



Luonnonvara- ja
biotalouden
tutkimus 11/2015

Uutta teknologiaa elintarvike- turvallisuuden varmentamiseen

Laitinen Riitta, Välimaa Anna-Liisa, Hietanen Iiro, Jokinen Hannu,
Marnila Pertti, Pyörret Seppo, Saariniemi Pekka, Degefu Yeshitila,
Väyrynen Tiina, Virtanen Elina

Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 11/2015

Uutta teknologiaa elintarvike- turvallisuuden varmentamiseen

Laitinen Riitta, Välimaa Anna-Liisa, Hietanen Iiro, Jokinen Hannu, Marnila Pertti,
Pyörret Seppo, Saariniemi Pekka, Degefu Yeshitila, Väyrynen Tiina, Virtanen Elina

Luonnonvarakeskus, Helsinki 2015



Tutkimus on toteutettu Pohjois-Pohjanmaan liiton myöntämällä Euroopan aluekehitysrahoituksella (Food Safety Cluster –hanke, nro A31588)



ISBN: 978-952-326-058-0 (Painettu)

ISBN: 978-952-326-010-8 (Verkkajulkaisu)

ISSN 2342-7647 (Painettu)

ISSN 2342-7639 (Verkkajulkaisu)

URN: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-010-8>

Copyright: Luonnonvarakeskus (Luke)

Kirjoittajat: Laitinen Riitta, Välimaa Anna-Liisa, Hietanen Iiro, Jokinen Hannu, Marnila Pertti, Pyörret Seppo, Saariniemi Pekka, Degefu Yeshitila, Väyrynen Tiina, Virtanen Elina

Julkaisija ja kustantaja: Luonnonvarakeskus (Luke), Helsinki 2015

Julkaisuvuosi: 2015

Kannen kuva: Juha Sarkkinen, muokkaus: Design Valkea/Teemu Sirviö

Tiivistelmä

Laitinen Riitta¹, Välimaa Anna-Liisa¹, Hietanen Iiro³, Jokinen Hannu⁴, Marnila Pertti², Pyörret Seppo⁵, Saariniemi Pekka⁴, Degefu Yeshitila¹, Väyrynen Tiina¹, Virtanen Elina¹

¹) Luonnonvarakeskus (Luke), Paavo Havaksen tie 3, 90014 Oulun Yliopisto, etunimi.sukunimi@luke.fi

²) Luonnonvarakeskus (Luke), Humppilantie, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@luke.fi

³) Lappeenrannan Tekninen Yliopisto (LUT), Skinnarilankatu 34, 53850 Lappeenranta, etunimi.sukunimi@lut.fi

⁴) Mekitec Oy, Teknologiantie 3, 90590 Oulu, etunimi.sukunimi@mekitec.com

⁵) SR-Instruments Oy, Teknologiantie 3, 90590 Oulu, etunimi.sukunimi@sr-instruments.com

Ruuan profiloituminen vientituotteeksi, kuluttajien liikkuvuus, suurina erinä valmistettavien prosessoitujen ja valmisruokien käytön lisääntyminen sekä globaalit trendit lisäävät merkittävästi ruokaturvallisuusriskiä. Viranomaiset kiristävät valvontavaatimuksia ja kuluttajat haluavat enemmän tietoa ruokansa turvallisuudesta. Elintarvikkeiden valmistajilta odotetaan yhä laajempaa omaavaliolontaa turvallisuusuhkien eliminoimiseksi jo jatkojalostusprosessissa.

Projektin yleistavoitteena oli parantaa elintarviketurvallisuutta elintarvikkeissa ja elintarviketuotantolaitoksissa kehittämällä uusia, innovatiivisia mahdollisuuksia taloudellisten, nopeiden ja yksinkertaisten mittausmenetelmien käyttöönottoon. Lisäksi tavoitteena oli luoda toimintaympäristö, joka mahdollistaa ja tukee ruokaturvallisuusratkaisujen kehittämistä globaalien markkinoiden lisääntyviin tarpeisiin. FSC toimintaympäristöön on rakennettu Pohjois-Pohjanmaan liiton, Oulun kaupungin sekä alueen teknologiayritysten myötävaikutuksella Oulun elintarviketurvallisuuden tutkimuksen ja kehityksen osaamiskeskittymä. Toimintaympäristö on kokonaan uuden tyyppinen poikkiteollinen lähestymistapa elintarviketurvallisuuden menetelmien ja teknologioiden kehittämiseen. Toimintaympäristö on myös pohja, jolle tulevaisuuden elintarviketurvallisuusklusteri rakentuu.

Projektin mikrobiologisen osion päätavoitteina oli kehittää elintarvikediagnostiikkaan on-line-biosensori, jolla elintarvikkepatogeenit voitaisiin tunnistaa suoraan tuotantolinjalta. Mittavan tautaselvityksen perusteella oli ilmeistä, että nykyisillä teknologioilla on-line-biosensorin kehittäminen ei olisi mahdollista. Tavoite suunnattiin uudelleen vaihtoehtoisen pikamenetelmän kehittämiseen. Mallipatogeeniksi valittiin *Listeria monocytogenes* ja tavoitteeksi asetettiin näytteen analysointiprosessin nopeuttaminen noin viikosta vuorokauteen. Työssä hyödynnettiin nanobioteknologian työkaluja. Tuloksena näytteen analysointiaika lyheni noin kahteen vuorokauteen. Lisäksi projektissa kehitettiin erittäin herkkä LED-teknologiaan perustuva fluoresenssimittalaite, SepLED.

Projektin vierasesinetunnistuksen päätavoite oli kyetä erottelemaan erityyppiset (esimerkiksi lihasta luunsirut, kalasta ruodot, muovit, alumiini, keraami) ja myös hyvin pienikokoiset tuotteet toisistaan erilaisissa pakkausratkaisuissa. Ongelman ratkaisussa käytettiin Dual Energy-kuvausta, joka tarjoaa sopivilla reunaehdoilla merkittäviä etuja erottuvuuden ja kontrastin parantamiseen. Projektissa suunniteltiin ja rakennettiin DE-kameran prototyyppi menetelmän testaamiseksi elintarviketurvallisuusmittauksissa erilaisissa elintarvikematriiseissa (esim. luunsirujen erottaminen lihasta). Monienergiamittauksen (DE) lisäksi hankkeessa suunniteltiin ja toteutettiin monikulmageometriaan perustuva prototyyppi vierasesineiden tunnistamiseksi nestepakkauksista.

Asiasanat: ruokaturvallisuus, biodetektorit, *Listeria monocytogenes*, vierasesinetunnistus, dual energy

Sisällys

1. Johdanto	5
2. Biosensoritutkimus.....	6
2.1. Taustaselvitys	6
2.1.1. Listerioosi.....	7
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> -diagnostiikka	8
2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> -bakteerin analysointimenetelmän vaatimukset.....	8
2.2.2. Teknologioiden valinta.....	8
2.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> -kannan ja muiden testikantojen valinta	9
2.2.4. Elintarvikenäytteen esikäsittely- ja konsentroidintimenetelmien valinta	9
2.2.5. Detektointiteknologian valinta	12
2.2.6. Detektointileimat.....	13
2.2.7. Valitut teknologiat	14
2.3. Biosensoritutkimukseen liittyvä kehitystyö	16
2.3.1. Vertailumenetelmät.....	17
2.3.2. Näytteen esikäsittely	20
2.3.3. Rikastus kasvatusliemissä	21
2.3.4. Konsentroidintimenetelmä immunomagneettisella erottelulla (IME)	23
2.3.5. Qdot-leimauksen yhdistäminen IMB-rikastukseen	28
2.4. Biodetektorin prototyypin kehitystyö	32
2.4.1. Valonlähteen ja valon vastaanottimen valinta	32
2.4.2. Signaalivahvistin.....	33
2.4.3. Muu laite-elektronikka ja ohjelmisto.....	33
2.4.4. Laiteoptiikka.....	33
2.4.5. Biodetektorin testimittaukset ja laitteen ominaisuudet	34
2.4.6. Biodetektorin jatkokehitys.....	37
2.5. Biosensoritutkimuksen yhteenveto.....	37
3. Vierasesinetutkimus	39
3.1. Taustaselvitys	39
3.2. Konventionaalisen (SE) röntgenlaitteen suorituskyky mittaukset	41
3.2.1. Signaalitason ja kohinan mittaus	41
3.2.2. Paikkaresoluution mittaus	42
3.3. Dual Energy -tutkimukseen liittyvä kehitystyö ja mittaukset.....	43
3.3.1. Teoreettinen tausta	43
3.3.2. Suoritetut DE-testaukset	45
3.3.3. Röntgenspektrien simuloinnit	48
3.3.4. DE-röntgelaiteprototyyppi.....	49
3.3.5. Dual Energy (DE) –kameran laiteympäristön, elektronikan ja käyttöjärjestelmän suunnittelu ja toteutus	49
3.3.6. Dual Energy -röntgenlaiteprototyypin testaus	51
4. Yhteenveto	53

1. Johdanto

Viime aikojen elintarvikkeiden laatuun ja alkuperään liittyneet skandaalit ovat horjuttaneet kuluttajien luottamusta. Teollisuudelta vaaditaan turvallisempia tuotteita. Kysymys ei ole pelkästään tuotteiden mikrobiologisesta, kemiallisesta tai fysikaalisesta laadusta vaan myös tuotantoketjun eri vaiheissa tuotteisiin päässeistä vierasaineista, haitallisten aineiden jäämistä ja jopa tahallisista tuoteväärnöksistä.

Elintarviketeollisuuden raaka-aineiden, puolivalmisteiden ja valmiiden elintarvikkeiden laatua pyritään ylläpitämään ja monitoroimaan korjuun, käsittelyn, valmistuksen, pakkaamisen, varastoinnin ja kuljetuksen aikana. Osana prosessin hallintaa tarvitaan aistinvaraisen havainnoinnin lisäksi mittauksia ja hallittuja menettelyitä sekä oikeanlaista välineistöä. Havainnoinnilla ja mittauksilla selvitetään elintarvikkeiden tila eri vaiheissa, ja saadaan samalla tietoa menettelyiden riittävydestä ja toimivuudesta. Tiedon oikeellisuus ja kattavuus ovat perusta jatkuvalla kuluttajalaadun varmistamiselle ja toiminnan kehittämiseksi teknisesti toimivaksi ja kustannustehokkaaksi.

Laadun seurannan menetelmät ovat ensisijaisesti näyte/otantaperustaisia. Koko tuotevirtaan kohdistuvista menetelmistä yleisin on visuaalinen tarkastus. Visuaalisessa tarkastuksessa on inhimillisen toiminnan heikkoudet; esimerkiksi kattavuus, systemaattisuus, tarkkuus, luotettavuus ja olosuhderiippumattomuus vaihtelevat laajalla skaalalla ja monen parametrin suhteen. Teknisiin laitteisiin perustuvat optiset mittaukset ja tarkastusmenettelyt ovat nousseet ja nousemassa korvaamaan tai täydentämään visuaalista tarkastusta. Teknisissä tarkastuksissa muuttujien määrä on useimmiten rajattavissa niin, että tarkastustehtävä voidaan toteuttaa tehokkaalla tavalla. Mutkikkaissa prosesseissa ja varsinkin biologisen materiaalin osalta tekninen tarkastus on vielä kuitenkin melko rajallista. Hyvin rajatuissa muutaman muuttujan tehtävissä käytössä on jo luotettavia ja kustannustehokkaita menetelmiä. Kehityssuunta on kuitenkin ilmeinen; optiset tarkastukset lisääntyvät nopeasti.

Vuosina 2011–2014 toteutetun EAKR-rahoitteisen Food Safety Cluster (FSC) -hankkeen tavoitteena oli luoda Oulun seudulle elintarvikkeiden turvallisuusratkaisuja tuottava toimintaympäristö. FSC toimintaympäristö on tarkoitettu yritysten sekä tutkimus- ja koulutusorganisaatioiden käyttöön. Vaikuttavuustavoitteena oli parantaa edellytyksiä ruokaturvallisuuden monitorointiin perustuvan liiketoiminnan synnylle, olemassa olevan kehittymiselle ja sekä edistää erilaistumistekijöiden syntyä Suomen elintarviketeollisuudelle.

FSC toimintaympäristö rakentuu biosensori- ja ruokaturvallisuuslaboratorioista, jotka tarjoavat mahdollisuuden elintarviketogeenien (esimerkiksi *Listeria monocytogenes*) ja vierasesineiden tunnistamiseen elintarvikkeista. Biosensorilaboratorio on varustettu molekyylibiologisella laiteteknologialla ja ruokaturvallisuuslaboratorio röntgenteknologiaan perustuvilla laitteilla testiratoineen.

2. Biosensoritutkimus

2.1. Taustaselvitys

Elintarvikevälitteisiä epidemioita - ruokamyrkytyksiä ja infektioita - voivat aiheuttaa monenlaiset mikrobit, kuten bakteerit, virukset, loiset ja prionit. Niiden aiheuttamia tauteja tunnetaan yli 200. Taudit vaihtelevat miedosta ripulista vakaviin, jopa kuolemaan johtaviin sairauksiin (Dwivedi & Jaykus 2011). Yksinomaan ripulisairauksiin kuolee arviolta 2,2 miljoonaa ihmistä maailmassa vuosittain. Näistä huomattava osuus on elintarvikevälitteisiä (WHO). Laskelmien mukaan arviolta 31 tunnettua pääasiallista patogeenia aiheuttaa 9,4 miljoonaa sairastapausta, 55 961 sairaalassa vaadittavaa hoitotapausta ja 1 351 kuolemaan johtavaa sairastumista USA:ssa joka vuosi (Scallan ym. 2011). Vuonna 2009 Euroopan Unionin alueella raportoitiin yhteensä 5 550 elintarvikevälitteistä epidemiaa, joissa sairastui 48 964 ihmistä. Niissä 4 356 tapausta vaati sairaalahoitoa ja 46 johti kuolemaan (EFSA 2011).

Inhimillisten kärsimysten vähentämiseksi sekä yhteiskunnalle ja elintarvikevalvonnalle aiheutuvien taloudellisten vaikutusten minimoimiseksi elintarvikepatogeenien diagnosointi elintarviketuotannossa on välttämätöntä. Väestön sairastuminen zoonooseihin aiheuttaa suoria ja välillisiä kustannuksia sekä yhteiskunnalle että elintarvikevalvonnalle. Yhteiskunnalle niitä syntyy tartuntojen ehkäisystä ja hoidosta, sairastuneiden toimintakyvyn äkillisestä tai kroonisesta heikkenemisestä, sairauspoissaoloista sekä ennenaikaisista kuolemantapauksista. (MMM 2013). USA:ssa on arvioitu, että 13 merkittävimmän elintarvikevälitteisen taudinaiheuttajan aiheuttamiin sairastumisiin liittyvät kustannukset ovat yhteensä noin 31,2 miljardia dollaria vuodessa (Byrd-Bredbenner ym. 2013).

Elintarvikevalvonnalle aiheutuu tuotteiden takaisinvedosta ja epidemian aiheuttamasta myynnin laskusta. On arvioitu, että valmisruokien takaisinvehto *L. monocytogenes* -bakteerin vuoksi laskee tuotteiden myyntiä 22–27 % 4–8 viikon aikana (Thomsen ym. 2006).

Food Safety Cluster -hankkeen yhtenä tavoitteena oli kehittää elintarvikediagnosticsovellus on-line-biosensori, jolla elintarvikepatogeeni(t) voitaisiin tunnistaa suoraan tuotantolinjalla. Määritelmän mukaan biosensori on analyttinen laite, joka muuntaa biologisen vasteen mitattavaksi sähköiseksi signaaliksi (Byrne ym. 2009). Se koostuu kahdesta pääkomponentista: bioreseptorista tai biotunniste-elementistä ja muuntimesta. Bioreseptori on molekyyli, joka tunnistaa kohdeanalyytin biokemiallisella mekanismilla ja vastaa sen sitoutumisesta sensoriin mittausta varten. Bioreseptoreina voivat toimia esimerkiksi vasta-aineet/antigeenit, entsyymit, nukleiinihapot/DNA, solurakenteet/solut ja bakteriofaagit. Bioreseptori tai biotunniste-elementti määrittää biosensorteknologian spesifisyyden (Velusamy ym. 2010). Muuntimen (transducer) tehtävänä on muuntaa tunnistus mitattavaksi sähköiseksi signaaliksi. Muunnin voi olla esimerkiksi optinen, elektrokemiallinen, massa- tai edellä mainittujen tekniikoiden yhdistelmä. Optisista tekniikoista pintaplasmaresonanssi ja fluoresenssi ovat eniten käytettyjä patogeenisten bakteerien määrittämisessä herkkyden vuoksi (Velusamy ym. 2010).

Kehitystyö käynnistettiin taustaselvityksellä, jossa luotiin yleiskatsaus elintarvikepatogeenien diagnostiikkakenttään. Kohdeorganismien valitsemiseksi etsittiin perustietoa elintarvikevälitteisiä ruokamyrkytyksiä ja infektioita aiheuttavista mikrobeista, niiden esiintyvyydestä ja elinolosuhteista sekä elintarvikepatogeenien tutkimusmenetelmistä. Lisäksi perehdyttiin lähinnä EU:n lainsäädännön asettamiin vaatimuksiin elintarvikevälitteisten patogeenien tutkimisessa ja tunnistamisessa analysointimenetelmän herkkyysvaatimuksien selvittämiseksi.

