monistuminen on parempaa magneettikynällä eristetyillä näytteillä. Ero tasaantuu pienempiä solumääriä käytettäessä.

Taulukosta 8 nähdään magneettivarren ja magneettikynän C_T -arvojen erot eluutiotilavuuksilla 200 µl ja 100 µl. Magneettikynä on molemmilla eluutiotilavuuksilla ja suurimmalla solumäärällä tehokkaampi kuin kehitettävän menetelmän magneettivarsi. Pienimmällä solumäärällä magneettikynä ja magneettivarsi ovat kuitenkin yhtä tehokkaita, magneettivarsi jopa hieman tehokkaampi.

Taulukko 9. Magneettivarren ja QuicPick™-magneetikynän vertailukokeen C_T-arvot.

| | Soluja/eristys | Magneettivarsi C _T | Magneetikynä C _T | Ero C _T |
|----------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Eluutio 200 µl | 7,2 x 10 ¹³ | 21 | 18,92 | 2,08 |
| | 7,2 x 10 ¹¹ | 27,2 | 25,6 | 1,6 |
| | 7,2 x 10 ⁹ | 32,34 | 32,61 | -0,27 |
| Eluutio 100 µl | 7,2 x 10 ¹³ | 19,83 | 17,61 | 2,22 |
| | 7,2 x 10 ¹¹ | 26,24 | 23,66 | 2,58 |
| | 7,2 x 10 ⁹ | 31,77 | 32,14 | -0,37 |

Tulosten tarkastelu

Vaikka magneettivarsi eristikin kokeessa suurempia solumääriä huonommin kuin kaupallinen magneetikynä, on magneettivarsi ominaisuuksiltaan tarpeeksi hyvä eristämään kliinisesti merkittäviä *B. pertussis* -solumääriä, jotka ovat pienempiä kuin 10⁹ solua/näyte (Nakamura 2010). Täten voidaan katsoa, että kehitettävässä menetelmässä käytetty magneettivarsi on tarpeeksi tehokas kyseiseen sovellukseen. Magneetikynän kärki on pinta-alaltaan suurempi kuin kehitettävän menetelmän magneettivarsi, mikä voi osaltaan selittää magneetikynän magneetin parempaa tehokkuutta eristettäessä suurempia solumääriä. Myös magneetikynän kärjen muovimateriaali on eri kuin kehitettävän menetelmän magneettivarren materiaali. Kuvasta 28 nähdään magneettipartikkeleiden sitoutuminen QuicPick™-magneetikynän kärkeen.



Kuva 28. Magneettipartikkeleiden sitoutuminen QuicPick™-magneetikynän kärkeen.

8.7 Näytteenkäsittelymenetelmän testialustan suunnittelu

Insinööriyön toisena osa-alueena oli uuden eristysmenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu ja käytettävyyden testaus. Suunnittelun apuna käytettiin 3D-mallien piirtämistä Autocadin 123D-ohjelmalla ja suunnitelmat tulostettiin Stratasys Mojo® 3D-tulostimella. Orion Diagnostica asetti visuaalisen ilmeen ja käytettävyyden suunnittelua varten vaatimukset, jotka tulivat toteutua näytteenkäsittelymenetelmän protokollan toimivuuden ja testialustan käytettävyyden kannalta.

Testialustasta suunniteltiin useita versioita Orion Diagnostican vaatimusten ja näytteenkäsittelymenetelmällä eristämisestä saatujen omien kokemusten pohjalta. Työssä suunniteltuja testialustaversioita ja näytteenkäsittelymenetelmän protokollan toimivuudelle ja testialustan käytettävyydelle asetettuja vaatimuksia ei voida työssä julkaista. Työssä kehitetyn testialustan viimeisintä versiota pidettiin optimaalisimpana eristysprotokollan kannalta ja sitä tullaan käyttämään Orion Diagnosticalla lopullisen tuotteen jatkokehitykseen. Oikeaa eristystä testialustan viimeisimmällä versiolla tulee vielä jatkokokeuksissa kokeilla, jotta selviäisi sen toimivuus käytännössä.

9 Yhteenveto

Insinööriyön tarkoituksena oli kehittää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitysvaiheessa olevaa uutta nukleiinihappojen eristykseen tarkoitettua näytteenkäsittelymenetelmää *Bordetella pertussis* -bakteerin eristämiseen. Tavoitteena oli kehittää menetelmää niin, että sillä saataisiin suurin mahdollinen DNA-saanto. Tarkoitus oli myös tutkia miten tyypillinen *B. pertussis* -näyte, nenäsivelynäyte, vaikuttaa DNA:n eristämiseen ja PCR:ään kehitettävällä menetelmällä. Työssä näytteenkäsittelymenetelmän kehittämiseksi tehtyjen kokeiden perusteella saatiin Orion Diagnosticalle hyviä ja arvokkaita tuloksia, joista tehdyt johtopäätökset sekä jatkotutkimusehdotukset on esitetty tässä kappaleessa ja tiivistetty taulukkoon 10.

Insinööriyön toisena osa-alueena oli kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän testialustan visuaalisen ilmeen suunnittelu ja käytettävyyden testaus. Testialustaa suunniteltiin ottaen huomioon Orion Diagnostican sille asettamat vaatimukset. Kehitettyä testialustaa tullaan käyttämään Orion Diagnosticalla lopullisen tuotteen jatkokehitykseen. Oikeaa eristystä testialustan viimeisimmällä versiolla tulee vielä jatkotutkimuksissa kokeilla, jotta selviäisi sen toimivuus käytännössä.

Tämän insinööriyön kokeellisen osuuden aikana Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä toteutettiin lisäksi kaksi muutakin aihepiiriltään samankaltaista insinööriyötä: ”Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rinovirukselle” (Elf 2015) sekä ”Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rotavirukselle” (Liikonen 2015). Vaikka kunkin työ oli itsenäinen ja kunkin patogeenin näytteenkäsittelymenetelmän kehitykseen sisältyi toisistaan poikkeavia työvaiheita, sivusivat työt kuitenkin aiheiltaan toisiaan. Kahden muun insinööriyön tulokset tukivat tämän insinööriyön tuloksia. Näitä olivat esimerkiksi kehitettävän menetelmän ja kaupallisen Qiagen EZ1 Advance -eristysmenetelmän vertailusta saadut tulokset.

9.1 Johtopäätökset

Kokeiden perusteella uuden näytteenkäsittelymenetelmän todettiin toimivan *Bordetella pertussis* -bakteerille. Menetelmän DNA-saantoa tulee kuitenkin huomattavasti vielä parantaa, sillä menetelmällä ei tällä hetkellä saada eristettyä niin pieniä bakteerimääriä

kuin *B. pertussis* -nenänielunäytteissä tyypillisesti on. Tutkittaessa näytemateriaalina olevan nenäsivelynäytteen vaikutusta eristykseen, todettiin näytemateriaalina olevan nenäliman inhibiittoreiden pienentävän DNA-saantoa. Kokeessa käytettyä näytemateriaalia ei kuitenkaan voida suoraan verrata oikeaan *B. pertussis* -nenänielutikkunäytteeseen.

Vertailumenetelmään, Qiagenin EZ1 Advanced XL:ään, verrattuna kehitettävällä menetelmällä ei päästy yhtä hyviin DNA-saantoihin eristettäessä suuria *B. pertussis* -solumääriä, mutta pieniä solumääriä eristettäessä menetelmillä päästiin lähes yhtä hyviin saantoihin. Verrattaessa kehitettävän menetelmän magneettivartta kaupalliseen QuicPick™-magneetikynään oli magneettivarsi tulosten perusteella yhtä tehokas eristettäessä kliinisesti merkittäviä bakteerimääriä.

Kokeiden perusteella kehitettävän menetelmän DNA-saantoa vähentää pesupuskureihin, erityisesti natriumkloridia sisältävään toiseen pesupuskuriin, jäävä DNA-määrä. Pesupuskureiden optimointikokeessa tutkittujen pesuvaihtoehtojen välillä ei havaittu suuria eroja. Parhaaseen DNA-saantoon päästiin kuitenkin kokeessa kokeillulla pesuvaihtoehdolla 1. Tuotekehityksestä lähtöisin oleva pesutapa on mahdollista korvata kyseisellä pesutavalla DNA-saannon parantamiseksi.

Tutkittaessa magneettipartikkeleiden säilyvyyttä kehitettävän menetelmän guanidiinitiosyanaatti-puskurissa magneettipartikkeleiden sitomiskyvyn havaittiin heikkenevän erityisesti pienillä solumäärillä eristettäessä. Magneettipartikkeleita todennäköisesti voidaan säilyttää puskurissa, mutta niiden sitomiskyky heikkenee. Samassa kokeessa havaittiin myös, että ainakin ainoastaan *B. pertussis* -soluja eristettäessä, magneettipartikkelit on hyvä lisätä aikaisemmasta poiketen guanidiinitiosyanaattiin jo ennen näyttettä.

9.2 Jatkotutkimukset

Uuden näytteenkäsittelymenetelmän tuotekehitys jatkuu Orion Diagnosticalla. Jatkotutkimuksissa kehitettävän menetelmän DNA-saannon varmistamiseksi tulee käytetyn solususpension tarkempi solumäärä selvittää. Nenäsivelynäytteen inhibiittoreiden vaikutusta tulee kokeilla oikeilla nenänielunäytteillä, joissa näytemateriaalin määrä on todennukaisempi kuin työssä käytetyllä nenälimanäytteellä.

Jatkotutkimuksissa on hyvä keskittyä menetelmän pesupuskureiden kehittämiseen, jotta puskureihin eluoituva DNA-määrä vähenisi ja DNA-saanto parantuisi. Jokaiseen kehitettävän menetelmän puskuriin jäävä tarkka DNA-määrä tulee selvittää. Tässä työssä tehty pesupuskureiden optimointi -koe tulee uusina ja lisäksi kokeilla vielä muita pesuvaihtoehtoja. Erilaisia pesutapoja kokeiltaessa on hyvä mitata, kuinka paljon eluutiopuskuriin kulkeutuu eristysprotokollan muita komponentteja: guanidiinitiosyanaattia, etanolia ja suolaa sekä kuinka paljon eluutiopuskuri sisältää muita epäpuhtauksia kuten proteiinijäämiä.