Taustaselvityksen perusteella oli ilmeistä, että vuonna 2012 käytössä olevilla teknologioilla on-line-biosensorin kehittäminen ei olisi mahdollista. Syynä oli se, että elintarvikenäytteissä patogeenisiä bakteereita on yleensä vähän ja ne ovat epätasaisesti jakautuneina. Jotta bakteerien monitorointi tapahtuisi linjanopeudella, pitäisi analysoinnissa pystyä havaitsemaan näytteestä yksi elävä solu. Käytettävissä olevat menetelmät, kuten molekulaariset (DNA-/RNA:n perustuvat) tai immunologiset (vasta-aineisiin tai faagiproteiineihin perustuvat) menetelmät ovat herkkiä, mutta niissäkin tarvitaan

aikaa vievää näytteen esikäsittelyä ja bakteerien rikastamista. Tavoitteeksi asetettiin vaihtoehtoisen pikamenetelmän kehittäminen ja analyysiajan lyhentäminen merkittävästi perinteisiin viljelymenetelmiin verrattuna.

Merkittävimpiä elintarvike-epidemioiden aiheuttajia ovat erityisesti eläinten ja ihmisten välillä tarttuvat zoonoottiset bakteerit. Näistä *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes* ja *Escherichia coli* O157:H7 sekä muut shigatoksiinia tuottavat *E.coli* -kannat ja *Vibrio* spp. ovat aiheuttaneet eniten elintarvikevälitteisiä epidemioita kahdenkymmenen viime vuoden aikana (Newell ym. 2010). Vuonna 2009 EU:n alueella yleisimmin raportoidut zoonoosit olivat kamylobakterioosi (kuolleisuus 0,02 %), salmonelloosi (kuolleisuus 0,08 %), yersinioosi, verosytotoksigeenisen *E. coli* (VTEC)-bakteerin aiheuttamat infektiot, toksoplasmooosi, Q-kuume ja listerioosi (kuolleisuus 16,6 %). Raportoituihin kuolleisuuslukuihin ja varmistuneiden tapausten kokonaislukuihin perustuneiden arvioiden mukaan noin 270 ihmistä kuoli listerioosiin, 90 salmonelloosiin ja 40 kamylobakterioosiin EU:ssa vuonna 2009. (EFSA 2011).

Diagnostiikan kehityskohteeksi valittiin elintarvikepatogeenistä *L. monocytogenes*. Valintaperusteina olivat riskielintarvikkeiden moninaisuus, löydösmäärät eri elintarvikkeissa, tautitapausten määrän kehitystrendi sekä patogeenin haitallisuus (sairauksien ja epidemioiden lukumäärä ja kuolleisuusprosentti). Myös kaupallisten määrittämenetelmien olemassaolo oli tärkeää, jotta kehitystyössä tarvittavia työkaluja olisi saatavilla.

Taustaselvityksen tuloksia on esitetty katsausartikkeleissa ”Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain - a review”. Seuraavassa esitetään *L. monocytogenes* -bakteerin ominaispiirteitä ja sen aiheuttamaa elintarviketurvallisuusriskiä, biosensorin kehitystyössä valittuja teknologioita ja valintaan vaikuttavia tekijöitä sekä kehitystyön tuloksia.

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes -bakteeria esiintyy lähes kaikkialla elinympäristössämme, kuten maassa, vedessä, kasveissa ja rehuissa sekä eläinten ja ihmisten suolistossa. *L. monocytogenes* voi selviytyä ja kasvaa laajalla lämpötila-, pH, ja vesiaktiivisuusalueella (active water, aw) sekä hapellisissa, mikroaerofiilissä ja hapettomissakin olosuhteissa. Sen optimaalinen kasvulämpötila on 30–37 °C, mutta se pystyy kasvamaan jopa lämpötila-alueella -0,4–45 °C (Junttila ym. 1988, Walker ym. 1990). *L. monocytogenes* tuhoutuu pastöroinnissa (72 °C). Se kasvaa myös laajalla pH alueella (pH 4–9,6), joskin optimaalinen pH-alue on 6–8. Listeria voi kasvaa melko ’kuivissa’ olosuhteissa, joissa aktiivisen veden osuus on <0,92 (Hallanvuori & Johansson 2010). Liuoksen aktiivinen vesi (aw) kuvaa mikrobien käytettävissä olevan vapaan veden määrää ja se määritellään liuoksen höyryn paineen osuutena puhtaan veden höyryn paineesta samassa lämpötilassa. Puhtaan veden aw-arvo on 1,00 (Salkinoja-Salonen 2002).

L. monocytogenes pystyy tarttumaan monenlaisiin elintarvikkeiden kanssa kosketuksissa oleviin pintoihin, kuten ruostumattomaan teräkseen, lasiin, graniittiin ja polypropyleeniin (Silva ym. 2008) muodostaen biofilmejä. Biofilmin sisällä bakteeri on suojassa mm. pesu- ja desinfiointiaineiden vaikutuksilta. Se voi tuhoutumatta kestää korkeitakin pesuainepitoisuuksia (Hall-Stoodley ym. 2004, Carpentier & Cerf 2011) ja muodostaa elintarvikkeiden käsittelyssä käytettäville pinnoille pysyviä, yhä infektiokykyisiä kantoja, jotka kykenevät kontaminoimaan prosessoitavia elintarvikkeita. Edes suoja-kaasupakkaaminen ei estä *L. monocytogenes* -bakteerin kasvua, vaan päinvastoin saattaa edistää sitä leikatuissa tuoretuotteissa (Francis & O’Beirne 1997). Edellä mainittujen ominaisuuksien vuoksi *L. monocytogenes* -bakteeri muodostaa elintarviketurvallisuusriskin (listerioosi), joten sen valvonta elintarviketuotannossa on erittäin tärkeää.

2.1.1. Listerioosi

Listerioosi on *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttama tulehdussairaus, joka voi ilmetä vakavana infektiona (invasiivinen muoto), suolisto-oireina (klassisen ruokamyrkytys, non-invasiivinen muoto)

tai paikallisena lievänä, itsestään paranevana ihoinfektionä. Erityisen alttiita listerioosille ovat henkilöt, joiden vastustuskyky on heikentynyt, kuten vanhukset (ikä >65 v), syöpä-, aids- ja elinsiirtopotilaat, maksa- ja munuaistauteja ja diabetesta sairastavat tai kortisonilääkitystä saavat henkilöt. Heillä listerioosi ilmenee tavallisesti vaikeana yleisinfektionä tai aivokalvontulehduksena. Riskiryhmään kuuluvat myös raskaana olevat, joille listerioosi voi aiheuttaa keskenmenon tai sikiön kuoleman. Vastasyntynyt voi saada ennen syntymää tai synnytyksen yhteydessä listerian aiheuttaman aivokalvontulehduksen tai verenmyrkytyksen.

Epidemiologisten tietojen perusteella elintarvikkeeseen liittyvä listerioosiriski on terveille henkilöille pieni, jos *L. monocytogenes* -pitoisuus elintarvikkeessa on kulutushetkellä alle 100 pmy/g (pmy = pesäkettä muodostava yksikkö). Riskiryhmien suhteen ei tiedetä, mikä *L. monocytogenes* -bakteerimäärä voi aiheuttaa sairauden, mutta vastustuskyvyltään heikentyneiden henkilöiden on raportoitu sairastuneen pitoisuuksista <10–10 000 pmy/g (Sivonen 1996). Taudin itämisaika on 1–70 vuorokautta riippuen potilaan terveydentilasta (Linnan ym. 1988). Lievässä muodossa tauti puhkeaa noin 1 vuorokauden kuluessa (Aureli ym. 2000). Kuolleisuus listerioosiin tiettyjen riskiryhmien osalta voi olla jopa 20–30 % (Allerberger ym. 2010). Vuonna 2011 Euroopan Unionin 27 jäsenvaltion alueella listerioosi aiheutti 1 476 sairastapausta, ja kuolleisuusprosentti oli korkea, 12,7 %. Listerioositapausten määrä on vaihdellut vuosittain, mutta siinä on havaittavissa nousutrendi vuodesta 2008 alkaen (EFSA 2013a).

Monenlaiset elintarvikkeet voivat olla listerioosin lähteenä. Riskielintarvikkeita ovat sellaisenaan syötävät elintarvikkeet, joilla on pitkä myyntiaika ja joissa listeria pystyy lisääntymään, kuten tyhjiöpakatut, kylmäsavustetut ja graavisuolatut kalastustuotteet sekä maito. Riskielintarvikkeisiin kuuluvat myös pastöroimaton maito ja siitä valmistetut juustot, muut pehmeät juustot (home- ja tuorejuustot) sekä leikkeleet ja pateet (Hallanvuo & Johansson 2010). Myös ei-eläinperäiset elintarvikkeet, kuten riisi, suolasienet, hedelmät tai vihannekset voivat olla listerioosin välittäjiä (EFSA 2013b).

2.2. *Listeria monocytogenes* -diagnostiikka

2.2.1. *Listeria monocytogenes* -bakteerin analysointimenetelmän vaatimukset

Kehitystyön pohjaksi selvitettiin elintarviketurvallisuutta koskevan lainsäädännön asettamat analysointimenetelmien vaatimukset, joita tarkasteltiin Euroopan Unionin (EU) alueen yhtenäisen lainsäädännön pohjalta. EU:n mikrobikriteeriasetuksen mukaan ensisijaisesti elintarvikealan toimijat vastaavat tuottamiensa tuotteiden mikrobiologisesta turvallisuudesta omavalvonnan avulla (Evira 2009).

Mikrobikriteeriasetuksessa jokaiselle mikrobiologiselle vaatimukselle on asetettu vertailumenetelmä, jolla saatua tulosta pidetään oikeana. *L. monocytogenes* -bakteerin vertailumenetelmä on ISO 11290-1:1996, muutos 1:2004 ISO 11290-2:1998 ja muutos 1:2004. Omavalvontanäytteiden tutkimuksissa vertailumenetelmien lisäksi voidaan käyttää myös muita analyysimenetelmiä, mikäli niillä voidaan taata vähintään yhtä hyvä elintarviketurvallisuustaso kuin vertailumenetelmiä käyttämällä. Vaihtoehtoisten menetelmien (pikatestien) käyttö on sallittua, mikäli menetelmä on validoitu mikrobikriteeriasetuksen vertailumenetelmää vastaan EN/ISO 16140 -standardin tai vastaavan, kansainvälisesti hyväksytyyn protokollan mukaisesti (Evira 2009).

2.2.2. Teknologioiden valinta

Biosensori tai mikrobitunnistusmenetelmä koostuu seuraavista osioista: esikäsitteily (homogenointi ja suodatus), rikastus/konsentroidintointi, detektointi (vasta-aineisiin sidottu fluoresenssileima) sekä biodektointi. Projektin aikana keskityttiin rikastus-/konsentroidintivaiheisiin, detektointiin sekä biodektointiin, esikäsitteilyn jäädessä vähemmälle huomiolle.

2.2.3. *Listeria monocytogenes* -kannan ja muiden testikantojen valinta

L. monocytogenes jaetaan 13 serotyyppiin: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ja 7. Serotyypitys perustuu bakteerin pintarakenteiden antigeenisuuden eroihin, agglutinaatioreaktioihin somaattisen soluseinän (O) ja flagellan (H) antigeenien ja niille spesifisen antiseerumin välillä (Seeliger & Höhne 1979). Vázquez-Boland ym. (2001) mukaan listerioositapauksista suurimman osan aiheuttavat serotyypit 1/2a, 1/2b ja 4b, kun taas ruoasta löytyvät yleisimmin serotyypit 1/2a ja 1/2c. Ruotsissa toteutetun tutkimuksen mukaan pääosa elintarvike- ja elintarvikeympäristön löydöksistä oli serotyyppiä 1/2a (Thisted Lambertz ym. 2012). Virossa tehdyn tutkimuksen mukaan edellisten lisäksi myös serotyyppiä 1/2b löytyy elintarvikkeista (Kramarenko ym. 2013). Tässä työssä käytettiin serotyyppiä 1/2a vastaavaa *L. monocytogenes* ATCC 19111 -kanta. Lisäksi testauksissa käytettiin seuraavia kantoja: *L. monocytogenes* ATCC 13932, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria ivanovii* subs. *ivanovii* ATCC 19119, *E. coli* ATCC 25922 ja *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *L. innocua* -kanta valittiin akutestauksiin työturvallisuuskäytön vuoksi: *L. innocua* kuuluu bioturvallisuusluokkaan 1, kun taas *L. monocytogenes* bioturvallisuusluokkaan 2 (Sosiaali- ja terveysministeriö 2004). Lisäksi *L. innocua*- ja *L. monocytogenes* -bakteerit ovat fylogeneettisesti melko lähellä toisiaan (Cossart 2011), joten se soveltui malliorganismiksi. Muut kannat ovat listeria-määrittelyssä yleisesti käytettyjä kantoja.

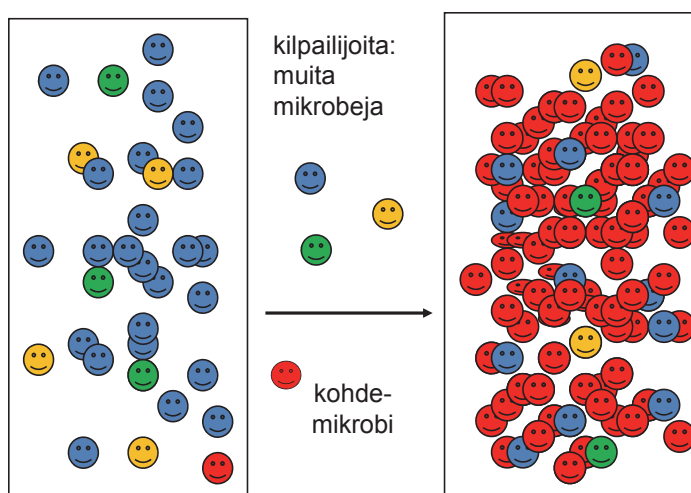
2.2.4. Elintarvikenäytteen esikäsittely- ja konsentroidintimenetelmien valinta

Elintarvikenäytteen esikäsittely on edellytys nopealle mikrobiologiselle määrittelylle. Tämä johtuu elintarvikkeiden monimutkaisista rakenteista, menetelmän detektorajoista, näytemäärän asettamista rajoituksista ja mikrobien elinkyvystä. Elintarvikkeiden sisältämät monenlaiset komponentit vaikeuttavat analysointia. Esimerkiksi rasva ja partikkelit häiritsevät vasta-aineiden sitoutumista ja monimuotoiset hiilihydraatit voivat estää nukleiinihappojen monistusta. Elintarvikenäytteissä patogeenisiä bakteereita on yleensä vähän. Määrittelyksen nopeuttamiseksi pitäisi pystyä havaitsemaan jopa yksi elävä solu näytteessä. Haasteena on myös varmistaa näytteen edustavuus, sillä mikrobit eivät jakaudu tasaisesti. Lisäksi määrittelyyn on saatava mukaan kasvullisten solujen lisäksi myös valmistusprosesseissa, kuten kuuma- ja kylmäkäsittelyissä, pakastuksessa tai erilaisten säilöntäaineiden vuoksi vahingoittuneet sekä näiden stressitekijöiden vuoksi lepotilaan menneet solut (Dwivedi & Jaykus 2011). Valmistusprosesseissa vahingoittuneet solut voivat suotuisissa olosuhteissa toipua ja pystyä lisääntymään nopeasti pilaten elintarvikkeen (Wu 2008). Lepotilassa olevia soluja ei kyetä havaitsemaan standardimenetelmin. Elvytyksen jälkeen nämä ”elävät, ei-viljeltävät” (VBNC) solut saadaan kuitenkin jälleen viljelemällä selville. Huomattavaa on, että samalla niiden infektioisuus palautuu (Oliver 2010).

Esikäsittelyssä kohdesolut eristetään ja konsentroidaan, poistetaan näytteessä olevia määrittelyä estäviä tekijöitä ja pienennetään kohdemikrobit sisältävää näytetilavuutta. Esikäsittelymenetelmät voidaan jakaa epäspesifisiin tai kohdespesifisiin lähestymistapoihin. Pääasiassa fysikaalisiin ja kemiallisiin periaatteisiin perustuvia epäspesifisiä esikäsittelymenetelmiä ovat esimerkiksi sentrifugointi, suodatus, dielektroforeesi, metallihydroksidit sekä ioninvaihtohartsit. Kohteeseensa spesifisesti sitoutuvissa, ligandeihin perustuvissa esikäsittelymenetelmissä voidaan käyttää esimerkiksi vasta-aineita, faageja, nukleiinihappoaptameereja ja lektiinejä (Dwivedi & Jaykus 2011). Kohdespesifisessä lähestymistavassa näytteeseen saadaan halutut kohdemikrobit, kun taas epäspesifisessä menetelmässä konsentroidint- ja erotteluprosessissa saatu näyte sisältää kaikki alkuperäisessä näytteessä olevat mikrobit (Stevens & Jaykus 2004). Paras tulos saadaan käyttämällä molempien yhdistelmiä, sillä jokaisella menetelmällä on omat rajoituksensa (Dwivedi & Jaykus 2011).