Magneettipartikkeleiden säilyvyys -koe tulee toistaa tämän työn vaihtelevista tuloksista johtuen. Koe tulee tehdä pitemmällä aikavälillä, jotta varmistutaan, kuinka pitkä säilytysaika guanidiinitiosyanaatti-puskurissa huonontaa merkittävästi magneettipartikkeleiden sitomiskykyä. Jos kehitettävässä menetelmässä päädytään säilyttämään magneettipartikkeleita guanidiinitiosyanaatti-puskurissa, näyte tulee aikaisemmasta poiketen lisätä vasta magneettipartikkeleiden jälkeen. Tämä näyttää olevan kokeiden perusteella mahdollista ainakin eristettäessä ainoastaan soluja ilman näytemateriaalia. Koe tulee kuitenkin toistaa tilanteessa, jossa nenänielunäytetikku on mukana.

Taulukko 10. Insinööriyössä tehtyjen kokeiden johtopäätökset ja jatkotutkimusehdotukset.

| Koe | Johtopäätökset | Jatkotutkimukset |
|---|--|--|
| Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään | Vertailumenetelmään verrattuna kehitettävällä menetelmällä ei päästä yhtä hyvään DNA-saantoon. Lähes yhtä hyvään DNA-saantoon päästään kuitenkin pieniä <i>B. pertussis</i> -solumääriä eristettäessä. DNA-saantoa on parannettava, jotta kliinisesti merkittävien bakteerimäärien eristäminen on mahdollista. | DNA-saannon varmistamiseksi käytetyn solususpension tarkemman solumäärän selvittäminen. |
| Kehitettävän eristysmenetelmän puskurien DNA-jäännökset | Kehitettävän menetelmän huonon DNA-saannon yksi syy on natriumkloridia sisältävään toiseen pesupuskuriin eluoituva DNA-määrä. | Menetelmän pesupuskureiden kehittäminen. Työssä tehdyn kokeen toisto kvantitaation kanssa. |
| Nenäsvilynäytteen inhibiittoreiden vaikutus | Näytemateriaalina olevan nenäliiman inhibiittorit pienentävät DNA-saantoa. | Inhibiittoreiden vaikutuksen kokeilu oikeilla nenälielunäytteillä. |
| Pesupuskureiden optimointi | Tutkittujen pesuvaihtoehtojen välillä ei havaittu suuria eroja. Parhaaseen DNA-saantoon päästiin kuitenkin kokeessa kokeillulla pesuvaihtoehdolla 1. | Pesupuskureiden optimointi - kokeen toisto ja uusien pesuvaihtoehtojen kokeilu. |
| Magneettipartikkeiden säilyvyys | Magneettipartikkeleiden sitomiskyvyn havaittiin heikkenevän erityisesti pienillä solumäärillä eristettäessä. | Tässä työssä tehdyn kokeen toisto pitemmällä aikavälillä. |
| Magneettivarren ja QuicPickTM-magneettikynän vertailu | Kehitettävässä menetelmässä käytettävä magneettivarsi on yhtä tehokas kliinisesti merkittävien bakteerimäärien eristämiseen verrattuna magneettikynään. | - |

Lähteet

Aygan, Ashabil. 2005. Nucleic Acid Extraction from Clinical Specimens for PCR Applications. Turkish Journal of Biology. Vol. 30 2006 s. 107–120.

Bio-Nobile. QuickPick™ technology. Verkkodokumentti. <http://www.bionobile.com/magnetic_purification.html>. Luettu 28.3.2015.

Berensmeier, Sonja. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 73(3), Dec. 2006 s. 495–504.

Boom, W. R., Adriaanse, H. M. A., Kievits, T. & Lens, P. F. 1993. Pat. US5234809 A. Process for isolating nucleic acid. Hak. US 07/728,007, 1.7.1991. Julk. 10.8.1993. Verkkodokumentti. <<https://www.google.com/patents/US5234809>>. Luettu 3.4.2015.

Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E. & van der Noordaa, J. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. Journal of Clinical Microbiology. Mar. 1990 s. 495–503.

Cloud, J. L., Hymas, W. & Carroll, K. C. 2002. Impact of Nasopharyngeal Swab Types on Detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40(10), Oct. 2002 s. 3838–3840.

Dalby, T., Krogfelt, K. A., Wirsing von König, C. H., Guiso, N., Guillot, S., Fry, N & He, Q. 2012. Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*. Technical document. European Centre for Disease Prevention and Control. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Guidance-protocol-PCR-laboratory-diagnosis-bordatella-pertussis-parapertussis.pdf>>. Luettu 3.1.2015.

Elf, Sonja. 2015. Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rinovirukselle. Insinööriyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

EpsHP. Kliinisen mikrobiologian ohjekirja. Verkkodokumentti. <http://www.epshp.fi/1/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_mikrobiologia/ohjekirja/tutkimuskohtaiset_ohjeet>. Luettu 6.1.2015.

Fimlab laboratoriot Oy. Ohjekirja. Verkkodokumentti. <http://www.fimlab.fi/lake/ohjekirja/index.tml?sivu_id=194>. Luettu 6.1.2015

Finger, Horst & Wirsing von Koenig, Carl Heinz. 1996. *Bordetella*. Teoksessa Baron, Samuel. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston.

Grüttner, C., Rudershausen, S. & Teller, J. 2001. Improved properties of magnetic particles by combination of different polymer materials as particle matrix. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 225(1), Apr. 2001 s. 1–7.

Guiso, Nicole. 2007. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. Laboratory manual. World Health Organization. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.14_eng.pdf>. Luettu 5.1.2015.

Herzer, Sibylle. 2002. DNA purification. Teoksessa Gerstein, Alan S. *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*. New York: John Wiley & Sons, Inc: 167–195.

Himmelreich, R. & Werner, S. 2012. Pat. US4683195. A Method For Isolating And Purifying Nucleic Acids. Hak. US 13/061,916, 2.9.2009. Julk. 24.5.2012. Verkkodokumentti. <<http://www.google.com/patents/US20120130061>>. Luettu 23.3.2015.

Hulkko, T., Lyytikäinen, O., Kuusi, M., Seppälä, S. & Ruutu, P. (toim.). 2010. Tartuntataudit Suomessa 1995–2009. Raportti 17/2010. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos. Helsinki: Yliopistopaino. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/80321/a4c2f994-438c-4f3e-9d72-7d0bf17f551c.pdf?sequence=1>>. Luettu 23.3.2015.

Huslab. Tutkimusohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/>>.

Islab. Web-ohjekirja. Verkkodokumentti.
<<https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp>>. Luettu 6.1.2015.

Jaakola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Savolainen-Kopra, C., Pirhonen, J., Vuopio, J., Jalava, J., Toropainen, M., Nohynek, H., Toikkanen, S., Löflund, J., Kuusi, M. & Salminen, M (toim.). 2014. Raportti 16/2014. Terveystieteiden tutkimuskeskus. Tampere: Juvenes Print – Suomen yliopistopaino Oy. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/116198/URN_ISBN_978-952-302-190-7.pdf?sequence=1>. Luettu 23.3.2015.

Korkeila, Maija. 2014. Sairaalamikrobiologi. Etelä-Karjalan keskussairaala. Lappeenranta. Sähköpostiviesti 18.12.2014.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Björn, S., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. Vol. 27(2–3), Apr–Jun. 2006 s. 95–125.

Life technologies. PCR & RT-PCR Overview. Verkkodokumentti.<<https://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/protocols/nucleic-acid-amplification-and-expression-profiling/pcr-protocol/pcr-and-rt-pcr.html>>. Luettu 1.4.2015.

Liikonen, Karoliina. 2015. Uuden nukleinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rotavirukselle. Insinööriyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Loeffelholz, Michael. 2012. Towards Improved Accuracy of *Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 50(7), Jul. 2012 s. 2186–2190.

Maurin, Max. 2012. Real-time PCR as a Diagnostic Tool for Bacterial Diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Vol. 12(7), Sep. 2012 s. 731–754.

Ménard, A., Lehours, P., Sarlangue, J., Bébéar, C., Mégraud, F. & de Barbeyrac B. 2006. Development of a real-time PCR for the identification of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 13(4), Apr. 2007 s. 419–423.

Mertsola, Jussi & He, Qiushui. 2010. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M (toim.). *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Mikrobiologia*. Helsinki: Duodecim: 170–176.

Mullis, K., Erlich, H., Arnheim, N., Horn, G., Saiki, R. & Scharf, S. 1987. One of the first Polymerase Chain Reaction (PCR) patents. Pat. US 4683195 A. Hak. US 06/828,144, 7.7.1986. Julk. 28.7.1987. Verkkodokumentti. <<http://google.com/patents/US4683195>>. Luettu 15.3.2015.

NFSTC Science Serving. 2015. SYBR[®] Green Detection Method. Verkkodokumentti. Justice. <http://projects.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm>. Luettu 9.4.2015.

Nordlab. Tutkimusvalikoima. Verkkodokumentti. <<http://www.oyslab.fi/>>.

Nakamura, Y., Kamachi, K., Toyozumi-Ajisaka, H., Otsuka, N., Saito, R., Tsuruoka, J., Katsuta, T., Nakajima, N., Okada, K., Kato, T. & Arakawa, Y. 2010. Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 17(3), Mar. 2011 s. 365–370.

Phsotey. Laboratoriotutkimukset - mikrobiologia. Verkkodokumentti. <<http://www.phsotey.fi/sivut/sivu.php?id=3146&vy=4010&ryhma=444>>. Luettu 6.1.2015

Qiagen. 2011. EZ1[®] DNA Tissue Kit Handbook. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=4c45d35b-10d8-4d5b-a3a7-88e29ab1d88f&lang=en>>. Luettu 23.3.2015.

Qiagen. 2012. QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>>. Luettu 23.3.2015.

Reischl, U., Lehn, N., Sanden, G. N. & Loeffelholz, M. J. 2001. Real-Time PCR Assay Targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and Molecular Basis for Detecting *Bordetella holmesii*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39(5), May. 2001 s. 1963–1966.

Riffelmann, M., Wirsing von König, C. H., Caro, V. & Guiso, N. 2005. Nucleic Acid Amplification Tests for Diagnosis of *Bordetella* Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43(10), Oct. 2005 s. 4925–4929.

Riffelman, M., Krefeld, K., Wirsing von König, C. H., Krefeld, K & Xing, D. 2012. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Technical document. European Centre for Disease Prevention and Control. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <
<https://www.thl.fi/documents/533963/1449651/Pertussis+toksiini+IgG-ELISA.pdf/9e963f9b-4322-4bdf-a32c-0f358c0d96d6>>. Luettu 4.1.2015.

Roche Applied Science. 2008. High Pure PCR Template Preparation Kit. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <
http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05204933001_03.08.pdf>. Luettu 23.3.2015.

Roche diagnostics. 2012. MagNA Pure 96 Instrument. Brochure. Luettavissa myös sähköisesti osoitteesta <
https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/06762069001_06.12.pdf>. Luettu 4.4.2015.

Saiyed, Z. M., Telang, S. D. & Ramchand, C. N. 2003. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *BioMagnetic Research and Technology Sep.* 2003.

Satadiag. Tutkimusohjekirja. Verkkodokumentti. <ohjekirja.satadiag.fi/>.

Sun, N., Deng, C., Liu, Y., Zhao, X., Tang, Y., Liu, R., Xia, Q., Yan, W. & Ge, G. 2013. Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1325(31), Jan. 2014 s. 31–39.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.

Tan, Siun Chee & Yiap, Beow Chin. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Journal of Biomedicine and Biotechnology Nov. 2009.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2013. Hinkuyskä. Verkkodokumentti. <<http://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/hinkuyska>>. Päivitetty 18.2.2013. Luettu 17.1.2015.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2015. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta. Verkkodokumentti. <<http://www.thl.fi/ttr/gen/rpt/tilastot.html>>. Päivitetty 28.1.2015. Luettu 3.2.2015.

Tykslab. Ohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/>>. Luettu 6.1.2015.

Utlab. Ohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utlab/ohjekirja/Sivut/home.aspx#R>> Luettu 6.1.2015

Vshp. Laboratorio-ohjekirja. Verkkodokumentti. <<http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/AAKKOSLISTA.HTM>>. Luettu 6.1.2015.

World Health Organization. 2011. Pertussis. Verkkodokumentti. <<http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/>>. Päivitetty 21.6.2011. Luettu 17.1.2015.

Wubin Qu & Chenggang Zhang. MFEprimer-2.0. Verkkodokumentti. <<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/>>. Luettu 5.2.2015.

Yang, Samuel & Rothman, Richard. 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. The Lancet Infectious Diseases. Vol. 4(6), Jun. 2004 s. 337–348.

Yhtyneet Medix laboratoriot. Laboratoriokäsikirja. Verkkodokumentti. <
http://www.medix.fi/tuotekuvaus_show.php>. Luettu 6.1.2015.

Liite 1. *Bordetella pertussis*in diagnosoitimenetelmät

Taulukko 1. Lyhenne/numero, tutkimus ja menetelmä.

| Laboratorio | Lyhenne/numero | Tutkimus | Menetelmä |
|----------------|------------------------------------|---|---|
| Huslab | -BopeVip (9441) | Bordetella pertussis, viljely ja nukleiinihapon osoitus | PCR, viljely erikoiselatusaineilla |
| Huslab | -BobeAb (2471) | Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Tykslab | -S-PDTAb (230) | S-Pertussis, difteria, tetanus, vasta-aineet | Entsyymi-immunologinen (EIA) |
| Tykslab | -BopeVi (2472) | Bordetella pertussis, viljely | Bakteeriviljely, tunnistus spesifisillä vasta-aineilla |
| Tykslab | -S-BobeAb (2471) | S-Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Tykslab | -BopeNhO (4345) | Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus (PCR) | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| Fimlab | -RBaktNhO (9877) | Respiratoristen bakteereiden nukleiinihaponosoitus | Multiplex-polymeraasiketjureaktio (multiplex-PCR) |
| Fimlab | -S-BopeAb (2471) | Bordetella Pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Fimlab | -BopeVi (2472) | Bordetella Pertussis, Viljely | Viljely hinkumaljalle |
| Satadiag | -S-PDTAb (230) | PDT,vasta-aineet (pertussis,difteria,tetanus), seerumista | Entsyymi-immunologinen (EIA) |
| Satadiag | -BopeVi (2472) | Bordetella pertussis, viljely | Bakteeriviljely, tunnistus spesifisillä vasta-aineilla |
| Satadiag | -S-BobeAb (2471) | S-Bordetella pertussis, vasta-aineet, seerumista | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Satadiag | -BopeNhO (4345) | Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| Islab | -BopeVi (2472) | Bordetella pertussis, viljely | Erikoisbakteeriviljely |
| Islab | -S-BopeAb (2471) | S-Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Islab | -BopeNhO (4345) | Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus (PCR) | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| Nordlab/Oyslab | -S-BopeAb (2471) | Bordetella pertussis, vasta-aineet, seerumista | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Nordlab/Oyslab | -BopeViP (8358) | Bordetella pertussis, viljely ja nukleiinihapon osoitus, | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| epshp | -BopeNhO (4345) | Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus (kval) | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| epshp | -BopeVip (9104) | Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus ja viljely | Viljely selektiiviselle erikoiselatusaineelle sekä PCR |
| epshp | -BobeAb (2471) | Bordetella pertussis, vasta-aineet seerumista | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| vshp | -BopeVi (2472) | Bordetella pertussis viljely | Bakteeriviljely ja tunnistus spesifisillä vasta-aineilla |
| vshp | -BobeNhO (4345) | Bordetella pertussis, nukleiinihappo (kval) | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| vshp | -S-BopeAb (2471) | S -Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| phsotey | -S-BopeAb (2471) | Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| phsotey | -BopeVip (9441) | Bordetella pertussis, viljely ja nukleiinihapon osoitus | Viljely selektiiviselle erikoiselatusaineelle sekä PCR |
| Medix | -S-BopeAb (2471) | Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immunomenetelmä (EIA) |
| Eksote | -BopeVip (9441) | Bordetella pertussis, viljely ja nukleiinihapon osoitus | Näyte viljellään selektiiviselle erikoiselatusaineelle, PCR |
| Utulab | -BopeNhO (4345) | Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus | Polymeraasiketjureaktio (PCR) |
| Utulab | -S-BopeAb (2471), S-BopeAbG (3312) | Bordetella pertussis, vasta-aineet | Entsyymi-immomenetelmä (EIA) |
| Utulab | -BopeVi (2472) | Bordetella pertussis, viljely | Bakteeriviljely, tunnistus spesifisillä vasta-aineilla |

Taulukko 2. Tuloksen saamiseen kuluva aika, indikaatio, näytemateriaali.

| Laboratorio | Tuloksen saamiseen kuluva aika | Indikaatio | Näytemateriaali |
|----------------|---|--|---|
| Huslab | Viikon aikana | Hinkuuskän diagnostiikka | Nenänielunäyte |
| Huslab | 4-8 työpäivää | Hinkuvan tai muutoin voimakkaan yskän syyn selvittäminen | 0,5 ml seerumia. Pariseeruminäytteitä |
| Tykslab | - | Rokotusvasteen seuranta. Vasta-ainevälitteisen immuniteetin tutkiminen | 3 ml verta |
| Tykslab | Positiivinen n. 3 vrk:ssa, negatiivinen n. 1 vk | Hinkuuskän diagnostiikka, erityisesti pienillä lapsilla | Nenänielunäyte |
| Tykslab | n. 1 vk | Hengitystieinfektiot lapsilla ja aikuisilla | 3 ml verta |
| Tykslab | Seuraavana arkipäivänä | Hinkuuskän diagnostiikka erityisesti oireilun aikaisessa vaiheessa | Nenänielunäyte tai imulimanäyte |
| Fimlab | Seuraavana päivänä | Hengitystiebakteeri-infektion etiologian selvittäminen | Nenänielunäyte, nenänielun imulima tai |
| Fimlab | Kahden viikon kuluessa | Hinkuuskän epäily | 1 ml seerumia, alle yksivuotialta |
| Fimlab | 10 vrk:n kuluessa | Hinkuuskän epäily | Nenänielunäyte |
| Satadiag | 3-5 työpäivän kuluessa | Rokotusvasteen seuranta. Vasta-ainevälitteisen immuniteetin tutkiminen | 1 ml seerumia/4 ml verta |
| Satadiag | Positiivinen n. 4 vrk:ssa, negatiivinen n. 1 vk | Hinkuuskän diagnostiikka, erityisesti pienillä lapsilla | Nenänielunäyte |
| Satadiag | 5-9 työpäivän kuluessa | Hengitystieinfektiot lapsilla ja aikuisilla | 1 ml seerumia/4 ml verta |
| Satadiag | 1-2 työpäivän kuluessa | Hinkuuskän diagnostiikka erityisesti oireilun aikaisessa vaiheessa | Nenänielunäyte tai imulimanäyte |
| Islab | Viikon kuluessa | Hinkuuskän epäily | Nenänielunäyte |
| Islab | Kahden viikon kuluessa | Hengitystieinfektiot lapsilla ja aikuisilla | 1 ml seerumia |
| Islab | Noin viikon kuluessa | Hinkuuskän diagnostiikka erityisesti oireilun aikaisessa vaiheessa | Nenänielunäyte tai imulimanäyte |
| Nordlab/Oyslab | 4-8 työpäivää | Hinkuvan tai muutoin voimakkaan yskän syyn selvittäminen | 0,5 ml seerumia. Pariseeruminäytteitä |
| Nordlab/Oyslab | Viikon aikana | Hinkuuskän diagnostiikka | Nenänielunäyte |
| epshp | Näytteen saapumista seuraavana päivänä | Hinkuuskäepäily | Nenänielunäyte, nenänielun |
| epshp | Noin viikon kuluessa | Hinkuuskän diagnostiikka | unäyte, nenänielun imul |
| epshp | Noin viikon kuluessa | Hengitystieinfektiot lapsilla ja aikuisilla | 1 ml seerumia |
| vshp | Positiivinen n. 3 vrk:ssa, negatiivinen n. 1 vk | Pertussis epäily | Nenänielunäyte |
| vshp | Seuraavana arkipäivänä | - | Nenänielunäyte |
| vshp | 10 päivän kuluessa | Hinkuuskäepäily lapsilla ja aikuisilla | 1 ml seerumia, alle 6 kk ikäisiltä lapsilta |
| phsotey | Kerran viikossa | Hengitystieinfektiot | 2 ml verta/1 ml seerumia, alle yksi |
| phsotey | viikon aikana | Hinkuuskän diagnostiikka | Nenänielunäyte |
| Medix | 4 arkipäivää | Hinkuuskän diagnostiikka | 1 ml seerumia |
| Eksote | Viikon kuluessa | Hinkuuskän diagnostiikka | Nenänielunäyte |
| Utlab | Seuraavana arkipäivänä | - | Nenänielunäyte, nenänielun |
| Utlab | Viikon kuluessa | Hengitystieinfektiot lapsilla ja aikuisilla | 1 ml seerumia |
| Utlab | Positiivinen n. 3 vrk:ssa, negatiivinen n. 1 vk | Pertussis epäily | Nenänielunäyte |

Liite 2. PCR-ohjelma

Taulukko 1. Insinööriyössä käytetty PCR-ohjelma.