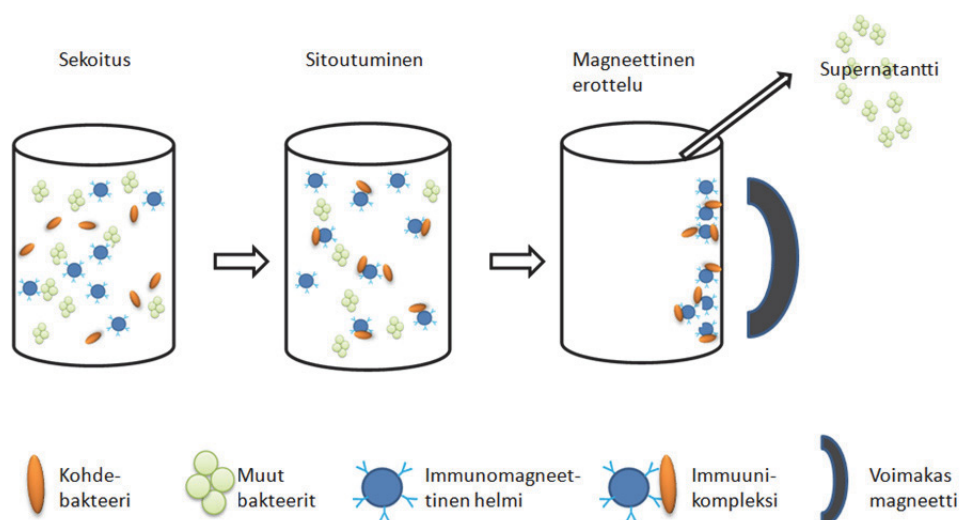
Kehitystyössä esikäsittelymenetelmäksi valittiin epäspesifisen ja kohdespesifisen menetelmän yhdistelmä: suodatus ja vasta-aineet tai faagiperäiset proteiinit. Lisäksi näytteen sisältämien kohdeorganismien määrää rikastettiin selektiivisillä kasvatusalustoilla.

Rikastuksen tarkoitus on kasvattaa tutkittavan bakteerin määrä määrittämisen kannalta riittäväksi. Esirikastuksessa vaurioituneet solut elvytetään ja/tai lisätään kohde-organismien määrää näytteessä. Esirikastuksessa pyritään laimentamaan myös määrittystä haittaavia tekijöitä, kuten säilöntäaineita. Lisäksi kuivatuissa tai prosessoiduissa elintarvikenäytteissä olevat solut saavat nestesisältönsä takaisin. Valikoivassa rikastuksessa käytetyt erikoiskasvatusalustat sallivat kohde-organismien kasvun samalla, kun ne rajoittavat muun kilpailevan mikrobiston kasvumahdollisuuksia. Näin todennäköisyys kohdemikrobin havaitsemiselle kasvaa (kuva 1.) (Dwivedi & Jaykus 2011).



Kuva 1. Rikastuksella kohdemikrobin pitoisuutta kilpaileviin mikrobeihin nähden saadaan lisättyä, jolloin todennäköisyys kohdemikrobin havaitsemiselle kasvaa (kuva Anna-Liisa Välimaa).

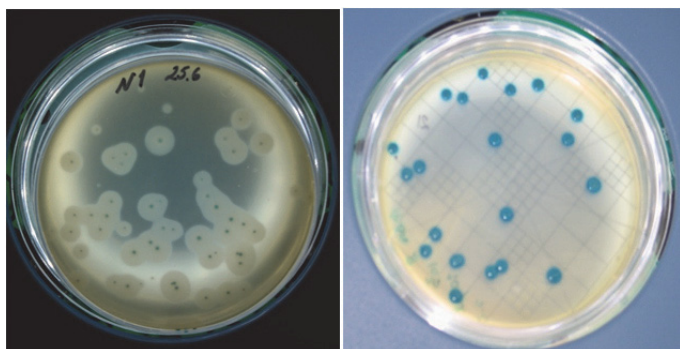
Immunomagneettisessa erottelu- ja konsentrointimenetelmässä (immunomagnetic separation, IMS, suom. IME) käytetään nanobioteknologian työkaluja: magneettisia, kooltaan 1–100 nm olevia nanopartikkeleita. Ne päällystetään kohdemikrobille spesifisillä vasta-aineilla tai muulla materiaalilla, johon kohdemikrobi tarttuu. Immunomagneettiset helmet (immuno magnetic beads, IMB) sekoitetaan rikastusliemeen, jossa inkuboitessa kohdemikrobit sitoutuvat niiden pinnassa oleviin vasta-aineisiin tai faagiproteiiniin. Koska pienten partikkelien pinta-ala/massa -suhde on suuri, saadaan pienellä tilavuudella IMB:tä nestemäiseen näytteeseen mikrobeille valtava määrä tarttumispintaa. Inkuboinnin jälkeen IMB:t kiinnitetään vahvan magneetin avulla joko putken seinämään tai kuoppalevyn pohjaan huuhtelua varten (kuva 2.). Tekniikka tekee siepattujen mikrobien tehokkaan huuhtelun ja konsentroidin helpoksi. Tekniikan on todettu vähentävän määrittämissaikoja. Jotta IMB:t toimisivat tehokkaina sieppareina, niissä käytettyjen vasta-aineiden täytyy pienissä pitoisuuksissa tehokkaasti sitoutua kohteeseensa (Nugen & Baeumner 2008).



Kuva 2. Immunomagneettisen erottamisen ja rikastamisen toimintaperiaate (kuva Pertti Marnila).

Vasta-aineet tai faagiproteiinit kiinnitetään magneettipartikkelien pintaan sopivien ligandien avulla. Yleinen tapa on käyttää streptavidinia ja biotiinia (Gilmartin & O’Kennedy 2012). Immunomagneettiseen erotukseen on kaupallisesti saatavilla valmiita kittejä, joissa nanopartikkelit on päällystetty kohdebakteerille spesifisellä vasta-aineella tai bakteerilajille spesifisen bakteriofaagin sitoutumisproteiinilla (Kretzer ym. 2007). Bakteriofaagit ovat bakteereita tappavia viruksia. Ne ovat erittäin isäntäspesifisiä pystyen infektoimaan vain saman lajin tai jopa vain tietyn kannan bakteereita. Ne tunnistavat isäntäbakteerinsa tietyn pintarakenteen avulla (Hagens & Loessner 2007). Faagien sitoutumisproteiinin ja kohdebakteerin välinen sidos on usein lujempi kuin vasta-aineen ja antigeenin välinen sidos.

IMB:llä siepatut bakteerit voidaan detektoida molekyylibiologisella, immunologisilla tai viljelymenetelmillä kromogeenisilla, selektiivisillä alustoilla, kuten ALOA-tyyppisellä (kasvatusalustan koostumus Ottavianien ja Agostinin mukaan) kiinteällä kasvatusalustalla. Esimerkiksi kromogeenisessa kasvatusalustassa Harlequin™ Listeria Chromogenic Agar (ISO) (ensisijainen eristysalusta ISO 11290 standardissa) elatusaineen selektiivisyys perustuu litiumkloridiin sekä antimikrobiologisiin yhdisteisiin (keftatsidiimi, polymyksiini, nalidiksiinihappo ja sykloheksimidi), jotka estävät muiden mikrobien kasvua. Listeria spp.:lle sekä joillekin enterokokki- ja basillilajeille tyyppillisen β -glukosidaasientsyymin läsnäolo saadaan selville kromogeenisen substraatin avulla. Elatusaineen spesifisyys perustuu *L. monocytogenes*-bakteerin fosfolipaasi-entsyymin detektoimiseen lesitiini-substraatin avulla. Entsyymien toiminnan tuloksena *L. monocytogenes*-pesäkkeiden ympärille syntyy saostuskehä. Kromogeeniset ja fosfolipaasientsyymaattiset reaktiot mahdollistavat *L. monocytogenes*-kantojen (siniset pesäkkeet, joita ympäröi saostuskehä) erottamisen muista *Listeria* spp. -kannoista (siniset pesäkkeet ilman kehää) (kuva 3.) Jotkut *L. ivanovii*-kannat voivat muodostaa saostuskehän pesäkkeen ympärille, minkä takia alustavasti identifioidut pesäkkeet pitää varmistaa biokemiallisilla testeillä.



Kuva 3. *L. monocytogenes* (siniset pesäkkeet, joita ympäröi saostuskehä) ja *L. innocua* (siniset pesäkkeet ilman kehää) kromogeenisella kasvualustalla (kuvat Tiina Väyrynen).

2.2.5. Detektointitekniikan valinta

Detektointimenetelmäksi oli mahdollista valita viljelymenetelmä, molekulaarinen tai immunologinen teknologia. Kaikissa menetelmissä vaaditaan esirikastus, rikastus tai molemmat ennen mittausta. Erilaisia teknologioita on käsitelty katsausartikkeleissa ”Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain - a review” sekä ”*Listeria monocytogenes* -patogeenin tunnistusmenetelmiä elintarviketuotannossa”. Tässä on vain lyhyesti esitetty näiden kolmen menetelmän ominaispiirteitä.

Viralliset määrittämenetelmät nojaavat pitkälti perinteisiin viljelymenetelmäpohjaisiin määrittämenetelmiin, jotka perustuvat mikrobien morfologiaan (muoto ja ulkonäkö) ja biokemiallisiin reaktioihin. Niiden etuina ovat elävien ja kuolleiden solujen erottelukyky eivätkä näytteen erilaiset komponentit häiritse määrittästä siinä määrin kuin molekulaarisissa menetelmissä. Lisäksi materiaalikustannukset sekä laitteiston ja infrastruktuurin investointikustannukset ovat suhteellisesti vähäiset. Suurimpina heikkouksina ovat menetelmien työläys ja hitaus. Lopullisen tuloksen saamiseen kuluu useita päiviä, esimerkiksi *L. monocytogenes* -bakteerin tuloksen varmistukseen kuluu lähes viikko. Menetelmän herkkyys on 1 pmy / 25 g (Jasson ym. 2010).

Molekulaariset tekniikat perustuvat DNA- tai RNA- sekvensseihin. Myös näiden menetelmien etuina ovat toistettavuus, automatisointimahdollisuus ja mittaustuloksen saatavuus jopa muutamassa tunnissa. Jasson ym. (2010) mukaan herkkyys on 1 genomi / PCR reaktio / 10^2 – 10^3 pmy / ml. Perinteisen PCR-menetelmän heikkous on, ettei se erottele eläviä ja kuolleita soluja, koska DNA säilyy pitkään solun kuoleman jälkeen ja kuolleen solun DNA monistuu PCR:ssä, mikä johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin. Tämän estämiseksi elävät solut voidaan erottaa kuolleista käyttämällä DNA:han sitoutuvia värejä, kuten etidiumbromidi monoatsidia (EMA) ja propidium monoatsidia (PMA). Interkalatoivina yhdisteinä ne asettuvat DNA:n kaksoisjuosteiden väliin tiettyyn kohtaan sitoen ne kovalenttisesti toisiinsa. Näin juosteet eivät pysty irtautumaan toisistaan eivätkä monistu PCR-syklissä (Dwivedi & Jaykus 2011).

Nykyisin PCR:stä on olemassa monia hyviä edistyneitä analysointityökaluja, kuten kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR). Siinä PCR tuote identifioidaan fluoresoivalla leimatulla osalla, joka sitoutuu kohteeseen PCR:n aikana. Tuloksena syntyy automaattisesti luettava fluoresoiva signaali. Siten tässä menetelmässä samanaikaisesti rikastetaan ja detektoidaan/varmistetaan kohdespesifinen DNA (Dwivedi & Jaykus 2011).

Immunomäärittämenetelmät perustuvat tunnistettavan mikrobin pintarakenteeseen (antigeeni) sitoutuvaan ja sille spesifiseen vasta-aineeseen. Vasta-aineen antigeenia tunnistava osa on rakenteeltaan komplementaarinen antigeenin tunnistettavan kohdan, epitopin, kanssa ja sitoutuu siihen spesifisesti. Menetelmän etuina ovat toistettavuus ja automatisointimahdollisuus. Itse mittaustulos saadaan nopeasti, jopa muutamassa minuutissa. Menetelmän herkkyys on 10^4 – 10^5 pmy / ml (Jasson ym. 2010).

Immunomääritysmenetelmissä käytettävät vasta-aineet voivat olla mono- tai polyklonaalisia. Monoklonaaliset vasta-aineet ovat yleensä hybridomasoluissa tuotettuja rakenteeltaan homogeenisiä (molekyylikloonin) vasta-aineita. Nykyisin kyseisiä vasta-aineita voidaan tuottaa myös rekombinanttisoluissa esimerkiksi *E. coli* -bakteerissa (Byrne ym. 2009, Zeng ym. 2012). Diagnostiikassa monoklonaalisten vasta-aineiden suurin etu ja samalla rajoitus on, että ne tunnistavat vain yhden tietyn epitoopin tai antigeenideterminantin.

Polyklonaalisissa vasta-aineissa on puolestaan suuri kirjo erilaisia vasta-aineita samaa kohdetta, esimerkiksi *L. monocytogenes* -bakteeria kohtaan. Polyklonaalinen antiseerumi sisältää vasta-aineita käytännössä kaikkia kohdemikrobin immunogeenisiä rakenteita vastaan ja nämä vasta-aineet poikkeavat toisistaan vasta-ainetyypiltään (IgG1, IgG2, IgM, IgA, IgE), affiniteetiltaan (hanakkuus sitoutua), spesifisyydeltään ja reaktiivisuudeltaan. Polyklonaalinen vasta-ainevalmiste voi olla pelkkää seerumia tai se voi olla puhdistettu affiniteettikromatografisesti niin, että se sisältää vain yhtä vasta-aineluokkaa (proteiini A tai proteiini M) tai vain kohdeantigeenille spesifistä Ig:tä. Myös polyklonaalisten antiseerumien valmistuserät vaihtelevat em. ominaisuuksiltaan, vaikka ne olisi tuotettu samassa eläimessä ja valmistettu samalla tavoin. Vasta-aineiden laaja kirjo on toisaalta haitta, mutta elintarvikediagnostiikassa se on myös etu. Kun elintarvikkeista etsitään kokonaisia taudinaiheuttajamikrobeja, polyklonaalisesta antiseerumista tarttuu yleensä enemmän vasta-aineita yhteen mikrobisoluun kuin monoklonaalisesta, mikä tehostaa leimausta. Patogeeneissa on geneettistä vaihtelua, ne mutatoituvat ja monet vaihtavat geenejä keskenään. Polyklonaalinen vasta-aine löytää myös muuntuneet patogeenit. Jos monoklonaalisia vasta-aineita käytetään elintarvikevalvonnassa, vasta-aineen on oltava suunnattu sellaista elintärkeää (konstitutiivisesti ekspressoitua) rakennetta kohtaan, joka olisi spesifinen etsitylle bakteerille, jonka rakenne on hyvin pysyvä ja jonka mutaatio aiheuttaisi bakteerin kuoleman. Toisaalta monoklonaalisen vasta-aineen avulla saadaan tunnistettua tietty vain tietylle haitallisella bakteerikannalle ominainen epitooppi, jolloin esimerkiksi *L. monocytogenes* saadaan tunnistettua ilman, että muut ihmisille harmittomat *Listeria*-lajit (esimerkiksi *L. innocua*) aiheuttaisivat positiivisen testituloksen. Toistaiseksi monoklonaaliset vasta-aineet ovat olleet kalliita polyklonaalisiin valmisteisiin verrattuina.

Kehitystyön ensimmäisessä vaiheessa päätettiin käyttää polyklonaalisia vasta-aineita ja seuraavassa vaiheessa monoklonaalisia vasta-aineita.

2.2.6. Detektointileimat

Kaupallisesti on saatavilla laaja valikoima erilaisia vasta-aineleimoja: elektroaktiivisia, kemi-, bio- ja termoluminesoivia, samentavia, säteileviä, hapettavia, fosforoivien ja fluoresoivien yhdisteiden joukosta. Jokaisen leimatyyppin joukossakin on paljon vaihtoehtoja, joista jokaisessa on hyvät ja huonot puolensa.

Yleisimmin detektointiin käytetään entsyymileimoja. Menetelmää kuvataan tyyppillisesti ELISA-nimityksellä (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Niistä tavallisimpia ovat perinteiset alkalinen fosfataasi- (värireaktio) ja peroksidaasileimat (väri- ja luminesenssi). Hyvällä entsyymileimalla on korkea affiniteetti myös substraatin alhaisilla pitoisuuksilla (matala K_m). Sen on oltava stabiili vasta-aineen sitoutumisen vaatimissa olosuhteissa (esim. ~neutraali pH) ja se pitää saada sidottua helposti glykoproteiineihin konjugaateiksi, jotka ovat stabiileja säilytyksessä ja reaktio-olosuhteissa. Lisäksi entsyymileiman tulisi mieluiten olla pienikokoinen steeristen esteiden minimoimiseksi, eikä sitä saa esiintyä yleisesti näyttemateriaaleissa tai testeissä käytetyissä biologisissa nesteissä (esimerkiksi seerumi tai maito). Entsyymiaktiivisuuden olisi oltava helposti mitattavissa normaaleilla laboratoriolaitteilla, ja leiman pitäisi olla saatavana mahdollisimman puhtaana ja hyvin säilyvässä muodossa halpaan hintaan. Mikään tunnettu entsyymileima ei täytä näitä kaikkia vaatimuksia. Valinta on aina kompromissi (Kricka 1992, Hemen & Karst 2006).