| | | Lämpötila, °C | Aika | Syklit |
|------------------|---|---------------|--------|--------|
| Alkudenaturaatio | | 95 | 10 min | 1 |
| PCR | 1 | 95 | 15 s | x 40 |
| | 2 | 60 | 1 min | |
| | 3 | 95 | 30 s | 1 |

(Ménard ym. 2006)

Liite 3. Kokeiden Raakadata

Taulukko 1. qPCR:n optimointi.

| Kaivo | Näyte | Aluke | C _T | C _T Ka |
|-------|-------|----------------|----------------|-------------------|
| A01 | Std-1 | F1-BP ja R1-BP | 11,65 | 11,605 |
| B01 | Std-1 | F1-BP ja R1-BP | 11,56 | 11,605 |
| C01 | Std-2 | F1-BP ja R1-BP | 14,8 | 14,815 |
| D01 | Std-2 | F1-BP ja R1-BP | 14,83 | 14,815 |
| E01 | Std-3 | F1-BP ja R1-BP | 18,02 | 18,05 |
| F01 | Std-3 | F1-BP ja R1-BP | 18,08 | 18,05 |
| G01 | Std-4 | F1-BP ja R1-BP | 21,36 | 21,4 |
| H01 | Std-4 | F1-BP ja R1-BP | 21,44 | 21,4 |
| A02 | Std-5 | F1-BP ja R1-BP | 25,33 | 25,23 |
| B02 | Std-5 | F1-BP ja R1-BP | 25,13 | 25,23 |
| C02 | Std-6 | F1-BP ja R1-BP | 28,44 | 28,335 |
| D02 | Std-6 | F1-BP ja R1-BP | 28,23 | 28,335 |
| E02 | NTC | F1-BP ja R1-BP | 36,23 | 36,135 |
| F02 | NTC | F1-BP ja R1-BP | 36,04 | 36,135 |
| A03 | Std-1 | BP-1 ja BP-2 | 8,88 | 8,885 |
| B03 | Std-1 | BP-1 ja BP-2 | 8,89 | 8,885 |
| C03 | Std-2 | BP-1 ja BP-2 | 13,88 | 13,665 |
| D03 | Std-2 | BP-1 ja BP-2 | 13,45 | 13,665 |
| E03 | Std-3 | BP-1 ja BP-2 | 17,23 | 17,015 |
| F03 | Std-3 | BP-1 ja BP-2 | 16,8 | 17,015 |
| G03 | Std-4 | BP-1 ja BP-2 | 20,41 | 20,46 |
| H03 | Std-4 | BP-1 ja BP-2 | 20,51 | 20,46 |
| A04 | Std-5 | BP-1 ja BP-2 | 24,46 | 24,28 |
| B04 | Std-5 | BP-1 ja BP-2 | 24,12 | 24,28 |
| C04 | Std-6 | BP-1 ja BP-2 | 27,53 | 27,56 |
| D04 | Std-6 | BP-1 ja BP-2 | 27,59 | 27,56 |
| E04 | NTC | BP-1 ja BP-2 | 35,32 | 35,21 |
| F04 | NTC | BP-1 ja BP-2 | 35,19 | 35,21 |

Taulukko 2. Standardisuora ja kvantitaatio.

| Kaivo | Näyte | C _T | C _T Ka | Starting Quantity (SQ) | SQ Ka |
|-------|--------|----------------|-------------------|------------------------|----------|
| A03 | Std-01 | 6,07 | 5,72 | 1,00E+09 | 1,00E+09 |
| B03 | Std-01 | 5,37 | 5,72 | 1,00E+09 | 1,00E+09 |
| C03 | Std-02 | 8,32 | 8,32 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| D03 | Std-02 | 8,33 | 8,32 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| E03 | Std-03 | 13,78 | 13,74 | 1,00E+07 | 1,00E+07 |
| F03 | Std-03 | 13,71 | 13,74 | 1,00E+07 | 1,00E+07 |
| G03 | Std-04 | 17,31 | 17,38 | 1,00E+06 | 1,00E+06 |
| H03 | Std-04 | 17,45 | 17,38 | 1,00E+06 | 1,00E+06 |
| A04 | Std-05 | 21,01 | 21,01 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| B04 | Std-05 | 21,01 | 21,01 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| C04 | Std-06 | 24,54 | 24,47 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| D04 | Std-06 | 24,4 | 24,47 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| E04 | Std-07 | 28,11 | 27,99 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| F04 | Std-07 | 27,87 | 27,99 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| G04 | Std-08 | 31,6 | 31,64 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| H04 | Std-08 | 31,68 | 31,64 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| A05 | Std-09 | 34,85 | 34,78 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| B05 | Std-09 | 34,7 | 34,78 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| C05 | Std-10 | 35,41 | 36,15 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| D05 | Std-10 | 36,89 | 36,15 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| A06 | Neg | 36,36 | 35,635 | 2,99E+00 | 2,99E+00 |
| B06 | Neg | 34,91 | 35,635 | 7,70E+00 | 7,69E+00 |
| C06 | Neg | 35,8 | 35,665 | 4,30E+00 | 4,30E+00 |
| D06 | Neg | 35,53 | 35,665 | 5,13E+00 | 5,13E+00 |
| E06 | Neg | 35,55 | 35,875 | 5,08E+00 | 5,08E+00 |
| F06 | Neg | 36,2 | 35,875 | 3,33E+00 | 3,33E+00 |
| G06 | Neg | 36,15 | 35,71 | 3,44E+00 | 3,44E+00 |
| H06 | Neg | 35,27 | 35,71 | 6,08E+00 | 6,08E+00 |
| A07 | Neg | 36,16 | 36,145 | 3,41E+00 | 3,41E+00 |
| B07 | Neg | 36,13 | 36,145 | 3,47E+00 | 3,47E+00 |
| C07 | NTC | 35,75 | 35,83 | N/A | N/A |
| D07 | NTC | 35,91 | 35,83 | N/A | N/A |

Taulukko 3. Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään, koe 1.

| Kaivo | Näyte | Solua/eristys | Cr | Cr ka | Quantity | Quantity Ka |
|-------|------------------------|---------------|-------|-------|----------|-------------|
| A1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+13 | 17,77 | 17,87 | 1,14E+06 | 1,06E+06 |
| B1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+13 | 17,97 | 17,87 | 9,80E+05 | 1,06E+06 |
| C1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+11 | 24,81 | 24,63 | 5,76E+03 | 6,67E+03 |
| D1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+11 | 24,45 | 24,63 | 7,58E+03 | 6,67E+03 |
| E1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+09 | 28,10 | 29,39 | 4,88E+02 | 2,79E+02 |
| F1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+09 | 30,68 | 29,39 | 7,05E+01 | 2,79E+02 |
| G1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+07 | 32,64 | 32,61 | 1,63E+01 | 1,66E+01 |
| H1 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+07 | 32,59 | 32,61 | 1,69E+01 | 1,66E+01 |
| A2 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+05 | 32,12 | 31,82 | 2,40E+01 | 3,09E+01 |
| B2 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+05 | 31,51 | 31,82 | 3,78E+01 | 3,09E+01 |
| C2 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+03 | 32,37 | 32,57 | 1,98E+01 | 1,73E+01 |
| D2 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+03 | 32,76 | 32,57 | 1,48E+01 | 1,73E+01 |
| E2 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+01 | 31,01 | 30,90 | 5,52E+01 | 6,01E+01 |
| F2 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+01 | 30,79 | 30,90 | 6,49E+01 | 6,01E+01 |
| A3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+13 | 14,81 | 14,76 | 1,05E+07 | 1,09E+07 |
| B3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+13 | 14,72 | 14,76 | 1,12E+07 | 1,09E+07 |
| C3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+11 | 21,74 | 21,56 | 5,79E+04 | 6,66E+04 |
| D3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+11 | 21,39 | 21,56 | 7,54E+04 | 6,66E+04 |
| E3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+09 | 29,01 | 28,87 | 2,47E+02 | 2,76E+02 |
| F3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+09 | 28,73 | 28,87 | 3,06E+02 | 2,76E+02 |
| G3 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+07 | 32,82 | 16,41 | 1,42E+01 | 1,42E+01 |
| A4 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+05 | 31,34 | 31,62 | 4,31E+01 | 3,57E+01 |
| B4 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+05 | 31,90 | 31,62 | 2,84E+01 | 3,57E+01 |
| C4 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+03 | 32,67 | 32,27 | 1,59E+01 | 2,24E+01 |
| D4 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+03 | 31,87 | 32,27 | 2,89E+01 | 2,24E+01 |
| E4 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+01 | 35,44 | 35,66 | - | - |
| F4 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+01 | 35,89 | 35,66 | - | - |
| A5 | Standard | | 11,44 | 11,44 | 1,00E+08 | |
| B5 | Standard | | 11,43 | 11,44 | 1,00E+08 | |
| C5 | Standard | | 14,59 | 14,73 | 1,00E+07 | |
| D5 | Standard | | 14,87 | 14,73 | 1,00E+07 | |
| E5 | Standard | | 18,05 | 18,02 | 1,00E+06 | |
| F5 | Standard | | 17,99 | 18,02 | 1,00E+06 | |
| G5 | Standard | | 21,00 | 21,03 | 1,00E+05 | |
| H5 | Standard | | 21,07 | 21,03 | 1,00E+05 | |
| A6 | Standard | | 24,47 | 24,34 | 1,00E+04 | |
| B6 | Standard | | 24,20 | 24,34 | 1,00E+04 | |
| C6 | Standard | | 27,84 | 27,69 | 1,00E+03 | |
| D6 | Standard | | 27,54 | 27,69 | 1,00E+03 | |
| E6 | Standard | | 30,73 | 30,80 | 1,00E+02 | |
| F6 | Standard | | 30,87 | 30,80 | 1,00E+02 | |
| G6 | Standard | | 32,68 | 32,81 | 1,00E+01 | |
| H6 | Standard | | 32,94 | 32,81 | 1,00E+01 | |
| A7 | Standard | | 35,24 | 35,86 | 1,00E+00 | |
| B7 | Standard | | 36,47 | 35,86 | 1,00E+00 | |
| C7 | Neg | | 35,95 | 35,31 | | |
| D7 | Neg | | 34,67 | 35,31 | | |
| E7 | NTC | | 35,08 | 34,86 | | |
| F7 | NTC | | 34,65 | 34,86 | | |

Taulukko 4. Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään, koe 2.