Fluoresenssileimojen käyttö diagnostikassa on yleistynyt sitä mukaa, kun uusia, entistä kirkkaampia, ominaisuuksiltaan vaihtelevia yhdisteitä on kehitetty ja kaupallistettu. Niitä on saatavilla

lukuisia erilaisia. Ideaalinen fluoresenssileima on kirkas, jolloin sillä on korkea fluoresenssi-intensiteetti (korkea viritysenenergian molaarinen absorptiokyky ja siihen nähden korkea kvanttituotto). Jotta välttyttäisiin viritysenenergian sironnan aiheuttamalta korkealta taustalta, Stokesin siirtymän olisi oltava ainakin yli 50 nm (viritys- ja emissioaallonpituusalueiden välinen ero). Leiman olisi oltava vesiliukoinen, helposti liitettävissä biologisiin molekyyliin, hyvin säilyvä, kestää aktiivisena leimausten aikana, hyvin saatavilla ja halpa. Täydellistä fluoresenssileimaa ei ole. Paljon käytettyjä ovat orgaaniset leimavärit, fluoreskeiini-isotiosyanaatti (FITC), umbelliferoni (kumariini), ja fytoerytriini. Leimaa valittaessa on kiinnitettävä huomiota käytössä oleviin laitteisiin. Virtausytometriassa käytetään paljon mm. Alexa Fluor -värejä. Osa kirkkaimmista leimoista vaatii virittyäkseen laserin, ja niitä käytetään paljon virtausytometriaan perustuvissa analyyseissä. Lupaava uutuus fluoresenssileimojen kehityksessä ovat nanoteknologian työkalut, ns. kvanttipistevärit, Quantum dot -leimat (Qdots) (Nakamura 1992a, Hemen & Karst 2006).

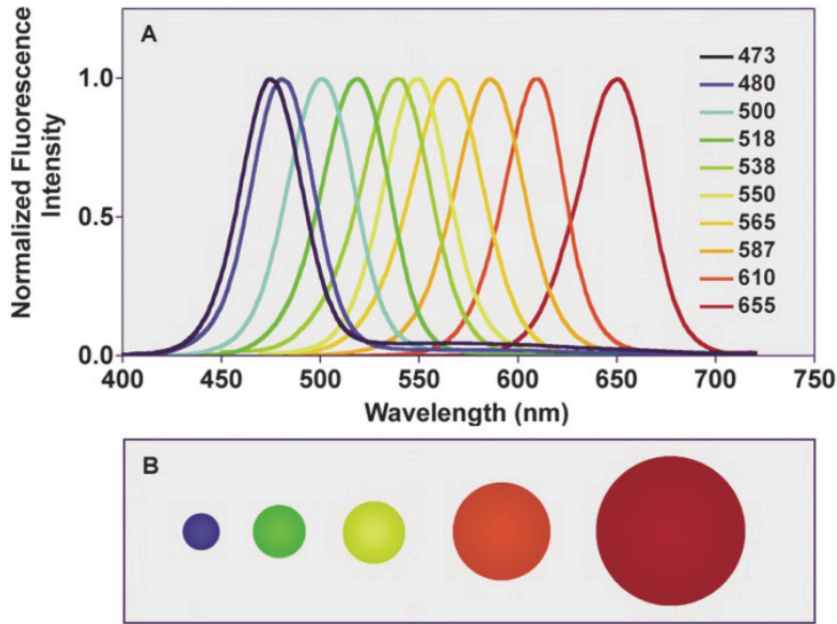
2.2.7. Valitut teknologiat

Edellä esitetyn vertailun mukaan molekulaarisella teknologialla päästään parhaaseen herkkyyteen. Toisaalta elintarvikkeen sisältämät monenlaiset komponentit häiritsevät sitä enemmän kuin immunologista teknologiaa. Kehitystyössä molekulaarinen teknologia (real time PCR) valittiin vertailuteknologiaksi. Varsinaiseksi detektointiteknologiaksi valittiin immunofluoresenssi osittain siksi, että testin haluttiin soveltuvan myös hankkeessa kehitettävälle detektorille.

Fluoresenssileiman valintaan vaikuttivat kehitettävän biodetektorin vaatimukset: optinen mitta-
us (fluoresenssi) siten, että fluoroforin eksitaatioaallonpituus on 360 nm, emissioaallonpituus mieluiten lähempänä infrapuna-aluetta ja fluoroforin virittyminen LED:llä (Light Emitting Diode). Detektointitekнологian täytyi myös soveltua pikadiagnostiikan työkaluksi. Lisäksi biodetektorin toimivuutta täytyi pystyä vertaamaan kaupallisella laitteella samanlaisissa olosuhteissa.

Immunologisista teknologioista päädyttiin ELISA-tyyppiseen vasta-aineleimaukseen, jossa kohdeantigeenin päätepistemittaus perustuu fluoresenssivärillä leimattuun vasta-aineeseen (Yang ym. 2014). Koska projektissa tavoitteena ylipäätään oli hyödyntää nanoteknologian tarjoamia mahdollisuuksia, fluoroforeiksi valittiin Quantum dot -värit.

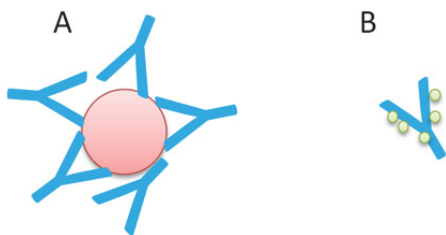
Quantum dot -värit (Qdot) ovat kirkkaasti fluoresoivia, kolloidisia, epäorgaanisia puolijohdeita ja kooltaan 2–20 nm siten, että partikkelin koko kasvaa emissioaallonpituuden kasvaessa (kuva 4.). Ne koostuvat puolijohdeytimestä (esimerkiksi kadmium yhdistettynä seleeniin tai telluriittiin), joka on päällystetty kvanttituottoa lisäävällä kuorella (tavallisesti sinkkisulfidi).



Kuva 4. Kvanttipistevärit eli Quantum dot –leimavärit ovat kooltaan 2–20 nm siten, että partikkelin koko kasvaa emissioaallonpituuden kasvaessa. Kuvassa on esitetty CdSe-ytimisten kvanttipistevärien fluoressentsispektrit (A) ja suhteelliset partikkelikoot (B) vasemmalta oikealle partikkelien läpimitta 2.1 nm, 2.5 nm, 2.9 nm, 4.7 nm, ja 7.5 nm (Kuvan lähde: Smith A.M. & Nie S. 2004).

Qdotit kehitettiin alun perin biologiseen kuvantamiseen (Michalet ym. 2005), ja niitä käytetäänkin tällä hetkellä korvaamaan perinteisiä orgaanisia värejä esimerkiksi immunohistokemiassa (Medintz ym. 2005, Pinaud ym. 2010, Byers & Hitchman 2011). Qdottien etuna perinteisiin orgaanisiin väreihin, kuten FITC:iin, verrattuna on hyvä valonkestävyys ja kirkkaus. Orgaaniset fluoressentsivärit tyypillisesti palavat loppuun nopeasti (photobleaching) esimerkiksi mikroskoopilla tarkastelun aikana. Qdotit kestävät valaisua jopa tunteja.

Jotkin Qdotit ovat jopa 100 kertaa kirkkaampia kuin FITC (Resch-Genger ym. 2008). Qdottien avulla vasta-aineteesteissä ei normaalisti kuitenkaan saada 100 kertaa suurempia fluoressentsignaaleja kuin orgaanisilla väreillä. Syynä on se, että vaikka Qdotit ovatkin nanokokoisia, ne ovat silti kooltaan kertaluokkaa suurempia kuin monet orgaaniset väriaineet. Tämä voi aiheuttaa steerisiä ongelmia. Orgaanisten värien pieni molekyylikoko sallii usean värimolekyylin tarttumisen yhteen vasta-aineeseen, kun taas yhteen Qdottiin voi tarttua useampi vasta-aine (kuva 5.) (Resch-Genger ym. 2011). Yhtä tarttunutta vasta-ainetta kohden on Qdotteja paljon vähemmän kuin orgaanisia leimamolekyylejä.

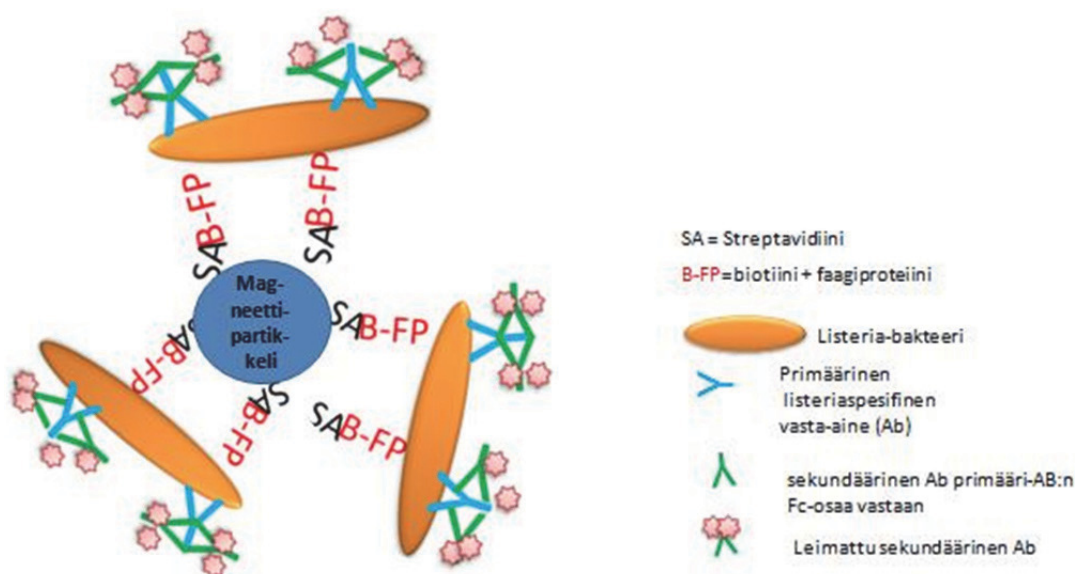


Kuva 5. A) Vasta-aineen (>) ja Qdot -värin (●) konjugaatti ja B) orgaanisella värillä (●) leimattu vasta-aine (kuva muokattu lähtestä Resch-Genger ym. 2008).

Elintarvikediagnostiikassa Qdoteilla on merkittäviä etuja. Qdotit ovat fluoresoivia laajalla pH-alueella, mikä lisää niiden käytettävyyttä. Orgaanisiin väreihin verrattuna Qdottien eksitaatioalue on saatu kauaksi emissioaallonpituudesta, jolloin näytteiden muiden komponenttien taustafluoresenssi pienenee. Emissioaallonpituus riippuu Qdottien koosta, joten emissiohuiput pystytään saamaan halutuiksi. Emissioaallonpituusalueen leveys taas riippuu Qdot-partikkelien kokojakaumasta. Eksitaatiovalon aallonpituuden saa leveäksi, ja emissioaallonpituudet kapeiksi, jolloin on mahdollista käyttää monia eri eksitaatioaallonpituuksia. Leveän eksitaatio- ja kapean symmetrisen ja säädettävän emissiospektrin ansiosta testissä voi käyttää useita eri Qdot-värejä yhtä aikaa ja näin mitata samasta näytteestä useaa eri yhdistettä samalla kertaa (multiplexing) (ks kuva 4.). Testissä voi olla omalla Qdot-leimalla kongugoidut vasta-aineet eri elintarvikepatogeeneille. Ne kaikki virittyvät samalla aallonpituudella ja fluoresoisivat kukin omalla aallonpituudellaan, joka voidaan lukea esimerkiksi virtaussytometrillä tai koko spektrin lukevalla mittalaitteella (diodirivillä varustetut lukijat) (Zhao ym. 2009, Wang ym. 2012, Cho ym. 2014). Näistä syistä Qdotit valittiin kehitettävän testausteknologian fluoressileimoiksi.

2.3. Biosensoritutkimukseen liittyvä kehitystyö

L. monocytogenes -bakteerin mikrobiologinen analysointimenetelmä perustuu nanobioteknologian työkaluihin ja optoelektroniikkaan. Kehitetystä menetelmästä bakteerit rikastetaan selektiivisessä kasvatusliemessä (rikastus). Spesifisyyttä lisäävänä ja kasvatusaika lyhentävänä erottelu- ja konsentroidintimenetelmänä käytetään immunomagneettista erotusta (IME). Siinä nanokokosiin magneettihelmiin liitetään streptavidini-biotiini-sidoksella kohdemikrobille spesifinen vasta-aine tai muu materiaali, johon kohdemikrobi tarttuu. Sen jälkeen kompleksiin kiinnitetään primäärinen vasta-aine ja sekundäärinen vasta-aine, johon on konjugoitu fluorofori (detektointi) (kuva 6.). Fluoroforina käytetään kolloidista puolijohdetta, kvanttipisteväriä, Qdot. Kyseisen leiman ominaispiirteiden ja fluoresenssin kirkkauteen vaikuttavien seikkojen tulokset on selvyden vuoksi esitetty omana kappaleenaan. Fluoresenssi mitataan ultraviolettilediin ja fotodiodiin perustuvalla biodetektorilla (kappale 2.4.).



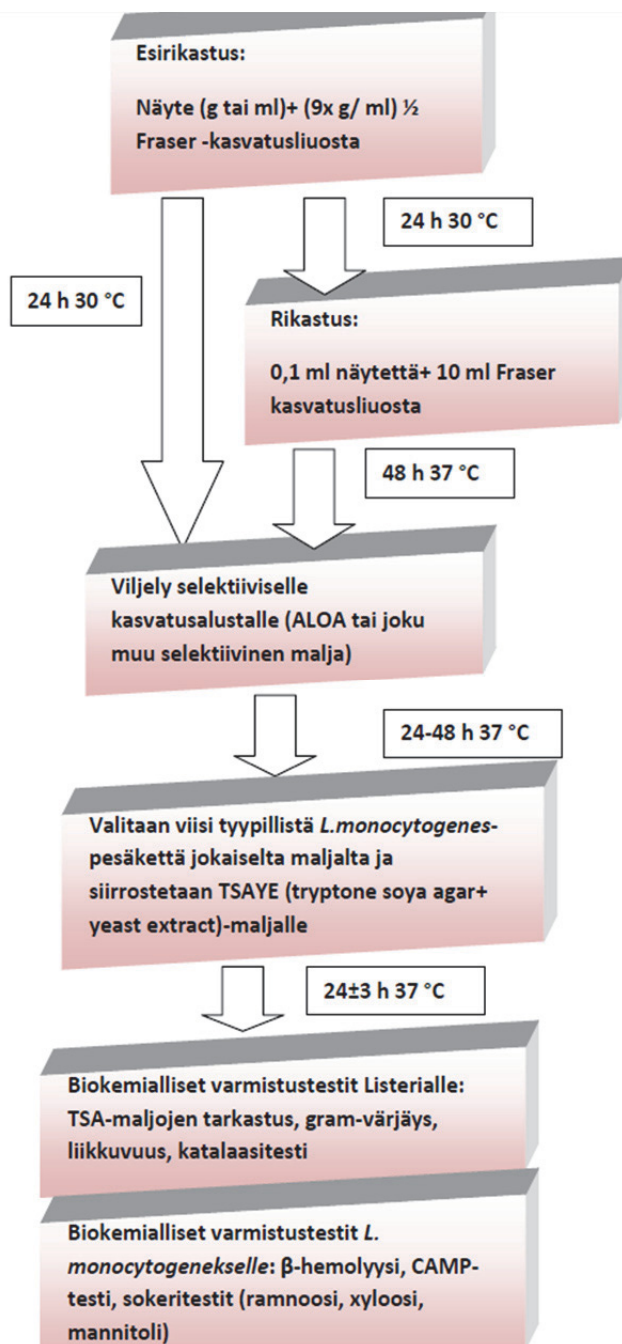
Kuva 6. Havaintokuva IME + primäärinen vasta-aine + sekundäärinen vasta-aine, johon on konjugoitu fluorofori.