| Kaivo | Näyte | Solua/eristys | C _T | C _T Ka | Starting Quantity (SQ) | SQ Ka |
|-------|------------------------|---------------|----------------|-------------------|------------------------|----------|
| A01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+11 | 23,32 | 23,24 | 7,36E+03 | 7,83E+03 |
| B01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+11 | 23,15 | 23,24 | 8,30E+03 | 7,83E+03 |
| C01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+09 | 30,34 | 31,03 | 5,74E+01 | 3,97E+01 |
| D01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+09 | 31,72 | 31,03 | 2,21E+01 | 3,97E+01 |
| E01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+07 | 33,08 | 33,10 | 8,65E+00 | 8,53E+00 |
| F01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+07 | 33,12 | 33,10 | 8,40E+00 | 8,53E+00 |
| G01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+05 | 34,16 | 34,02 | - | - |
| H01 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+05 | 33,88 | 34,02 | - | - |
| A02 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+03 | 34,25 | 34,36 | - | - |
| B02 | Kehitettävä menetelmä | 1,24E+03 | 34,47 | 34,36 | - | - |
| C02 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+11 | 19,66 | 19,97 | 9,24E+04 | 7,66E+04 |
| D02 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+11 | 20,27 | 19,97 | 6,08E+04 | 7,66E+04 |
| E02 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+09 | 27,02 | 26,95 | 5,71E+02 | 5,99E+02 |
| F02 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+09 | 26,88 | 26,95 | 6,27E+02 | 5,99E+02 |
| G02 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+07 | 31,4 | 31,35 | 2,76E+01 | 2,87E+01 |
| A03 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+07 | 31,29 | 31,35 | 2,98E+01 | 2,87E+01 |
| B03 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+05 | 31,67 | 31,67 | 2,29E+01 | 2,29E+01 |
| C03 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+03 | 34,3 | 34,41 | - | - |
| D03 | Qiagen EZ1 Advanced XL | 1,24E+03 | 34,52 | 34,41 | - | - |
| A04 | Std-1 | | 19,29 | 19,19 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| B04 | Std-1 | | 19,08 | 19,19 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| C04 | Std-2 | | 22,93 | 23,02 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| D04 | Std-2 | | 23,11 | 23,02 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| E04 | Std-3 | | 26 | 26,07 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| F04 | Std-3 | | 26,13 | 26,07 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| G04 | Std-4 | | 30,06 | 30,10 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| H04 | Std-4 | | 30,13 | 30,10 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| A05 | Std-5 | | 33,5 | 33,43 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| B05 | Std-5 | | 33,35 | 33,43 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| C05 | Std-6 | | 34,69 | 34,69 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| E05 | Neg | | 35,09 | 34,95 | 2,15E+00 | 2,15E+00 |
| F05 | Neg | | 34,8 | 34,95 | 2,62E+00 | 2,62E+00 |
| G05 | NTC | | 34,54 | 34,21 | N/A | N/A |
| H05 | NTC | | 33,88 | 34,21 | N/A | N/A |

Taulukko 5. Kehitettävän eristysmenetelmän puskurien DNA-jäännökset.

| Kaivo | Näyte | C _T | C _T Ka |
|-------|---|----------------|-------------------|
| C1 | GuSCN ennen magneettipartikkeleita | 23,81 | 23,90 |
| D1 | GuSCN ennen magneettipartikkeleita | 23,99 | 23,90 |
| G1 | GuSCN ennen magneettipartikkeleita neg | 35,43 | 35,51 |
| H1 | GuSCN ennen magneettipartikkeleita neg | 35,59 | 35,51 |
| A2 | GuSCN ennen magneettipartikkeleita pos | 11,02 | 11,00 |
| B2 | GuSCN ennen magneettipartikkeleita pos | 10,98 | 11,00 |
| E2 | GuSCN magneettipartikkeleiden jälkeen | 26,41 | 26,26 |
| F2 | GuSCN magneettipartikkeleiden jälkeen | 26,12 | 26,26 |
| A3 | GuSCN magneettipartikkeleiden jälkeen neg | 35,92 | 35,53 |
| B3 | GuSCN magneettipartikkeleiden jälkeen neg | 35,14 | 35,53 |
| C3 | GuSCN magneettipartikkeleiden jälkeen pos | 11,19 | 11,11 |
| D3 | GuSCN magneettipartikkeleiden jälkeen pos | 11,04 | 11,11 |
| G3 | Pesu 1 | 31,65 | 31,97 |
| H3 | Pesu 1 | 32,28 | 31,97 |
| C4 | Pesu 1 neg | 35,70 | 35,54 |
| D4 | Pesu 1 neg | 35,39 | 35,54 |
| E4 | Pesu 1 pos | 11,28 | 11,29 |
| F4 | Pesu 1 pos | 11,30 | 11,29 |
| A5 | Pesu 2 | 28,09 | 28,10 |
| B5 | Pesu 2 | 28,12 | 28,10 |
| E5 | Pesu 2 neg | 36,25 | 35,53 |
| F5 | Pesu 2 neg | 34,80 | 35,53 |
| G5 | Pesu 2 pos | 10,76 | 10,75 |
| H5 | Pesu 2 pos | 10,75 | 10,75 |
| C6 | TE-puskuri | 24,19 | 24,00 |
| D6 | TE-puskuri | 23,82 | 24,00 |
| G6 | TE-puskuri neg | 35,67 | 35,47 |
| H6 | TE-puskuri neg | 35,28 | 35,47 |
| A7 | TE-puskuri pos | 11,22 | 11,17 |
| B7 | TE-puskuri pos | 11,12 | 11,17 |
| E9 | NTC | 35,16 | 35,36 |
| F9 | NTC | 35,56 | 35,36 |

Taulukko 6. Nenäsivelynäytteen inhibiittoreiden vaikutus.

| Kaivo | Näyte | soluen sisäys | Solua/eristys | C _T | C _T Ka |
|-------|-----------------|--------------------|---------------|----------------|-------------------|
| A01 | Nenänäyte | Näytetikon jälkeen | 1,24E+11 | 29,19 | 29,14 |
| B01 | Nenänäyte | Näytetikon jälkeen | 1,24E+11 | 29,09 | 29,14 |
| C01 | Nenänäyte | Näytetikkua ennen | 1,24E+11 | 27,37 | 27,63 |
| D01 | Nenänäyte | Näytetikkua ennen | 1,24E+11 | 27,89 | 27,63 |
| E01 | Nenänäyte | Näytetikon jälkeen | 1,24E+09 | 33,21 | 32,92 |
| F01 | Nenänäyte | Näytetikon jälkeen | 1,24E+09 | 32,62 | 32,92 |
| G01 | Nenänäyte | Näytetikkua ennen | 1,24E+09 | 32,32 | 32,44 |
| H01 | Nenänäyte | Näytetikkua ennen | 1,24E+09 | 32,55 | 32,44 |
| A02 | Nenänäyte | Näytetikon jälkeen | 1,24E+07 | 30,39 | 30,78 |
| B02 | Nenänäyte | Näytetikon jälkeen | 1,24E+07 | 31,17 | 30,78 |
| C02 | Nenänäyte | Näytetikkua ennen | 1,24E+07 | 35,94 | 35,12 |
| D02 | Nenänäyte | Näytetikkua ennen | 1,24E+07 | 34,29 | 35,12 |
| E02 | Ei nenänäytettä | Näytetikon jälkeen | 1,24E+11 | 25,90 | 26,06 |
| F02 | Ei nenänäytettä | Näytetikon jälkeen | 1,24E+11 | 26,21 | 26,06 |
| G02 | Ei nenänäytettä | Näytetikkua ennen | 1,24E+11 | 25,22 | 25,47 |
| H02 | Ei nenänäytettä | Näytetikkua ennen | 1,24E+11 | 25,72 | 25,47 |
| A03 | Ei nenänäytettä | Näytetikon jälkeen | 1,24E+09 | 30,95 | 31,01 |
| B03 | Ei nenänäytettä | Näytetikon jälkeen | 1,24E+09 | 31,06 | 31,01 |
| C03 | Ei nenänäytettä | Näytetikkua ennen | 1,24E+09 | 31,05 | 31,43 |
| D03 | Ei nenänäytettä | Näytetikkua ennen | 1,24E+09 | 31,81 | 31,43 |
| E03 | Ei nenänäytettä | Näytetikon jälkeen | 1,24E+07 | 35,05 | 35,07 |
| F03 | Ei nenänäytettä | Näytetikon jälkeen | 1,24E+07 | 35,08 | 35,07 |
| G03 | Ei nenänäytettä | Näytetikkua ennen | 1,24E+07 | 35,20 | 35,20 |
| H03 | Ei nenänäytettä | Näytetikkua ennen | 1,24E+07 | 35,19 | 35,20 |
| A04 | Nenänäyte | - | - | 35,14 | 35,23 |
| B04 | Nenänäyte | - | - | 35,32 | 35,23 |
| C04 | Ei nenänäytettä | - | 1,24E+09 | 31,90 | 31,53 |
| D04 | Ei nenänäytettä | - | 1,24E+09 | 31,16 | 31,53 |
| A05 | Standard | | | 5,58 | 5,62 |
| B05 | Standard | | | 5,67 | 5,62 |
| C05 | Standard | | | 12,65 | 12,60 |
| D05 | Standard | | | 12,56 | 12,60 |
| E05 | Standard | | | 16,44 | 16,32 |
| F05 | Standard | | | 16,20 | 16,32 |
| G05 | Standard | | | 19,80 | 19,87 |
| H05 | Standard | | | 19,94 | 19,87 |
| A06 | Standard | | | 23,67 | 23,58 |
| B06 | Standard | | | 23,49 | 23,58 |
| C06 | Standard | | | 27,08 | 27,07 |
| D06 | Standard | | | 27,07 | 27,07 |
| E06 | NTC | | | 34,89 | 34,83 |
| F06 | NTC | | | 34,76 | 34,83 |

Taulukko 7. Pesupuskureiden optimointi.

| Kaivo | Näyte | C _T | C _T Ka | Starting Quantity (SQ) | SQ Ka |
|-------|----------|----------------|-------------------|------------------------|----------|
| A01 | 1 | 27,31 | 27,27 | 3,12E+03 | 3,22E+03 |
| B01 | 1 | 27,23 | 27,27 | 3,32E+03 | 3,22E+03 |
| C01 | 2 | 32,85 | 33,10 | 5,99E+01 | 5,10E+01 |
| D01 | 2 | 33,34 | 33,10 | 4,20E+01 | 5,10E+01 |
| E01 | 3 | 26,59 | 26,46 | 5,23E+03 | 5,80E+03 |
| F01 | 3 | 26,32 | 26,46 | 6,37E+03 | 5,80E+03 |
| G01 | 4 | 32,50 | 32,55 | 7,69E+01 | 7,43E+01 |
| H01 | 4 | 32,59 | 32,55 | 7,17E+01 | 7,43E+01 |
| A02 | 5 | 28,72 | 28,63 | 1,15E+03 | 1,23E+03 |
| B02 | 5 | 28,53 | 28,63 | 1,31E+03 | 1,23E+03 |
| C02 | 6 | 34,89 | 34,60 | 1,40E+01 | 1,75E+01 |
| D02 | 6 | 34,31 | 34,60 | 2,10E+01 | 1,75E+01 |
| E02 | 7 | 27,06 | 27,07 | 3,74E+03 | 3,72E+03 |
| F02 | 7 | 27,08 | 27,07 | 3,69E+03 | 3,72E+03 |
| H02 | 8 | 33,71 | 33,71 | 3,22E+01 | 3,22E+01 |
| A03 | 9 | 27,50 | 27,48 | 2,72E+03 | 2,77E+03 |
| B03 | 9 | 27,45 | 27,48 | 2,82E+03 | 2,77E+03 |
| C03 | 10 | 35,10 | 34,40 | 1,20E+01 | 2,24E+01 |
| D03 | 10 | 33,69 | 34,40 | 3,28E+01 | 2,24E+01 |
| E03 | 11 | 26,33 | 26,27 | 6,29E+03 | 6,58E+03 |
| F03 | 11 | 26,21 | 26,27 | 6,88E+03 | 6,58E+03 |
| G03 | 12 | 34,40 | 33,40 | 1,98E+01 | 5,15E+01 |
| H03 | 12 | 32,39 | 33,40 | 8,31E+01 | 5,15E+01 |
| A04 | 13 | 28,44 | 28,45 | 1,40E+03 | 1,39E+03 |
| B04 | 13 | 28,46 | 28,45 | 1,38E+03 | 1,39E+03 |
| C04 | 14 | 34,43 | 34,27 | 1,93E+01 | 2,18E+01 |
| D04 | 14 | 34,10 | 34,27 | 2,44E+01 | 2,18E+01 |
| E04 | 15 | 27,19 | 27,26 | 3,41E+03 | 3,26E+03 |
| F04 | 15 | 27,32 | 27,26 | 3,11E+03 | 3,26E+03 |
| G04 | 16 | 32,94 | 33,29 | 5,61E+01 | 4,52E+01 |
| H04 | 16 | 33,63 | 33,29 | 3,42E+01 | 4,52E+01 |
| A05 | Standard | 22,32 | 22,31 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| B05 | Standard | 22,30 | 22,31 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| C05 | Standard | 25,55 | 25,61 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| D05 | Standard | 25,66 | 25,61 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| E05 | Standard | 28,79 | 28,95 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| F05 | Standard | 29,10 | 28,95 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| G05 | Standard | 32,38 | 32,68 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| H05 | Standard | 32,98 | 32,68 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| B06 | Standard | 35,02 | 35,02 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| C06 | Standard | 38,08 | 38,38 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| D06 | Standard | 38,68 | 38,38 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| E06 | Neg | 38,96 | 38,46 | 7,62E-01 | 1,16E+00 |
| F06 | Neg | 37,96 | 38,46 | 1,55E+00 | 1,16E+00 |
| G06 | NTC | 38,38 | 38,38 | N/A | N/A |
| H06 | NTC | 40,49 | 40,49 | N/A | N/A |

Taulukko 8. Magneettipartikkeleiden säilyvyys, koe 1.

| Kaivo | Näyte | Solunäärä/eristys | C _T | C _T Ka | Starting Quantity (SQ) | SQ Ka |
|-------|--------------------------|-------------------|----------------|-------------------|------------------------|----------|
| A01 | nolla päivää | 1,24E+13 | 18,27 | 18,195 | 2,81E+05 | 2,96E+05 |
| B01 | nolla päivää | 1,24E+13 | 18,12 | 18,195 | 3,11E+05 | 2,96E+05 |
| C01 | nolla päivää | 1,24E+11 | 24,55 | 24,54 | 4,79E+03 | 4,81E+03 |
| D01 | nolla päivää | 1,24E+11 | 24,53 | 24,54 | 4,84E+03 | 4,81E+03 |
| E01 | nolla päivää | 1,24E+09 | 28,91 | 28,715 | 2,82E+02 | 3,22E+02 |
| F01 | nolla päivää | 1,24E+09 | 28,52 | 28,715 | 3,62E+02 | 3,22E+02 |
| G01 | 3 päivää | 1,24E+13 | 19,4 | 19,37 | 1,36E+05 | 1,38E+05 |
| H01 | 3 päivää | 1,24E+13 | 19,34 | 19,37 | 1,41E+05 | 1,38E+05 |
| A02 | 3 päivää | 1,24E+11 | 25,86 | 25,615 | 2,04E+03 | 2,42E+03 |
| B02 | 3 päivää | 1,24E+11 | 25,37 | 25,615 | 2,80E+03 | 2,42E+03 |
| C02 | 3 päivää | 1,24E+09 | 32,74 | 32,68 | 2,35E+01 | 2,44E+01 |
| D02 | 3 päivää | 1,24E+09 | 32,62 | 32,68 | 2,52E+01 | 2,44E+01 |
| E02 | 1 viikko | 1,24E+13 | 20,05 | 20,16 | 8,88E+04 | 8,29E+04 |
| F02 | 1 viikko | 1,24E+13 | 20,27 | 20,16 | 7,71E+04 | 8,29E+04 |
| G02 | 1 viikko | 1,24E+11 | 26,13 | 26,13 | 1,71E+03 | 1,71E+03 |
| A03 | 1 viikko | 1,24E+09 | 32,21 | 32,735 | 3,29E+01 | 2,48E+01 |
| B03 | 1 viikko | 1,24E+09 | 33,26 | 32,735 | 1,67E+01 | 2,48E+01 |
| C03 | 2 viikkoa | 1,24E+13 | 19,38 | 19,48 | 1,37E+05 | 1,29E+05 |
| D03 | 2 viikkoa | 1,24E+13 | 19,58 | 19,48 | 1,21E+05 | 1,29E+05 |
| E03 | 2 viikkoa | 1,24E+11 | 26,67 | 26,485 | 1,21E+03 | 1,37E+03 |
| F03 | 2 viikkoa | 1,24E+11 | 26,3 | 26,485 | 1,53E+03 | 1,37E+03 |
| G03 | 2 viikkoa | 1,24E+09 | 33,81 | 33,125 | 1,17E+01 | 2,01E+01 |
| H03 | 2 viikkoa | 1,24E+09 | 32,44 | 33,125 | 2,85E+01 | 2,01E+01 |
| A04 | 0 päivää, näyte ennen mg | 1,24E+13 | 18,68 | 18,525 | 2,16E+05 | 2,40E+05 |
| B04 | 0 päivää, näyte ennen mg | 1,24E+13 | 18,37 | 18,525 | 2,64E+05 | 2,40E+05 |
| C04 | 0 päivää, näyte ennen mg | 1,24E+11 | 25,78 | 25,725 | 2,15E+03 | 2,23E+03 |
| D04 | 0 päivää, näyte ennen mg | 1,24E+11 | 25,67 | 25,725 | 2,31E+03 | 2,23E+03 |
| E04 | 0 päivää, näyte ennen mg | 1,24E+09 | 31,01 | 31,565 | 7,20E+01 | 5,36E+01 |
| F04 | 0 päivää, näyte ennen mg | 1,24E+09 | 32,12 | 31,565 | 3,51E+01 | 5,36E+01 |
| A05 | Standard | | 7,02 | 7,17 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| B05 | Standard | | 7,32 | 7,17 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| C05 | Standard | | 13,54 | 13,565 | 1,00E+07 | 1,00E+07 |
| D05 | Standard | | 13,59 | 13,565 | 1,00E+07 | 1,00E+07 |
| E05 | Standard | | 16,95 | 16,875 | 1,00E+06 | 1,00E+06 |
| F05 | Standard | | 16,8 | 16,875 | 1,00E+06 | 1,00E+06 |
| G05 | Standard | | 20,21 | 20,27 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| H05 | Standard | | 20,33 | 20,27 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| A06 | Standard | | 24,16 | 24,125 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| B06 | Standard | | 24,09 | 24,125 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| C06 | Standard | | 27,35 | 27,43 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| D06 | Standard | | 27,51 | 27,43 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| E06 | Standard | | 30,94 | 30,94 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| G06 | Standard | | 34,46 | 34,95 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| H06 | Standard | | 35,44 | 34,95 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| A07 | Standard | | 35,74 | 35,605 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| B07 | Standard | | 35,47 | 35,605 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| C07 | Neg | | 35,41 | 35,42 | 4,13E+00 | 4,10E+00 |
| D07 | Neg | | 35,43 | 35,42 | 4,07E+00 | 4,10E+00 |
| E07 | NTC | | 35,22 | 35,23 | N/A | N/A |
| F07 | NTC | | 35,24 | 35,23 | N/A | N/A |

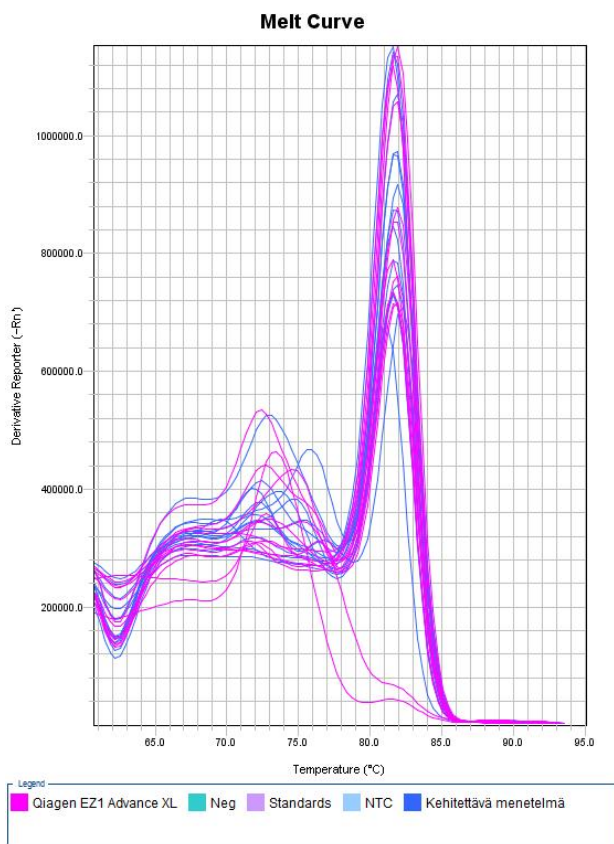
Taulukko 9. Magneettipartikkeleiden säilyvyys, koe 2.