2.3.1. Vertailumenetelmät

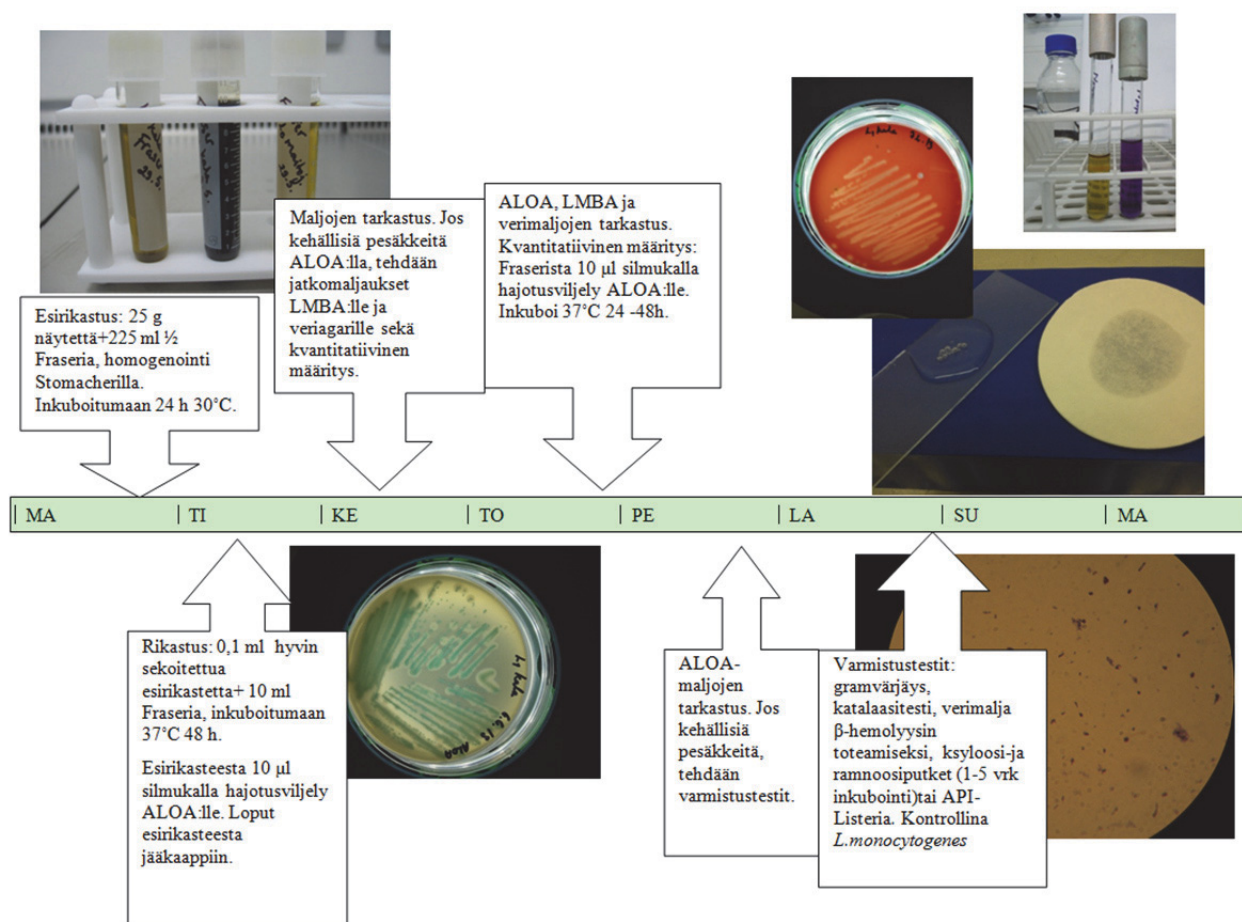
ISO-standardin mukaiset vertailumenetelmät

Kehitystyön tavoitteena oli lyhentää analysointiaikaa merkittävästi vertailumenetelmään (kuva 7.) verrattuna. Jotta käytössä olisi virallinen analysointimenetelmä, käytännössä ymmärrettäisiin vertailumenetelmään kuuluva aika ja sen monivaiheisuus, ISO standardin mukainen vertailumenetelmä testattiin *L. monocytogenes* -bakteerille yhteistyössä Oulun ympäristöterveyslaboratorion kanssa Eviran *Listeria monocytogenes* -bakteerin kvalitatiivisen määrittämisen menetelmäohjeen 3463/6, *Listeria monocytogenes* -bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen (Evira 3463/6) mukaan. Se perustuu seuraaviin standardeihin NMKL 136:2010, ISO 11290-1:1996, muutoslehti 1:2004; muunnos (muunnos perustuu prISO/TS11290-1:2011) (1/2- Fraser 30 °C / 24 h, ALOA ja LMBA 37 °C / 24-48 h; Fraser 37 °C / 48 h, ALOA ja LMBA 37 °C / 24-48 h, naudanveriagar 37 °C / 24 h, β-hemolyysi; katalaasikoe ja gramvärjäys valinnaisena, ramnoosi- ja ksyloosiliemi 37 °C / 1-5 vrk / API Listeria). Erot ISO standardiin (ISO 11290-1:1996, muutoslehti 1:2004) ovat: tyyppilliset pesäkkeet puhdasviljellä TSYE:n sijasta naudanveriagarille, puhdasviljelmät katalaasikoetta varten viljellä naudanveriagarille, gramvärjäys ja katalaasikoe tehdään vain, mikäli tyyppitystulos ei ole yksiselitteinen eikä liikkuvuus- ja CAMP-koetta tehdä. Kvantitatiivinen määrittäminen tehtiin seuraavan Eviran menetelmäohjeen mukaan: 3477/2 *Listeria monocytogenes* -bakteerin määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka perustuu seuraaviin standardeihin: NMKL 136:2007, korjauslehtinen 2008; muunnos ISO 11290-2:1998, muutoslehti 1:2004, muunnos (muunnos perustuu CEN/TC275/WG6/Doc. No 0449:WD 11290-2, April 2009).

Testauksia tehtiin sekä kvalitatiivisella että kvantitatiivisella menetelmällä. *Listeria*-bakteerin osoitusmenetelmässä näytteinä olivat jauheliha, kylmäsavustettu kala sekä maitojauhe. Kuvassa 8. on *L. monocytogenes* -bakteerien osoittaminen kuvattuna Eviran mukaisella standardimenetelmällä.



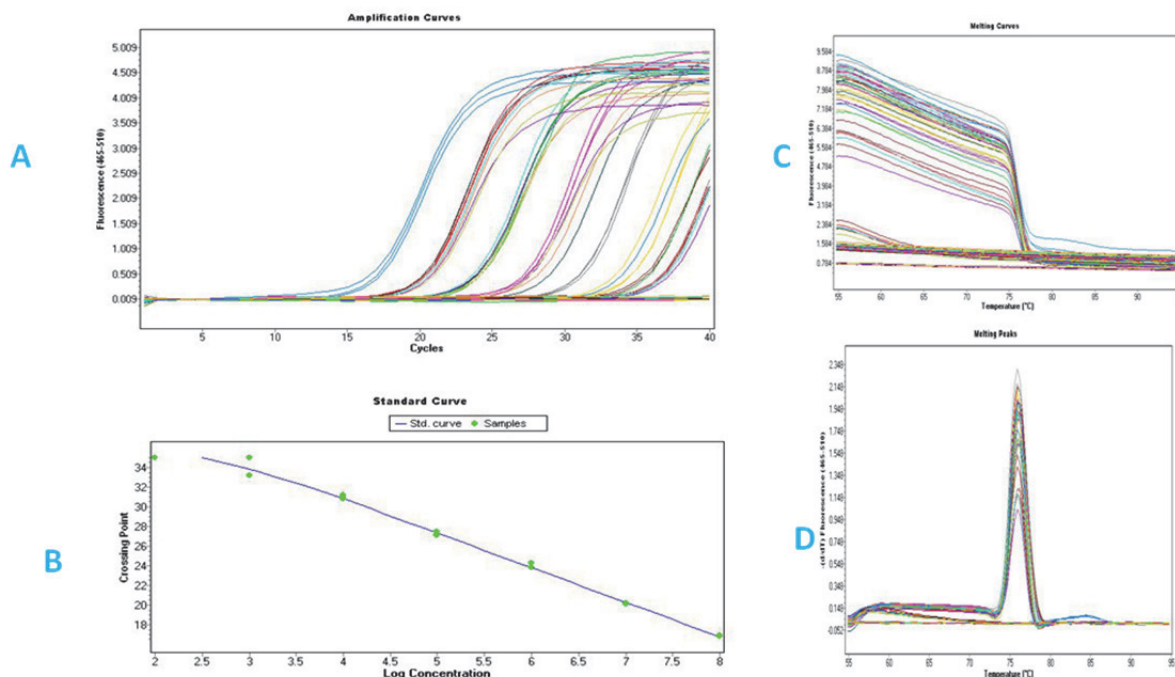
Kuva 7. *L. monocytogenes* -bakteerin ISO-vertailumenetelmä kaaviokuvoin esitettyinä (muokattu lähteestä Jasson ym. 2010)



Kuva 8. *L. monocytogenes* -bakteerin osoittaminen Eviran ISO-standardin mukaisen menetelmäohjeen 3463/6 mukaan. Aikajanalla kuvattuna konkrerisoituu määrittäykseen kuuluva aika ja sen monivaiheisuus (kuva Tiina Väyrynen).

Listeria monocytogenes -bakteerin määrittäminen PCR-tekniikalla

Biosensorimittausten tulosten varmentamiseksi hankkeessa kehitettiin polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuva standardidiagnoosi-menetelmä. Optimoidut PCR-menetelmät tunnistavat *L. monocytogenes* -bakteerin niin perinteisellä tavalla (PCR-tuotteen tunnistus agarosigeelillä) kuin reaaliajassa (reaaliaikainen-PCR). Menetelmiä käytettiin varmentamaan biosensorikehitystyössä tehtyjen soluviljely- ja immunologisten kokeiden tuloksia. Alla esitetyt tulokset ovat saatu LightCycler 480 II Real Time PCR laitetta ja sen mukana tullutta analyysiohjelmistoa (Roche) käyttäen (Kuva 9.). PCR-tuotteen monistus- ja sulamispistekäyrät antavat ymmärtää että *L. monocytogenes* -bakteeri on yksiselitteisesti tunnistettu muiden näytteessä olleiden bakteerien seasta (Kuva 9. A ja C). Sulamishuipukäyrässä oleva yksittäinen, terävä ja voimakas huippu on varmennus sille että *L. monocytogenes* -spesifi DNA-tuote on monistettu ilman epäspesifisiä DNA-tuotteita muista lähteistä (Kuva 9. D).



Kuva 9. Reaaliaikainen *L. monocytogenes* -bakteerin tunnistus pilaantuneesta jauhelihanäytteestä tehdystä solurikastusviljelmästä käyttäen SYBR Green I kemialla, jonka kohteena oli 112 nukleotidiparin mittainen *L. monocytogenes* -bakteerin hlyA-listeriolysingeenin osa. SYBR Green I menetelmällä saadaan sekä PCR-tuotteen monistusmäärää ajan funktiona kuvaava käyrä (A) että sen sulamispisteen analyysikäyrät (C ja D). Standardisuora (B) saadaan sarjalaimentamalla *L. monocytogenes* -solunäytteestä. Sulamispistekäyrästä (C) nähdään havaitun fluoresenssin määrän muutos kun kaksoisjuosteiseen DNA-tuotteeseen takertunut fluoresoivassa tilassa oleva SYBR Green -värimolekyylä vapautuu ei-fluoresoivaan muotoonsa DNA-tuotteen kahden juosteen erkaantuessa toisistaan lämpötilaa nostettaessa. Kun kaksoisjuosteista DNA:a ja siihen sitoutunutta SYBR Green I -värimolekyylä lämmitetään asteittain, yhtäkkäinen fluoresenssin määrän lasku havaitaan kun PCR-tuotteen sulamispiste (T_m) saavutetaan (C). Sulamishuippuanalyysissä nähtävä ainut terävä huippu (D) varmentaa että reaaliaikaisessa reaktiossa havaittu fluoresenssi on peräisin halutusta tuotteesta eikä epäspesifistä tuotteesta tai alukedimeereistä.

2.3.2. Näytteen esikäsittely

Näyte voidaan homogenoida sekoittajalla, (keittiön) yleiskoneella, laboratoriohomogenisaattorilla, kryogeenisellä myllyllä, roottorimyllyllä tai morttelilla. Sopiva homogenointimenetelmä valitaan elintarvikekohtaisesti. Mehuilla ja oluilla riittää sekoitus käsin (FDA 2008). Koska kehitystyön tavoitteena oli saada koko prosessi myöhemmin automatisoitua, sopivin tapa oli käyttää laboratoriohomogenisaattoria. Sitä käytetään myös virallisissa vertailumenetelmissä. Eripituisia homogenisointiaikoja ei testattu, sillä stomacher-tyyppisellä homogenisaattorilla on todettu yhtä hyvä *L. monocytogenes* -bakteerin saanto käyttäen 30 sekunnin – 5 minuutin homogenointiaikoja (Dickson 1990).

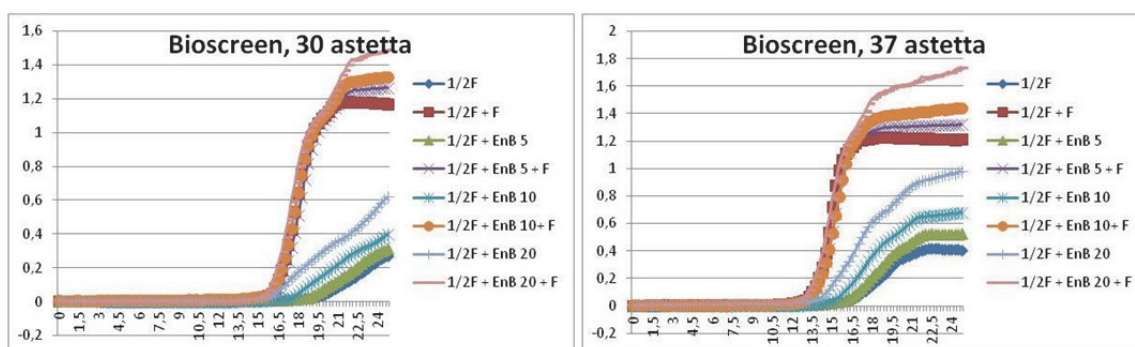
Määrittystä haittaavat tekijät, kuten vasta-aineiden sitoutumista häiritsevät rasvat, muut partikkelit tai nukleinihappojen monistusta vaikeuttavat hiilihydraatit, on poistettava ennen näytteen jatkokäsittelyä. Suodatuksessa käytettiin stomacheriin sopivaa suodatinta, jossa neste mahdollisine mikrobeineen ja kiinteät ainesosat erottuivat toisistaan.

2.3.3. Rikastus kasvatusliemissä

Rikastuksen tavoitteena oli löytää optimaaliset kasvuolosuhteet (= kasvatusmedian ja kasvatuslämpötilan ja -ajan yhdistelmä), jossa kasvun käyntiin lähdön viive lyhenee ja/tai kasvu on nopeinta. Tavoitteen saavuttamiseksi testattiin erilaisia selektiivisiä kasvatusmediumieja sellaisenaan tai modifioituna (vertailumenetelmän (ISO/Evira), vaihtoehtoisen pikamenetelmän mukaiset: ½ Fraser ja LX broth) sekä ei-selektiivisiä alustoja sellaisenaan tai modifioituna. Optimaalisten kasvuolosuhteiden seurantamenetelmäksi valittiin Bioscreen C-automaattilaitteisto, koska sillä voi tarkastella useita vaihtoehtoja samanaikaisesti. Tulokset vaativat kuitenkin aina varmistuksen viljelymenetelmällä. Kasvatusalustat testattiin *L. innocua* -kannalla.

Testattaessa lämpötilan vaikutusta kasvuun voidaan yleistettynä todeta, että *L. innocua* -bakteerin kasvuun vaikutti enemmän lämpötila kuin käytetyt kasvatusmediumit. Kuvassa 10. näkyy noin 3 tuntia nopeampi kasvu 37 °C:ssa 30 °C:een verrattuna.

Rautasitraatin on aiemmissa tutkimuksissa todettu edistävän kasvua (Cowart & Foster 1985). Tässä hankkeessa tehdyissä testeissä saatiin vastaava tulos (ks. kuva 10., mm. ½ F + F). Fluoresenssiin perustuvissa immunologisissa menetelmissä, kuten VIDAS-menetelmässä, sen on kuitenkin todettu haittaavan määrittystä (toimittajan tiedonanto), joten sitä päätettiin olla käyttämättä tässä kehitystyössä.

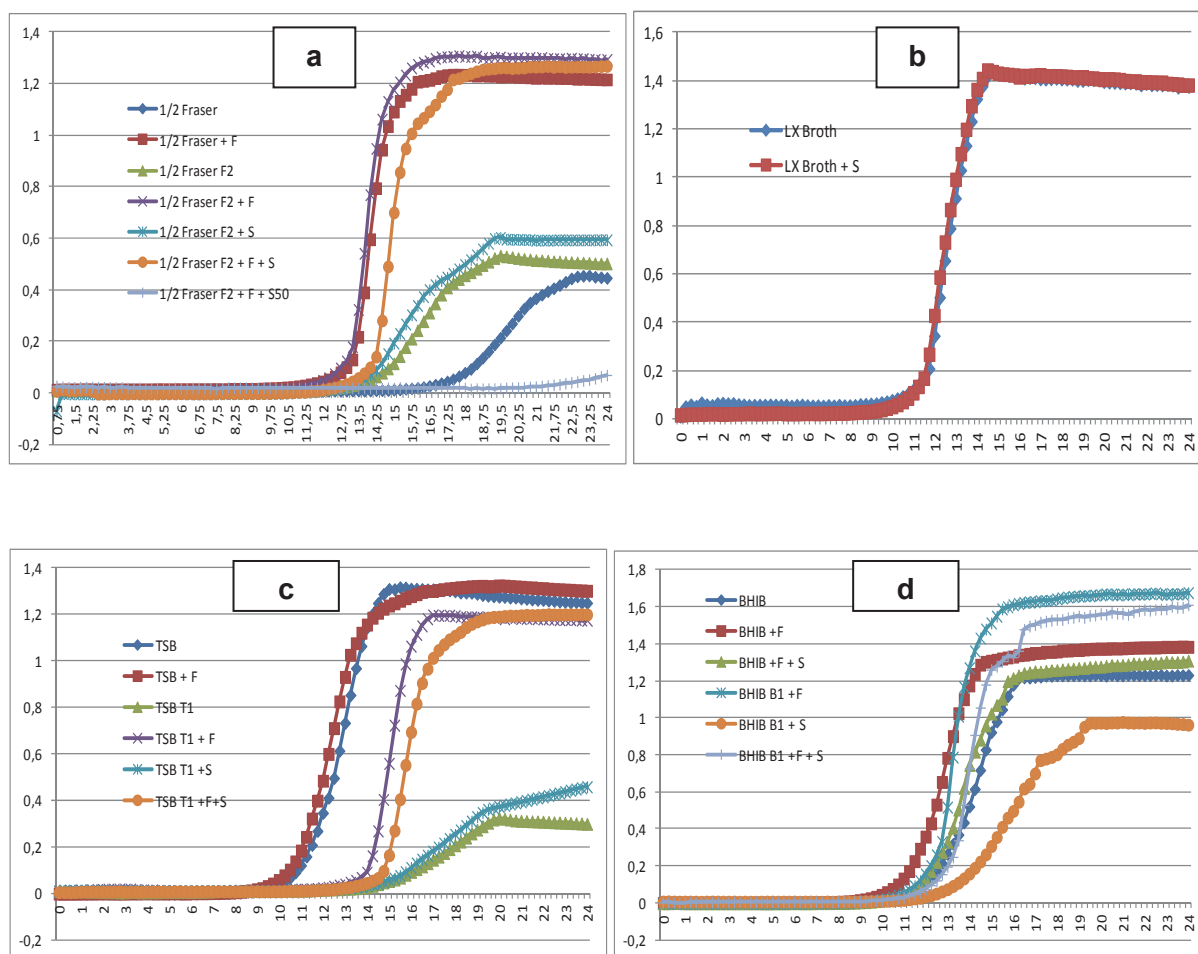


Kuva 10. *L. innocua*-bakteerin kasvu on noin 3 tuntia nopeampaa 37 °C:ssa (oikea) 30 °C:een (vasen) verrattuna.