| Kaivo | Näyte | Solua/eristys | C _T | C _T Ka | Quantity | Quantity Ka |
|-------|---------------|---------------|----------------|-------------------|----------|-------------|
| A1 | Nolla päivää | 1,24E+13 | 20,20 | 20,34 | 1,33E+07 | 1,15E+07 |
| B1 | Nolla päivää | 1,24E+13 | 20,49 | 20,34 | 9,77E+06 | 1,15E+07 |
| C1 | Nolla päivää | 1,24E+11 | 27,44 | 27,26 | 5,93E+03 | 7,36E+03 |
| D1 | Nolla päivää | 1,24E+11 | 27,07 | 27,26 | 8,79E+03 | 7,36E+03 |
| E1 | Nolla päivää | 1,24E+09 | 29,83 | 29,69 | 4,69E+02 | 5,45E+02 |
| F1 | Nolla päivää | 1,24E+09 | 29,56 | 29,69 | 6,21E+02 | 5,45E+02 |
| G1 | Neljä viikkoa | 1,24E+13 | 21,21 | 21,10 | 4,52E+06 | 5,12E+06 |
| H1 | Neljä viikkoa | 1,24E+13 | 20,99 | 21,10 | 5,73E+06 | 5,12E+06 |
| A2 | Neljä viikkoa | 1,24E+11 | 26,93 | 27,05 | 1,03E+04 | 9,07E+03 |
| B2 | Neljä viikkoa | 1,24E+11 | 27,18 | 27,05 | 7,84E+03 | 9,07E+03 |
| C2 | Neljä viikkoa | 1,24E+09 | 35,55 | 35,26 | 1,06E+00 | 1,50E+00 |
| D2 | Neljä viikkoa | 1,24E+09 | 34,98 | 35,26 | 1,94E+00 | 1,50E+00 |
| A3 | Standard | | 35,07 | 22,52 | 1,00E+09 | 1,00E+09 |
| B3 | Standard | | 9,97 | 22,52 | 1,00E+09 | 1,00E+09 |
| C3 | Standard | | 13,65 | 13,91 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| D3 | Standard | | 14,16 | 13,91 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| E3 | Standard | | 17,50 | 17,81 | 1,00E+07 | 1,00E+07 |
| F3 | Standard | | 18,11 | 17,81 | 1,00E+07 | 1,00E+07 |
| G3 | Standard | | 20,97 | 20,71 | 1,00E+06 | 1,00E+06 |
| H3 | Standard | | 20,45 | 20,71 | 1,00E+06 | 1,00E+06 |
| A4 | Standard | | 25,23 | 24,96 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| B4 | Standard | | 24,69 | 24,96 | 1,00E+05 | 1,00E+05 |
| C4 | Standard | | 27,99 | 27,55 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| D4 | Standard | | 27,12 | 27,55 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| E4 | Standard | | 30,58 | 30,66 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| F4 | Standard | | 30,74 | 30,66 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| G4 | Standard | | 33,14 | 33,48 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| H4 | Standard | | 33,82 | 33,48 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |
| A5 | Standard | | 35,54 | 35,85 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| B5 | Standard | | 36,15 | 35,85 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| C5 | Neg | | 34,63 | 34,98 | 2,81E+00 | 2,07E+00 |
| D5 | Neg | | 35,34 | 34,98 | 1,32E+00 | 2,07E+00 |
| E5 | NTC | | 36,85 | | | |
| F5 | NTC | | 35,60 | | | |

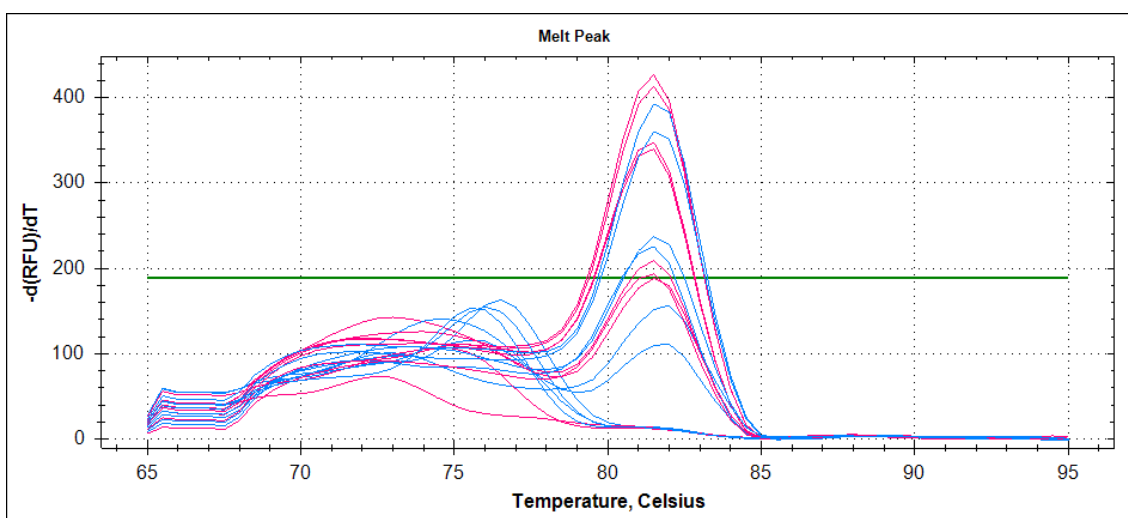
Taulukko 10. Magneettivarren ja QuicPick™-magneettikynän vertailu.

| Kaivo | Näyte | Eluutiivilavuus | Solua/eristys | C _T | C _T Ka |
|-------|----------------|-----------------|---------------|----------------|-------------------|
| A1 | Magneettivarsi | 200 µl | 7,20E+13 | 21,04 | 21,04 |
| B1 | Magneettivarsi | 200 µl | 7,20E+13 | 21,03 | 21,04 |
| C1 | Magneettivarsi | 100 µl | 7,20E+13 | 19,83 | 20,87 |
| D1 | Magneettivarsi | 100 µl | 7,20E+13 | 21,91 | 20,87 |
| E1 | Magneettivarsi | 200 µl | 7,20E+11 | 27,23 | 27,20 |
| F1 | Magneettivarsi | 200 µl | 7,20E+11 | 27,16 | 27,20 |
| G1 | Magneettivarsi | 100 µl | 7,20E+11 | 26,13 | 26,24 |
| H1 | Magneettivarsi | 100 µl | 7,20E+11 | 26,35 | 26,24 |
| A2 | Magneettivarsi | 200 µl | 7,20E+09 | 32,12 | 32,34 |
| B2 | Magneettivarsi | 200 µl | 7,20E+09 | 32,57 | 32,34 |
| C2 | Magneettivarsi | 100 µl | 7,20E+09 | 31,60 | 31,77 |
| D2 | Magneettivarsi | 100 µl | 7,20E+09 | 31,93 | 31,77 |
| E2 | Magneettikynä | 200 µl | 7,20E+13 | 18,97 | 18,92 |
| F2 | Magneettikynä | 200 µl | 7,20E+13 | 18,88 | 18,92 |
| G2 | Magneettikynä | 100 µl | 7,20E+13 | 17,95 | 17,60 |
| H2 | Magneettikynä | 100 µl | 7,20E+13 | 17,26 | 17,60 |
| A3 | Magneettikynä | 200 µl | 7,20E+11 | 25,81 | 25,85 |
| B3 | Magneettikynä | 200 µl | 7,20E+11 | 25,90 | 25,85 |
| C3 | Magneettikynä | 100 µl | 7,20E+11 | 23,78 | 23,66 |
| D3 | Magneettikynä | 100 µl | 7,20E+11 | 23,53 | 23,66 |
| E3 | Magneettikynä | 200 µl | 7,20E+09 | 32,53 | 32,61 |
| F3 | Magneettikynä | 200 µl | 7,20E+09 | 32,69 | 32,61 |
| G3 | Magneettikynä | 100 µl | 7,20E+09 | 32,21 | 32,14 |
| H3 | Magneettikynä | 100 µl | 7,20E+09 | 32,07 | 32,14 |
| C5 | NTC | | | 36,79 | 36,37 |
| D5 | NTC | | | 35,95 | 36,37 |