Listerialle tarkoitetut selektiiviset kasvatusalustat, kuten Fraser, perustuvat tiettyjen antibioottien aikaansaamaan muiden lajien kasvunestoon ja listerialajeille ominaiseen kykyyn hydrolysoida eskuliinia. Myös enterokokeilla on eskuliinin hydrolysointikyky. Enterokokkien kasvun estämiseksi käytetään litiumkloridia väärien positiivisten tulosten estämiseksi. Rautaionit reagoivat eskuliinin hydrolysointituotteen kanssa muodostaen mustan värin, joka on merkki listerioiden läsnäolosta (Fraser & Sperger 1988).

Fraserin koostumukseen perustuvat kaupalliset kasvatusalustat voivat poiketa toisistaan listerioiden kasvunopeuden suhteen. Esimerkiksi LX brothissa (sisältää rautasitraattia, vaihtoehtoisen pikamenetelmän mukainen) kasvu on nopeampaa kuin ½ Fraserissa (vertailumenetelmän mukainen) (kuva 11a ja 11b).

Selektiivisissä kasvatusalustoissa on muiden lajien kasvua estäviä kemikaaleja ja antibiootteja, jotka voivat hidastaa myös listeria-bakteerien kasvua. Tämä voidaankin todeta vertailemalla ½ Frasieria ja TSB:tä (Tryptone Soy Broth) tai BHIB:tä (brain heart infusion broth) toisiinsa (kuvat 11a ja 11c, 11d).



Kuva 11. a, b, c ja d. Selektiivisten (1/2 Fraser, LX broth) sekä ei-selektiivisen kasvatusalustan (TSB, BHIB) vaikutukset *L. innocua* -bakteerin kasvuun 37 °C:ssa.

Kasvatusmediumeista rikastuksessa valittiin käytettäväksi BHIB sekä ½ Fraser, koska se on ISO/Evira -vertailumenetelmän mukainen. Lisäksi siitä oli saatavissa rautasitraatiton vaihtoehto. Rautasitraatti häiritsee immunologisia fluoresenssin perustuvia määrytyksiä. LX broth olisi ollut kasvuominaisuuksiltaan parempi vaihtoehto, mutta se sisältää rautasitraattia. Lisäksi se oli kalliimpaa ja saatavissa oli vain tietyn kokoisia, kerralla käytettäviä, valmiita nestepakkauksia, jotka vanhentuvat nopeasti jauheeseen verrattuna.

Kasvatuslämpötilä (30 tai 35–37 °C) määräytyi käytettävän immunomagneettisen erottelutekniikan mukaan. *L. monocytogenes* -bakteerin optimikasvulämpötilä on 30–37 °C (Junttila ym. 1988). Sen solun ympärillä on kuusi flagellaa, joista jokainen koostuu tuhansista flagelliineista. Muista bakteereista poiketen sen flagellojen biosynteesi on lämpötilasta riippuvainen siten, että 37 °C:ssa suurin osa *L. monocytogenes* -bakteereista ei tuota flagelloja, kun taas 30 °C:ssa ja sen alapuolella flagelloja muodostuu (Peel ym. 1988, Shen ym. 2006). Kyseinen seikka vaikuttaa kasvatuslämpötilän valintaan. Immunologisissa analysointimenetelmissä kasvatuslämpötilä on 30 °C, mikäli vasta-aineet on suunnattu flagellojen pintarakenteisiin. Mikäli taas tunnistus perustuu esimerkiksi solukalvon pintarakenteisiin, kasvatus 37 °C:ssa on parempi vaihtoehto; tällöin bakteerin kasvu on nopeampaa kuin 30 °C:ssa, mikä vähentää analysointiaikaa.

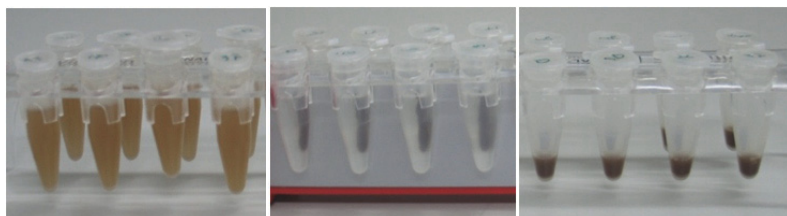
Suunnitelman mukaan kehitystyössä tarkoitus oli testata ei-selektiivisiä alustoja sellaisenaan tai modifioituna. Ohjausryhmän päätöksellä testauksia ei kuitenkaan jatkettu, koska katsottiin niihin kuluvan suhteellisesti liikaa aikaa.

2.3.4. Konsentroidi immunomagneettisella erottelulla (IME)

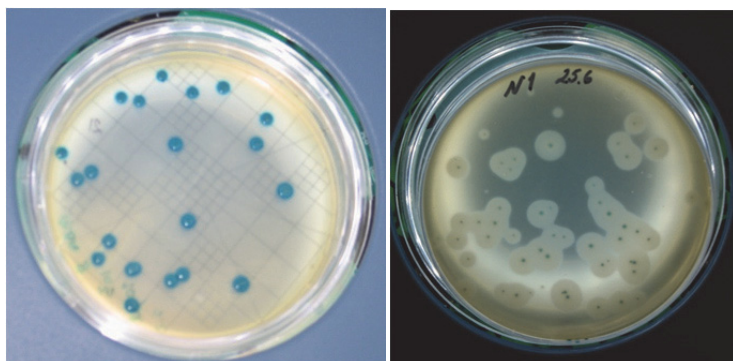
Näytteen mikrobin konsentroidimenetelmäksi valittiin immunomagneettinen erottelu (IME) ja työkaluiksi immunomagneettiset helmet (IMB). IME:n valintaan vaikutti se, että detekointia varten bakteerit haluttiin kokonaisina ja elävinä. Siten välttyttäisiin ylimääräisiltä työvaiheilta, esimerkiksi kuumentamis- jäähdytysykyiltä. Toinen valintaperuste oli se, että projektissa yhtenä tavoitteena oli käyttää nano(bio)teknologian työkaluja, joita IMB:t juuri ovat. Tässä työssä testattiin valmiita kaupallisesti saatavissa olevia sekä faagiproteiini- (faagihelmet) että vasta-ainepohjaisia (vasta-ainehelmet) listeriaspesifisiä magneettipartikkeleita.

Faagiproteiinilla päällystetyt IMB:t – testaukset elävillä soluilla

Hygloksen tuotteessa magneettihelmet oli päällystetty listeria-bakteeri-spesifisellä faagista peräisin olevalla sitoutumisproteiinilla. Menetelmän toimintaperiaate on lyhyesti seuraava: elintarvikenäytteessä olevat bakteerit rikastetaan kasvatusmediumissa (1/2 Fraser, 35 °C), josta siirrostetaan 1 ml nestettä magneettihelmiä sisältävään mikrosentrifuugiputkeen. Bakteerit kasvatettiin (1/2 Fraser, 35 °C) yön yli. *Listeria*-bakteerit tarttuvat magneettihelmiin kiinnitettyihin sitoutumisproteiineihin 30 minuutin inkuboinnin ja kevyen ravistelun aikana. Tämän jälkeen putket laitetaan magneettitelineeseen, joka kerää putkessa olevat magneettihelmet puoleensa mikrosentrifuugiputken toiselle seinämälle. Kasvatusliuos imetään varovasti mikrosentrifuugiputkesta pois. Putket otetaan telineestä pois, jonka jälkeen helmet pestään kolme kertaa pesupuskurilla. Pesujen jälkeen magneettihelmiin lisätään 100 µl pesupuskuria (kuva 12.), ja magneetteihin sitoutuneet listeria-bakteerit detektoidaan kromogeenisella agarilla (ALOA) (kuva 13.). Tulos on kvalitatiivinen (+/-), joten kromogeenisella agarilla kasvavista *L. monocytogenes* -bakteerille tyypillisistä pesäkkeistä tehdään lisäksi varmistuskokeet: β-hemolyyysin toteaminen, gram-värijäys, katalaasitesti, CAMP ja sokeritestit tai API listeria.

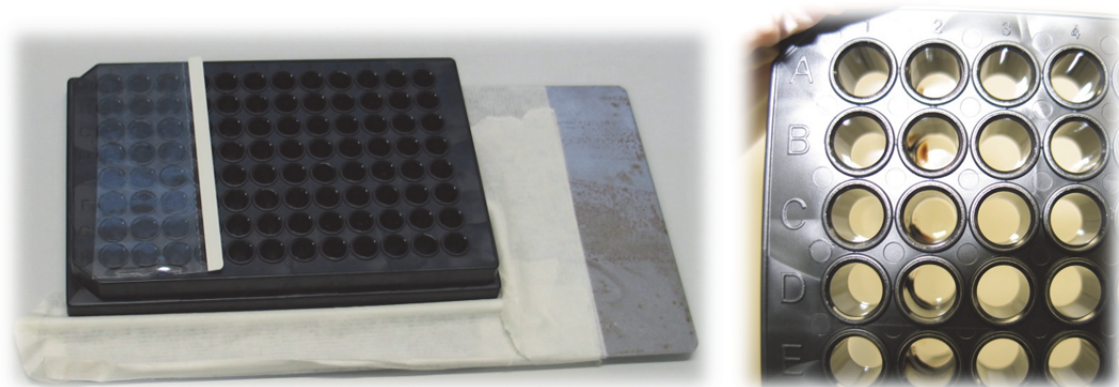


Kuva 12. Inkuboinnin jälkeen putket ovat väriltään ruskeat, sillä magneettipartikkelit ovat jakautuneet tasaisesti kasvatusliuokseen (vasen kuva). Kolmen pesun jälkeen pesupuskuri on täysin kirkasta ja läpinäkyvää. Magneettipartikkelit näkyvät selvästi putken toisella seinämällä (keskimmäinen kuva). Kuvassa oikealla näytteet ovat valmiit detektoitavaksi kromogeenisella alustalla (kuvat Anna-Liisa Välimaa).



Kuva 13. *L. innocua*- ja *L. monocytogenes* -bakteerit kromogeenisella ALOA-maljalla. Kyseiset bakteerit näkyvät sinisinä pesäkkeinä. *L. monocytogenes*-bakteereilla sinisen pesäkkeen ympärillä on kirkas kehä (kuvat Tiina Väyrynen).

Bakteerien sieppaus IME-menetelmällä toimi hyvin mikrosentrifuugiputkissa, mutta prosessi on työläs ja aikaa vievä. Automaattista erotelu-/konsentroitiprossia silmällä pitäen sekä analysointi-prosessin nopeuttamiseksi IME-menetelmän toimivuutta testattiin myös 96-kuoppalevyillä (optipla- te, musta) pienemmällä helmien näytetilavuudella kuin mikrosentrifuugiputkia käytettäessä. Helmet kerättiin kaivojen toiseen laitaan magneetin avulla ja neste pipetoitiin toisesta reunasta pois (kuva 14.). Työskentely 96-kuoppalevyn kanssa on helpompaa ja se mahdollistaa suurempien näytemäärien käsittelyn. Kaupallisesti on saatavilla kuoppalevyille sopivia magneettialustoilla varustettuja pesureita sekä ravistelijoita.

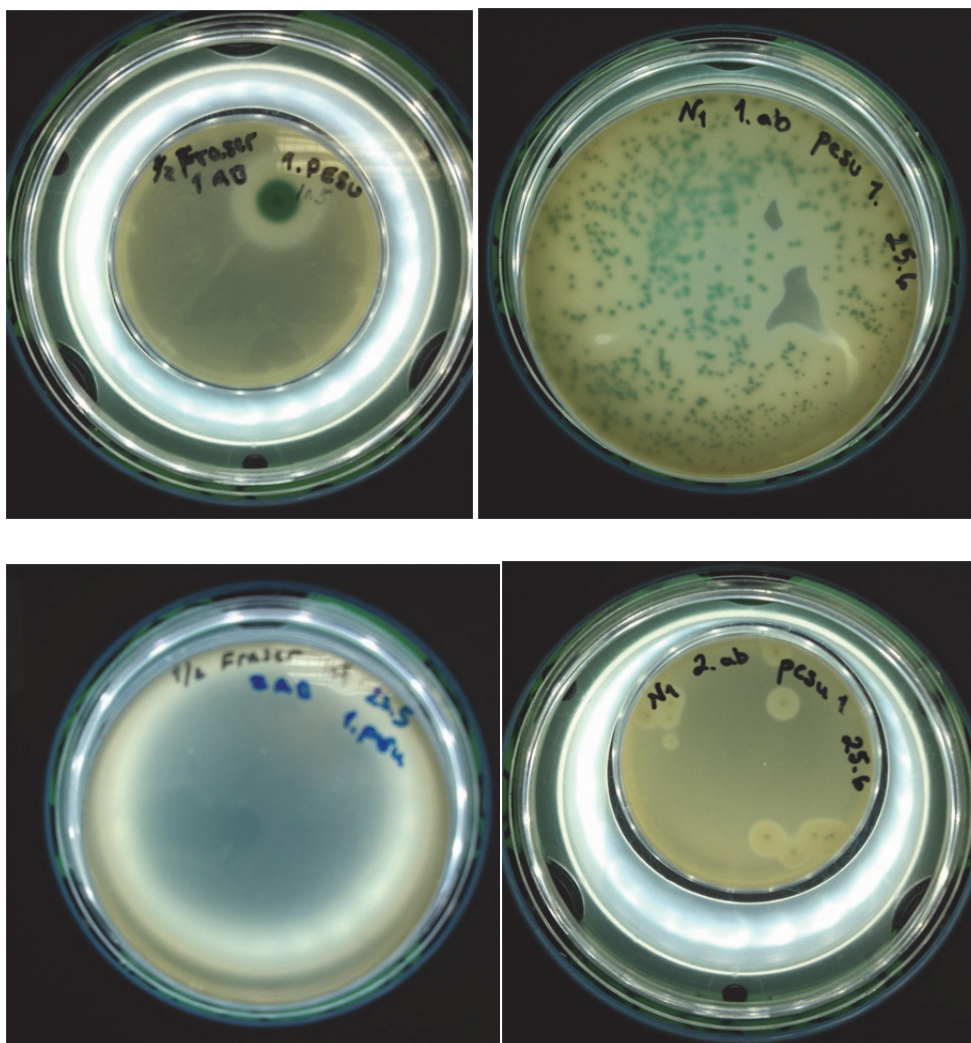


Kuva 14. Musta 96-kuoppalevy (optiplate) magneettialustan päällä (vasemmalla), ja magneettihel- met keräytyneinä kuoppalevyn kaivon reunaan (oikealla) (kuvat Tiina Väyrynen).

Faagipohjaisella listeria-spesifisellä sitoutumisproteiinilla päällystetyt IMB:t valittiin, koska niiden toimivuus erilaisilla elintarvikenäytteillä (mm. savustettu lohi, jauheliha, sini- (Roquefort) ja valkoho- me (Camembert) -juustot sekä kana- ja kaalisalaatti) tunnettiin. Lisäksi kyseiset IMB:t sieppaisivat kokonaisia, eläviä soluja. Kaupallisista vaihtoehdoista kyseiset IMB:t olivat lähimpänä tavoitetta sie- pata spesifisesti vain *L. monocytogenes* -bakteerin soluja, sillä sen lisäksi niiden ilmoitettiin sieppaa- van *L. ivanovii*-, *L. innocua*-, *Listeria welshimeri*-, *Listeria seeligeri* -lajeja, eikä määrittystä häiritseviä enterobakteereita tai monia muita bakteerilajeja. Faagi-IMB:t soveltuivat myös hyvin suunniteltuun käyttötarkoitukseen, sillä toimittajan ilmoituksen mukaan kyseisen sitoutumisproteiinin affiniteetti listeriaan on niin suuri, että sitoutumisproteiinin ja listerian välistä sidosta ei voida purkaa ilman, että kokonainen (intact) bakteerisolua tuhoutuu. Sidosta purkautuu tietyillä voimakkailla kemiallisilla käsitte- lyillä, mutta ei puskureissa pH-alueella. Menetelmän määrittäjä ilmoitti 1 pmy / 25 g näytet- tä (Hyglos 2011). Virallisessa *L. monocytogenes* -bakteerin vertailumenetelmässä ISO 11290 määri- tysrajaksi ilmoitetaan <1 pmy/25 g (ISO 2004a,b). Näin ollen vertailumenetelmän herkkyystaso olisi mahdollista saavuttaa. Lisäksi sieppaustehokkuus olisi korkea 94 – 100 %; pesuvaiheissa ei siten irto- aisi merkittävää määrää bakteerisoluja (Schütz & Heed)

Koska faagipohjainen IMS-menetelmä oli validoitu toisella kasvatusmediumilla (LX Broth), niiden toimivuutta, kykyä siepata listeria-bakteereita testattiin bakteerien sekapopulaatiolla (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella abony*, ½ Fraserissa) käyttäen maitojauhetta näytematriisina.

½ Fraser sisältää litiumkloridia, jonka aiheuttama fluoresenssi saattaisi häiritä detektointia, min- kä vuoksi se ei soveltuisikaan rikastusmediumiksi. Sen vuoksi sieppaustehokkuutta testattiin myös käyttämällä rikastuksessa BHIB-kasvatusliuosta. Testausten tulosten mukaan pesuvesiin mahdollisesti irtoavien listeria-bakteerien määrä oli todella vähäistä käytettäessä ½ Fraser-kasvatusliuosta. Sen sijaan BHIB-kasvatusliuosta käytettäessä bakteereja irtosi varsinkin vasta-ainelisäysten pesuvaiheissa huomattavasti enemmän (kuva 15.).



Kuva 15. Bakteerien irtoaminen vasta-ainelisäysten pesuvaiheissa. $\frac{1}{2}$ Fraser-kasvatusliuosta (vasen) käytettäessä bakteereita ei irronnut juuri ollenkaan, kun taas BHIB-kasvatusliuosta käytettäessä irtoaminen oli voimakkaampaa.

Testausten mukaan listeria-bakteerit pysyivät kiinni magneettihelmissä ja säilyivät elinkelpoisina; ne pystyttiin havaitsemaan ALOA-agarilta kasvatuksen jälkeen. Testauksia tehtiin puhdaskannoilla sekä elintarvikkeisiin inokuloituilla listeria-bakteereilla.

Faagiproteiinilla päällystetyt IMB:t – testaukset tapetuilla soluilla

Alkuperäisen mikrobittunnistuskonstruktiin mukaan siepattujen ja vasta-aineleimattujen bakteerien haluttiin pysyvän kokonaisina, elävinä soluina. Testauksissa magneettihelmien todettiin sieppaavan kokonaisia listeria-bakteereita, mutta vasta-aineiden kiinnittyminen näihin bakteereihin ei ollut riittävää. Magneettipartikkelit saattoivat streerisesti estää vasta-aineleimausta. Sen vuoksi kokeiltiin bakteerin DNA:n ja vasta-aineiden vapauttamista supernatanttiin kuumennuskäsittelyn (95 °C) ja pH-syklin avulla (Wall ym. 2013).

Bakteerin DNA:n vapautuminen supernatanttiin kuumentamiskäsittelyn (95 °C) jälkeen todettiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) ja vasta-aineiden vapautuminen VIDAS-menetelmällä. PCR-tulosten mukaan bakteerin DNA:ta saatiin vapautettua supernatanttiin kuumennuskäsittelyllä. Testauksessa mukana olleilla BPW- ja PBS-puskureilla tai sekoituksella ei havaittu eroja DNA:n irtoamiseen.

VIDAS-menetelmällä ei saatu positiivista tulosta, sillä bakteerimäärä oli testissä liian pieni (10^3 pmy/ml). VIDAS- menetelmän herkkyys ei siten riitä kyseiselle bakteerimäärälle. Elintarvikkeesta riippuen VIDAS- menetelmässä tarvitaan $10^5 - 10^6$ pmy/ml *L. monocytogenes* -bakteerisolua positiivisen tuloksen saamiseksi, mikä tarkoittaa noin 12 h:n rikastusaikaa (Ueda & Kuwabara 2010). Testaus-ten mukaan PCR siis osoittautui merkittävästi herkemmäksi määritysmenetelmäksi kuin VIDAS.

Leimauksessa käytettyjen vasta-aineiden irrottamista faagihelmiin sitoutuneista bakteereista testattiin pH-käsittelyllä. pH:n laskeminen 2–3:een ja nosto takaisin neutraaliin on yleinen menetelmä sitoutuneen vatsa-aineen eluoimiseen. pH-käsittely oli hellävarainen, jotta Qdot eivät inaktivoituisi (pH 7.3:sta → pH 2.7 (5 min) → pH 7.3). Tämä käsittely irrotti 42 % vasta-aineista (mitattuna irronneen leiman fluoresenssina). pH-käsittelyn jälkeen supernatantista ALOA-maljoille otetuissa näytteissä kasvoi *L. monocytogenes* -pesäkkeitä, joten käsittely irrotti myös kokonaisia bakteereja niitä tappamatta. Qdot 625 -leiman kirkkaus ei vähentynyt pH -syklin vaikutuksesta, kun pelkälle Qdot-leimalle tehtiin sama pH-käsittely. Vähän alemmalla pH:lla ja pitemmällä käsittelyajalla leiman irtoamista saadaan parannettua.

Faagiproteiinilla päällystetyt IMB:t - testaukset taustan vähentämiseksi

Proteiinien, kuten vasta-aineiden, leimaus fluoroforilla vaatii kemiallisen sidoksen aikaan saamista niiden välille. Kemiallisesti tahmeina, vasta-aineilla on taipumus sitoutua epäspesifisesti esimerkiksi muovipintoihin. Epäspesifinen sitoutuminen havaitaan korkeana leimataustana (signal/noise-suhde). Vasta-aineiden epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi käytetään suojaproteiineja (blokkauksproteiini). Paljon käytetty suojaproteiini on naudan seerumin albumiini (BSA). Yleisimmin käytetään 1 %:n suojaproteiinipitoisuutta, jota testattiin myös tässä työssä. Lisäksi testattiin puhtausasteeltaan erilaisia BSA:ta ja detergenttiä (Tween 20) eri yhdistelminä ja eri pitoisuuksina. Epäspesifistä sitoutumista saatiin vähennettyä BSA:n avulla jonkin verran, mutta ei riittävästi.

Myöhemmin kirjallisuudesta ilmeni, että naudan seerumin albumiini (BSA) reagoi Qdottien kanssa heikentäen niiden toimivuutta (Sanvinses ym. 2011, Gilmartin & Kennedy 2012). Sen vuoksi testattiin myös gelatiinia PBS- ja Tris-HCl-puskureissa. Gelatiinia käyttämällä taustafluoresenssi ei kuitenkaan oleellisesti vähentynyt. Lisäksi bakteereja irtosi magneettihelmistä kaikissa pesuvaiheissa. Myös gelatiinin osalta ilmeni, että sitä ei suositella leimausreaktioissa streptavidini-Qdoteille. Gelatiinin (0,05 %) on todettu edistävän Qdot 605 sekundäärikonjugaattien aggregaatioita. Siten gelatiinin käytöstä luovuttiin.

Vasta-aineet ja faagiproteiinit on liitetty magneettipartikkeliin streptavidini-biotiini-rakenteen avulla. Oli epäily, että kyseisiä molekyylejä on jostain syystä jäänyt vapaaksi, jolloin ne voivat aiheuttaa epäspesifistä sitoutumista kohteeseensa ja näin lisätä taustaa. Testien mukaan ko. proteiineilla ei ollut oleellista vaikutusta signal/noise-suhteen vähentymiseen.

Immunomagneettisten helmien yhdistäminen Qdot-fluoresenssimittaukseen osoittautui ongelmalliseksi, koska IMB:t vaimensivat fluoresenssia ja aiheuttivat siten interferenssiä mittaukseen. Tämän on todennut myös Wang ym. (2012). Bakteerit täytyi siis saada irrotettua magneettihelmistä. Irrottamalla ja eluomalla bakteerit irti IMB:stä voidaan parantaa testin herkkyttä ja yhdistää magneettihelmillä tehtävä rikastus "capture" -vasta-ainetestiin. Sitä varten testattiin kaupallista eluutiopuskuria (Gentle Ag/Ab Elution Buffer, pH 6,6). Qdot 625 leimaväri liukeni huonosti kyseiseen puskuriin, ja se vaimensi 1 nM:n Qdot 625:n tuottamaa fluoresenssia yli 16 - 21-kertaisesti PBS-puskuriin verrattuna. Kaupallinen eluutiopuskuri osoittautui sopimattomaksi tähän tarkoitukseen.

Yhteenvetona voidaan todeta, että faagihelmet eivät toimineet yhdessä fluoresenssimittauksen kanssa. Ne toimivat kuitenkin hyvin, kun listeriaa kerättiin maljakasvatukseen. Fluoresenssimittauksissa tausta pysyi korkeana eikä varsinaisen näytteen fluoresenssisignaali monista yrityksistä huolimatta juurikaan eronnut vertailusta.

Ongelman aiheuttajaksi osoittautui se, että faagihelmet sitoivat paitsi *L. monocytogenes* -bakteeria, myös listerialle spesifisiä vasta-aineita. Väärä sitoutuminen ei poistunut inkubointiolosu-

teita muuttamalla, suoja-protiineilla eikä blokkamalla streptavidiinilla tai biotiinilla. Kyseisiä immunomagneettisia helmiä ei siten voi yhdistää suoraan vasta-aineisiin vaan helmien sitomat kokonaiset, ehjät bakteerit detektoidaan viljelemällä. Kyseiset IMB:t olisivat olleet käyttökelpoisia PCR-tyyppiseen tai immunologiseen testiin kuumennusvaiheen ja/tai lyysauspuskurikäsitteilyn jälkeen sekä fluoresenssimittaukseen, joka tehdään kompetitiivisessa immunotestissä.

Kompetitiivisessä testissä vasta-aineen väärään sitoutumiseen liittyvä ongelma voidaan välttää sillä, että leimaus eriytetään omaksi vaiheekseen, joka tehdään erillään helmistä. Elintarvikenäytettä analysoitaessa ei tarvitse tehdä ollenkaan leimauksia vaan vain yksi tai kaksi nopeaa sitouttamista. Elintarvikelaitoksessa testi on lyhyt ja yksinkertainen suorittaa, mutta herkkyys saattaa olla jonkin verran heikompi kuin suorissa määrittäyksissä (Ivanova ym. 2014). Tätä mallia ehdittiin testata vasta alustavasti.

Koska itse faagiperäinen sitoutumisproteiini sitoutuu spesifisesti listeria-bakteereihin ja sidos on luja, IMB:n päällystämistä kyseisellä sitoutumisproteiinilla harkittiin. Suunnitelmasta luovuttiin kun ilmeni, että bioMérieux on patentoinut kyseisten sitoutumisproteiinien käyttämiseen listerian identifiointiin, monitorointiin ja detektointiin (European patent application EP 2527431A1 2012).

Vasta-aineilla päällystetyt IMB:t

Listeria-spesifisellä vasta-aineella päällystetyt kaupallisesti saatavilla olevat IMB:t (Dynabeads anti-Listeria) valittiin jatkotutkimuksiin, koska faagiproteiinipohjaiset IMB:t eivät toimineet suunnitellusti vasta-aine-fluoresenssileima-konstruktissa. Lisäksi toimittaja ilmoitti yllättäen lopettavansa niihin pohjautuvien kittien myynnin kokonaan. Dynabeads anti-Listeria IMB:t olivat sillä hetkellä tiettävästi ainoa kaupallisesti saatava vaihtoehto.

Menetelmän toimintaperiaate on pääpiirteiltään sama kuin faagiproteiinipohjaisten immunomagneettisten helmien. Erot ovat lähinnä pesujen lukumäärissä ja näytteen rikastuslämpötilassa: vasta-ainepohjaisissa IMB:ssä pesut suoritetaan kahdesti ja rikastukseen suositellaan 30 °C:n lämpötilaa.

Toimittajan tiedon mukaan Dynabeads anti-Listeria IMB:t voivat antaa väärää negatiivisia/positiivisia tuloksia, mikäli Listeria-lajien bakteereita on < 1000 solua/ml rikastettua näytettä. Kyseisillä IMB:illä voidaan määrittää elävien listerioiden läsnäolo tai puuttuminen herkkyydellä yksi elävä listeria/25 g näytettä sillä edellytyksellä, että näytteessä olevat kilpailevat solut eivät estä sen kasvua 24 h:n rikastuksen aikana. Kilpailevaan mikrobistoon nähden listeriat saadaan konsentroitua 20-kertaisesti, mutta ristireagointi ja epäspesifinen sitoutuminen ovat mahdollisia. Enemmän kuin yksi listeriasolu voi sitoutua yhteen tai useampaan helmeen ja muodostaa aggregaatteja, jotka voivat kasvaa selektiivisellä kasvatusalustalla maljalla vain yhtenä pesäkkeenä (pmy). Siksi kunnollinen sekoitus aggregaattien rikkomiseksi ennen maljausta on tärkeä. (Dynabeads anti-listeria manual 2012).

½ Fraserin todettiin aiheuttavan liikaa taustafluoresenssia käytettäessä faagihelmiä. Siksi testattiin myös vasta-ainehelmiä sekä BHIB:ssä että ½ Fraserissa 30 °C:ssa esirikastetulla *L. monocytogenes* ATCC 19111 -kannalla. Sieppaustehokkuus oli hieman parempi, kun esirikastukseen käytettiin BHIB:tä (sieppaustehokkuus 80–100 %). Todennäköisesti ½ Fraserin sisältämät kasvunestoaineet vaikuttavat myös listeria-soluihin estäen vasta-aineiden tarttumista. Oletettavasti paras tapa olisi käyttää selektiopaineetonta kasvualustaa.

Kun sieppaustehokkuutta testattiin bakteerikannoilla *L. monocytogenes* ATCC 13932, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* subs. *ivanovii* ATCC 19119, *E. coli* ATCC 25922 ja *E. faecalis* ATCC 29212, IMB:t sieppasivat *L. monocytogenes* ATCC 13932 -kantaan tehokkaasti (114 %), *L. innocua* ATCC 33090 -kantaan paljon (60 %) ja *L. ivanovii* subs. *ivanovii* ATCC 19119 -kantaakin kohtuullisesti. *E. coli* ATCC 25922 - ja *E. faecalis* ATCC 29212 -kantojen sieppaustehokkuus oli vähäinen (taulukko 1.). Voidaan kuitenkin todeta, että ristireaktiot ovat ilmeisiä. Käytännössä se tarkoittaa mahdollisten positiivisten tulosten varmentamista serologisilla ja biokemiallisilla testeillä. Näin ollen paras tapa sieppaustehokkuuden lisäämiseksi olisi päällystää IMB:t monoklonalisella vasta-aineella.

Taulukko 1. IMS-helmien herkkyden ja spesifisyyden määrittäminen bakteerikannoilla *L. monocytogenes* ATCC 13932, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* subs. *ivanovii* ATCC 19119, *E. coli* ATCC 25922 ja *E. faecalis* ATCC 29212.

Bakteeri-kanta	Bakteerimäärä ennen IME:ä pmy/ml	Bakteerimäärä IME:n jälkeen pmy/ml	Sieppaus- tehokkuus, %
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932	$1,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	114 %
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	$3,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	60 %
<i>L. ivanovii</i> subs. <i>ivanovii</i> ATCC 19119	$3,3 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^5$	18 %
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$1,6 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^3$	0,2 %
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$3,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^4$	2,0 %

2.3.5. Qdot-leimauksen yhdistäminen IMB-rikastukseen

Primäärinen vasta-aine liitettiin inkuboimalla huoneenlämmössä immunomagneettisiin helmiin, joihin oli siepattu listeriat. Pesujen jälkeen tähän kompleksiiin liitettiin sekundäärinen vasta-aine, johon Qdot 625 oli konjugoitu. Inkuboinnin ja pesujen jälkeen syntyvä fluoresenssisignaali mitattiin ex360nm/em625nm -aallonpituuksilla.

Vasta-aineet

Mikrobitunnistuskonstruktissa päätettiin käyttää edellä kuvattua primääri- ja sekundäärivasta-aineyhdistelmää fluoresenssisignaalin maksimoimiseksi. Signaali voimistuu, kun yhteen primäärivasta-aineeseen pystyy tarttumaan useampi värileimalla konjugoitu sekundäärivasta-aine.

Monoklonaaliseksi primääriseksi vasta-aineeksi valittiin hiiressä tuotettu anti- *L. monocytogenes* vasta-aine, joka on tarkoitettu solun pintaproteiini p60:ä (tärkeä virulenssitekijä) vastaan. Sekundäärivasta-aineena käytettiin vuohessa tehtyä hiiren IgG-vasta-ainetta vastaan suunnattua IgG:n F(AB')₂-osaa, johon oli konjugoitu Qdot-väri (ex625nm) (QDOT 625 Goat F(AB')₂ anti-mouse, Thermo Fisher Scientific). Polyklonaaliseksi primäärivasta-aineeksi valittiin kanin anti- *L. monocytogenes* vasta-aine, joka on tarkoitettu kokonaisen bakteerisolun pintarakenteita vastaan (Rabbit Prot. A-purif. IgG Polycl. against *L. monocytogenes*, Pierce Antibodies - Thermo Scientific). Sekundäärivasta-aineena käytettiin vuohessa tehtyä kanin IgG-vasta-ainetta vastaan suunnattua IgG:n F(AB')₂-osaa, johon oli konjugoitu Qdot-väri (ex625nm) (QDOT 625 Goat F(AB')₂ anti-rabbit, Invitrogen).