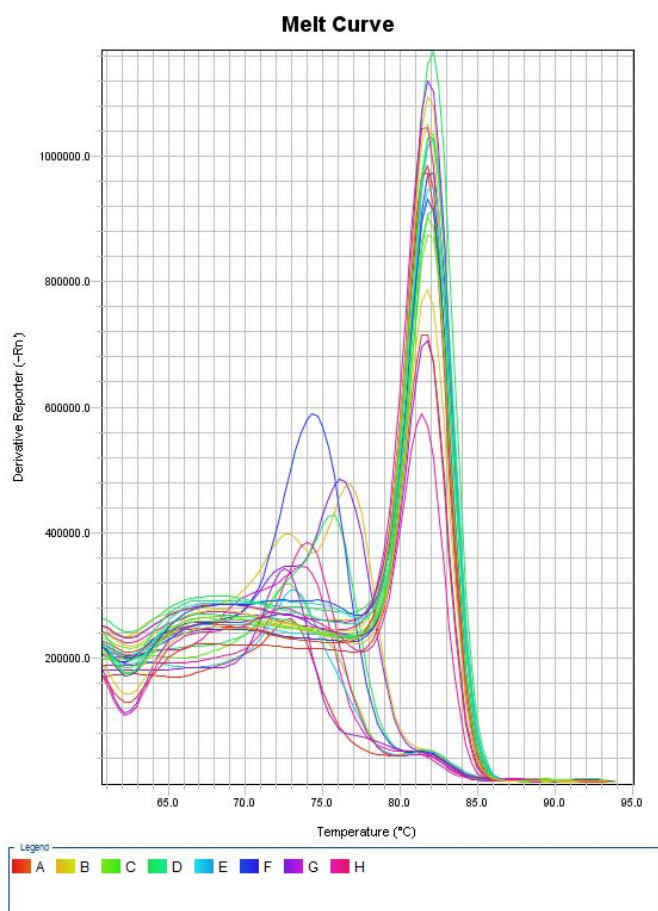
Liite 4. Kokeiden sulamiskäyrät



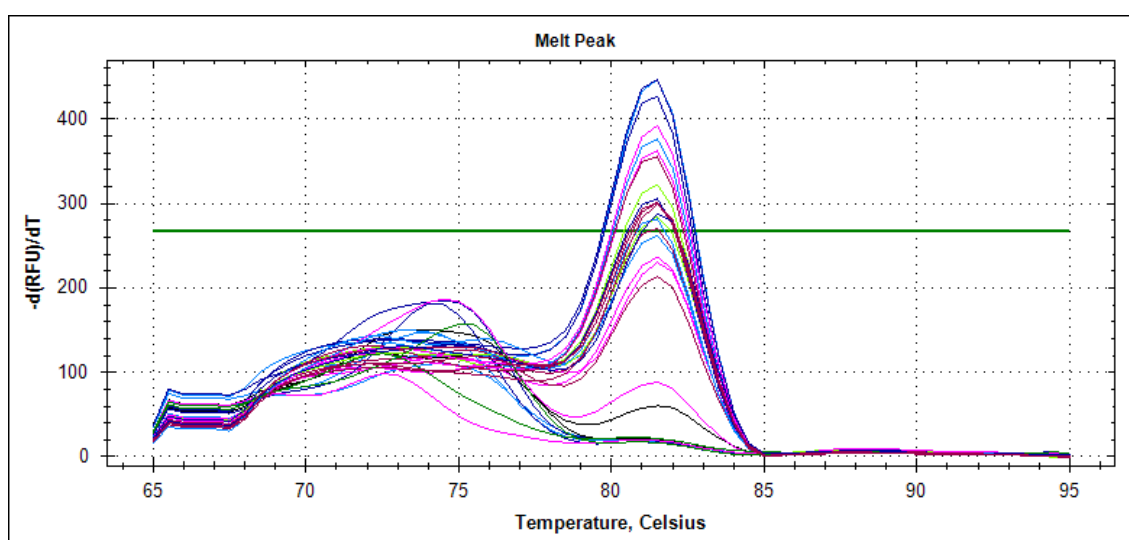
Kuva 1. Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään, koe 1.



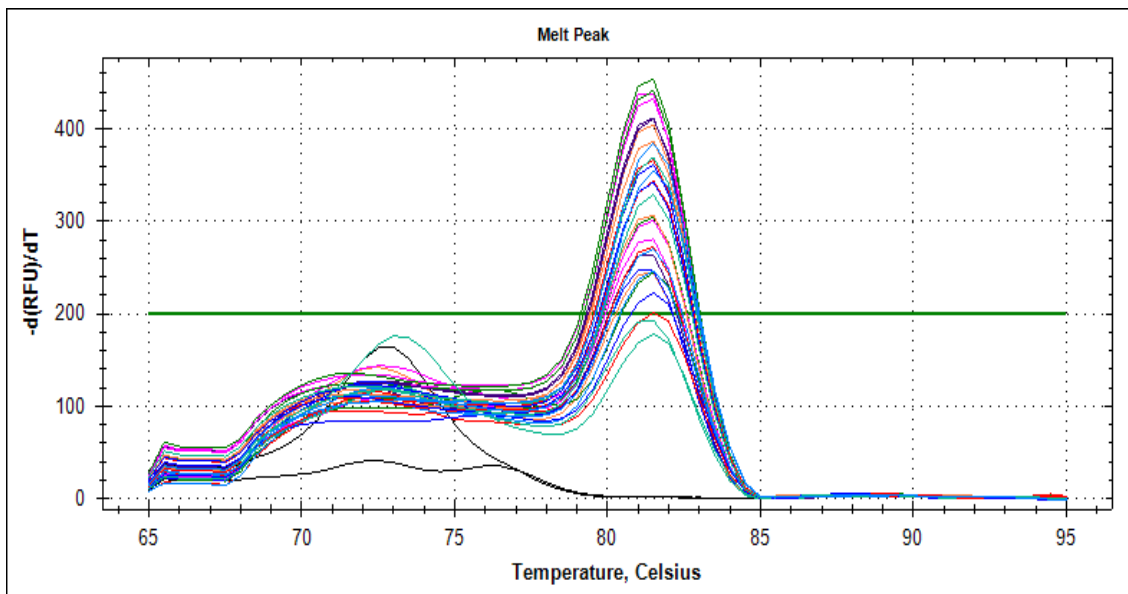
Kuva 2. Vertailu kaupalliseen Qiagen EZ1 Advance XL -eristysmenetelmään, koe 2.



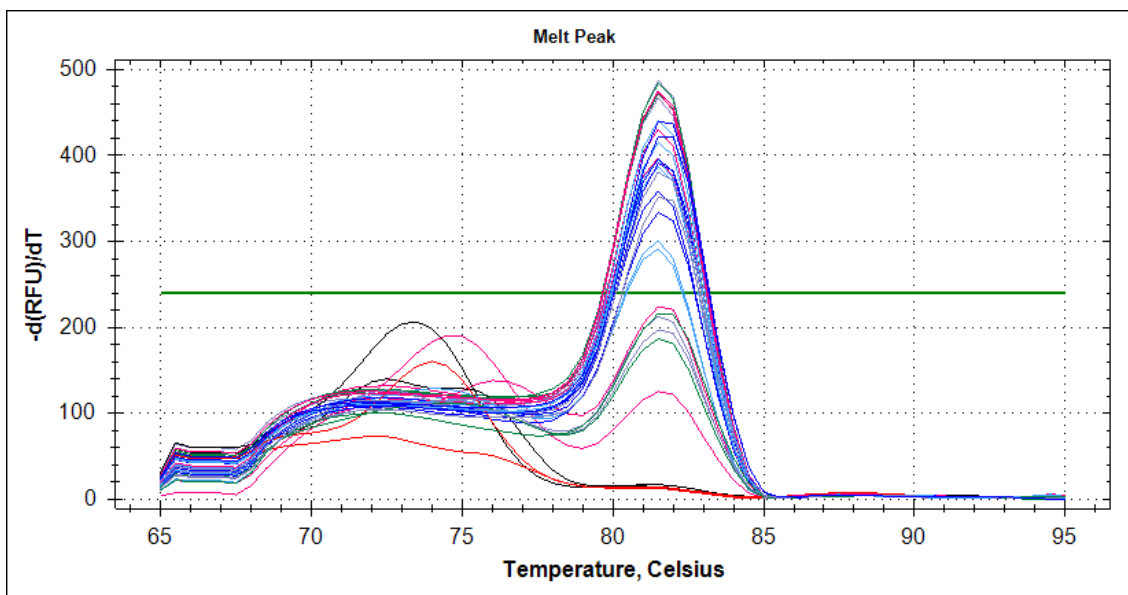
Kuva 3. Kehitettävän eristysmenetelmän puskurien DNA-jäännökset.



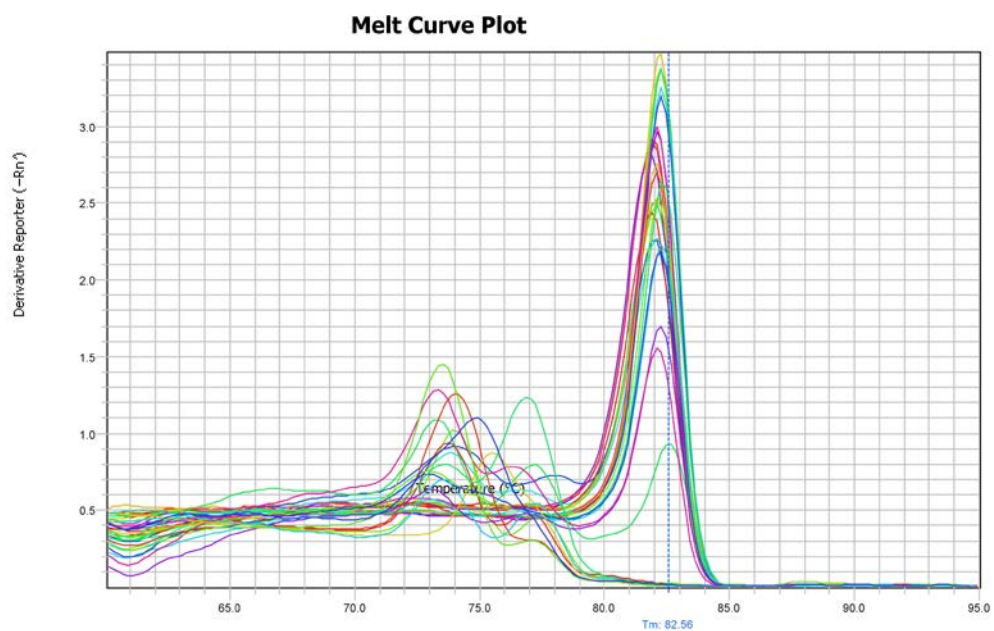
Kuva 4. Nenäsivelynäytteen inhibiittoreiden vaikutus.



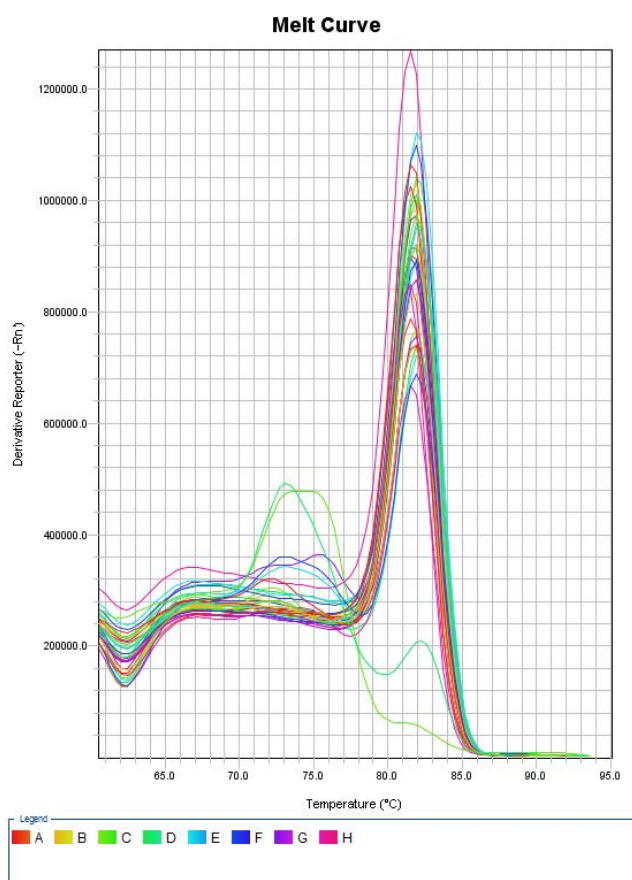
Kuva 5. Pesupuskureiden optimointi.



Kuva 6. Magneettipartikkeiden säilyvyys, koe 1.



Kuva 7. Magneettipartikkeleiden säilyvyys, koe 2.



Kuva 8. Magneettivarren ja QuicPick™-magneetikynän vertailu.