Kun faagihelmillä tehtyyn rikastukseen yhdistettiin Qdot-leimatut anti-listeria vasta-aineet, monoklonaalisella vasta-aineella testissä käytetyllä pitoisuudella saatiin fluoresenssisignaali, joka oli vahvuudeltaan vain kolmasosa kanin polyklonaalisella vasta-aineella saadusta. Tämä on kirjallisuuden mukaan tavallista (Nakamura 1992b, Zhen ym. 2012). Kun käytetään kokonaisia mikrobisoluja, solujen pinnassa polyklonaalisille vasta-aineille on paljon enemmän erilaisia antigeenisia rakenteita ja siis myös enemmän sitoutumispaikkoja kuin monoklonaalisille. Se mitä spesifisyydessä voitetaan, voidaan siis hävitä testin herkkydessä.

Fluoresenssitaustan ja muun interferenssin vähentämiseksi leimauksessa käytettyjen vasta-aineiden irrottamista faagihelmiin sitoutuneista bakteereista testattiin pH-käsittelyllä. pH-käsittely oli sama, jota käytettiin faagihelmiin (pH 7.3:sta → pH 2.7 (5 min) → pH 7.3). Tämä käsittely irrotti 95 % leimasta (mitattuna irronneen leiman fluoresenssina) vasta-aineilla päällystetyistä helmistä, joihin oli sitoutettu *L. monocytogenes* ja sen jälkeen tehty Qdot625-leimaus edellä kuvatulla protokollalla. Leimattujen vasta-aineiden eluointi pH-käsittelyllä toimii siis hyvin.

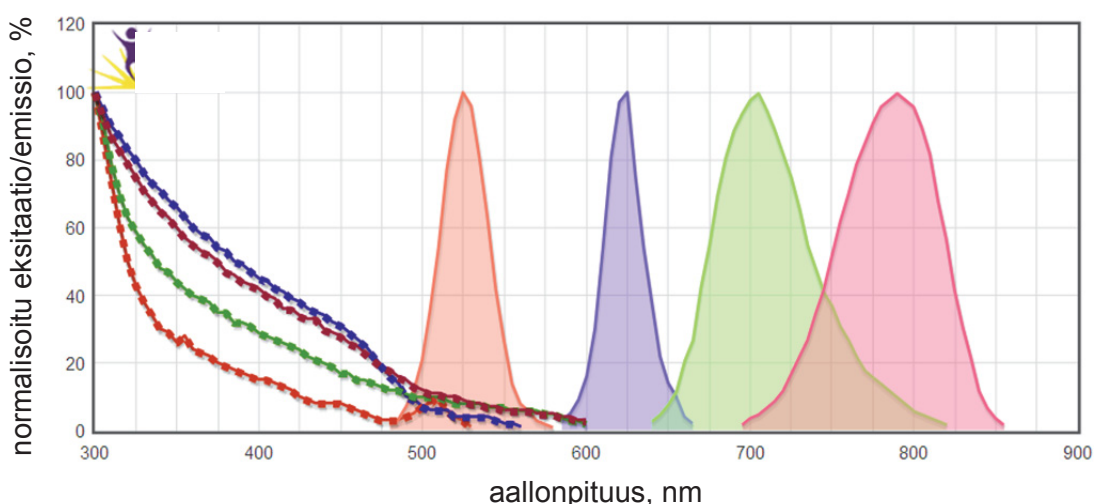
Magneettihelmien pinnassa olevat vasta-aineet eivät sitoudu *L. monocytogenes* -soluihin yhtä lujaasti kuin faagiproteiini. Edellä kuvattujen Qdot-leimausten yhteydessä supernatantista otetuista

näytteistä tehtiin viljelyt ALOA-maljoilla. Vasta-aineleimauksiin tarvittavissa pesuissa *L. monocytogenes*-soluista irtosi yli 99 % ennen kuin FL-mittaus oli mahdollista. Vaikka vasta-ainehelmien kohdalla ei esiintynyt vääranlaisia tunnistajavasta-aineen sitoutumisia kuten faagihelmissä, ne eivät sovellu suoraan fluoresenssileimaukseen, koska bakteerit irtoavat niistä helposti. Ainoa mahdollinen tapa yhdistää vasta-ainehelmet ja FL-mittaus on siis rikastaa bakteerit helmien avulla kasvatusliemestä, vapauttaa ne sitten joko ravistamalla tai pH-käsittelyllä ja tehdä FL-leimaus ja mittaukset kuoppalevyllä capture-antibody-testillä.

Tulosten mukaan bakteerit alkoivat irrota IMB:stä (Dynabeads), kun niihin liitettiin vasta-aineita. Tämän vuoksi päätettiin testi toteuttaa kaksivaiheisesti siten, että ensimmäisessä vaiheessa bakteerit siepataan magneettihelmillä ja vasta-aineet tai bakteerit vapautetaan. Toisessa vaiheessa ne siepataan kuoppalevyyn sidotulla monoklonaalisella vasta-aineella, ja primäärinen ja Qdot-tai orgaanisella värillä konjugoitu sekundäärinen vasta-aine liitetään. Tulokset olivat lupaavia: saatiin noin 10-kertainen fluoresenssisignaali. Testi on vielä optimoitava.

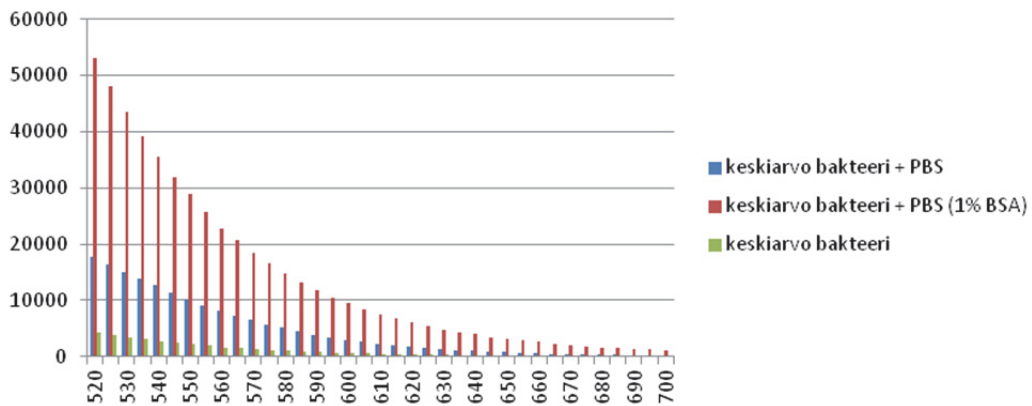
Qdot-leimavärit

Fluoroforeiksi valituista kvanttipisteväreistä (Quantum dots) valittiin testaukseen neljä lupaavinta fluoresenssileimaa: Qdot®525, Qdot®625, Qdot®705 ja Qdot®800, joista Qdot®625 vaikutti parhaimmalta kapeimman emissioalueensa vuoksi (kuva 16.). Lisäksi se virittyisi kohtuullisesti (60 %) eksitaatioaallonpituudella 360 nanometriä (nm).



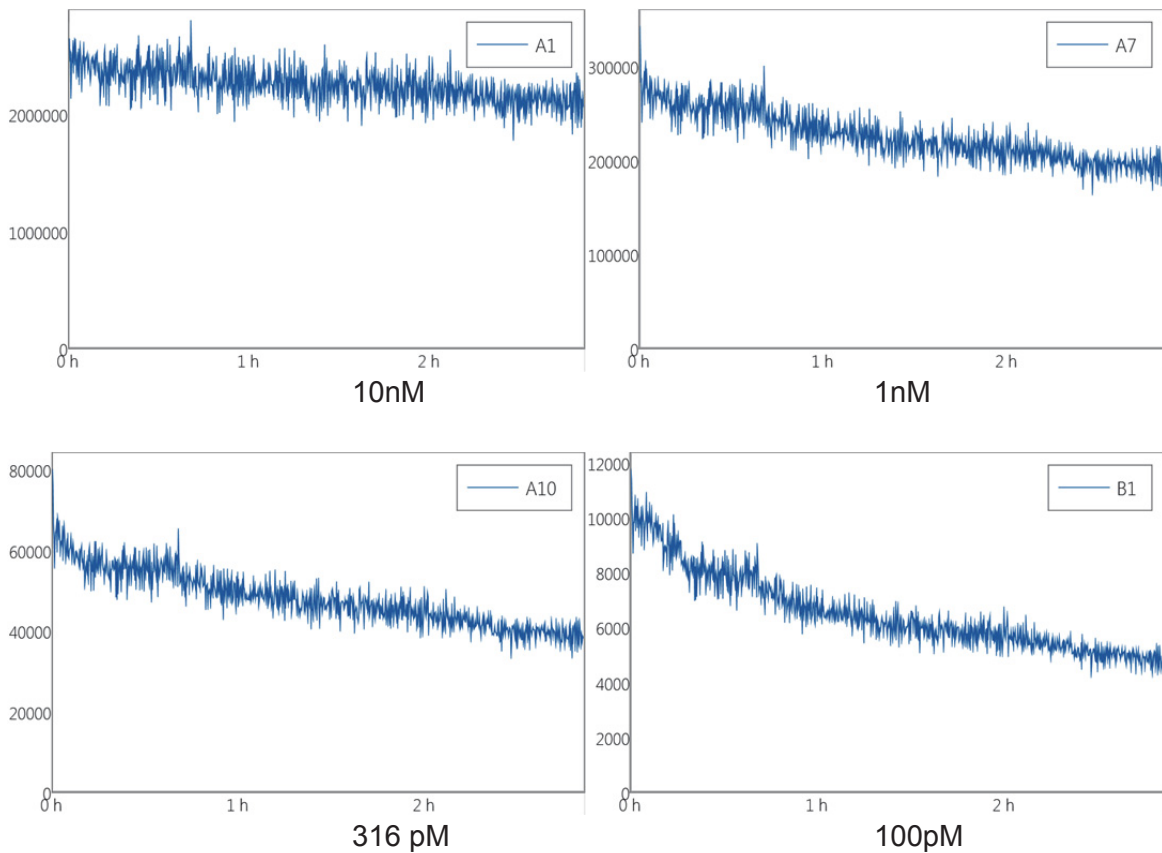
Kuva 16. Qdot®525, Qdot®625, Qdot®705 ja Qdot®800 leimavärien eksitaatio- ja emissiomaksimien aallonpituusalueet (kuvan lähde: <http://www.biologend.com/spectraalyzer>).

Kaikissa fluoresenssimittauksissa ongelmana on taustafluoresenssi. Testissä mukana olleet biologiset materiaalit fluoresoivat voimakkaasti aallonpituudella noin 490 nm, joten detektointileiman emissio pitää erota tästä riittävästi. Aluksi testattiin PBS-puskurista, suoja-proteiinista (1 % BSA) ja bakteereista johtuvaa taustafluoresenssia. Aallonpituudella 525nm emittoiva Qdot®525 karsiutui pois testausproseduurista, koska signaali peittyi puskureista, suoja-proteiinista ja itse bakteerista johtuvaan taustafluoresenssiin (kuva 17.). Kun emissioaallonpituus kasvaa, taustafluoresenssin vaikutus vähenee. Saatujen tulosten mukaan eksitaatio-aallonpituutta 360 nm käytettäessä fluoroforina kannattaa käyttää Qdot®625 tai suuremmilla aallonpituuksilla emittoivia leimavärejä, kuten Qdot®705 ja Qdot®800.



Kuva 17. PBS-puskurista, suoja-proteiinista (1 % BSA) ja itse bakteerista johtuva taustafluoresenssi eksitaatio-emissioaallonpituuksilla 360/520–700.

Qdottien etuna perinteisiin orgaanisiin väreihin, kuten FITC:iin, verrattuna on hyvä valonkestävyys. Tämä todennettiin 3 h:n toistomittauksella käyttäen Qdot®625 pitoisuuksia 10 nM, 1 nM, 316 pM ja 100 pM PBS-puskurissa. Sama näytesarja mitattiin Hidex Sense -monileimalukijalla 1000 kertaa, flash parametrina 50. Alla olevista kuvista on nähtävissä signaalin alenema eri pitoisuuksilla (kuva 18.).



Kuva 18. Qdot®625 valonkestävyys 3 h:n toistomittauksella käyttäen pitoisuuksia 10 nM, 1 nM, 316 pM ja 100 pM PBS-puskurissa.

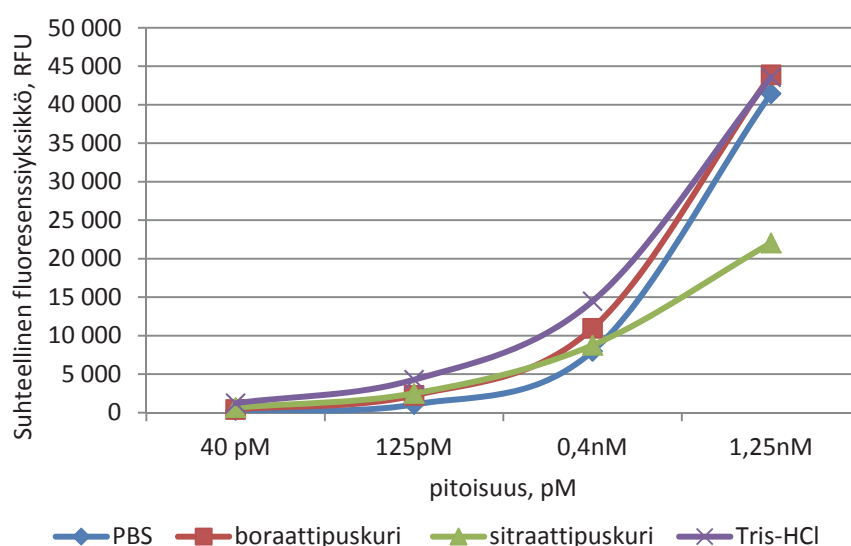
Karkeasti kuvista arvioiden 1000 mittauksen aikana fluoresenssivaste alenee pahimmillaan 40 % (100 pM näyte), tyypillisesti signaalin heikkenemä on noin 20 %. Mittaustuloksissa näkyy mittaustulosten suuri hajonta toistettaessa samaa mittausta. Karkeasti kuvista arvioiden mittausepävarmuus on noin 20 % (mittausarvojen hetkittäinen heittely min-max). Näytettä voidaan siis mitata kymmeniä, jopa satoja kertoja, ennen kuin näyte 'hiipuu' hetkittäisen mittausepävarmuuden verran.

pH-puskureiden vaikutus kvanttipistevärien kirkkauteen

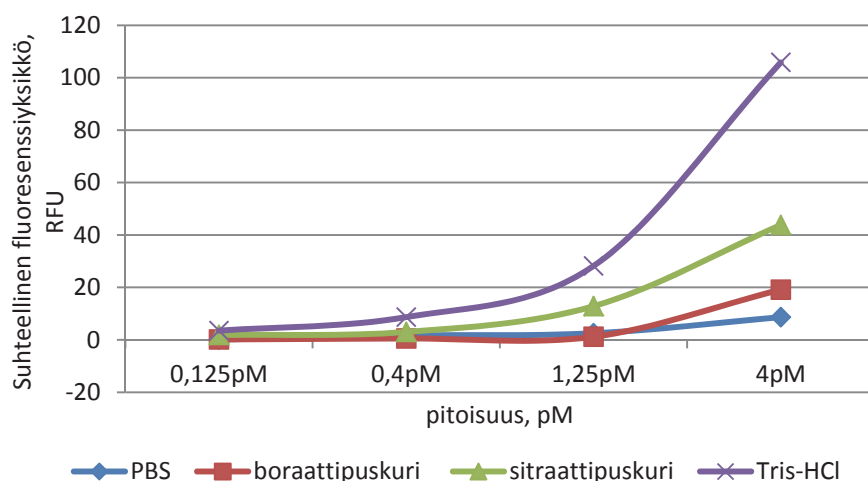
Biologisissa lääketieteellisissä kuvantamisissa Qdottien tuottamaa fluoresenssisignaalia mitataan eläinsoluille sopivassa fysiologisessa puskurissa, tavallisimmin fosfaattipuskurissa (PBS) pH:ssa 7,4 (Medintz ym. 2005, Pinaud ym. 2010). Toimittajan mukaan Qdotit pysyvät stabiileina pH-alueella 6-9 ja ne toimitetaan boraattipuskurissa pH 8,3 (Lifetechnologies).

Qdottien kirkkauden lisäämiseksi ja taustafluoresenssin vähentämiseksi testattiin pH-arvoltaan erilaisia puskureita. Testattaviksi valittiin pH-pitoisuuksiltaan ja kemiallisilta koostumuksiltaan erilaisia molekyylibiologiassa tai vasta-aineteknologisissa menetelmissä käytettyjä puskureita, joita verrattiin yleisimmin käytettyyn PBS-puskuriin. Valitut puskurit olivat: sitraattipuskurit (pH 4 – 5,5), fosfaattipuskurit (pH 6 – 7,5) ja Tris-HCl-puskurit (pH 8 – 9). Kaikki puskurit sisälsivät 0,9 % NaCl:a. Oikealla puskurivalinnalla voidaan vaikuttaa menetelmän herkyyteen ja siten käytettävään väriaineen määrään. Tämä vähentää mittausta kohti kuluva reagenssikustannusta. Puskurien valinnassa huomioitiin, että Qdotit pysyvät niissä stabiileina ja *L. monocytogenes* -bakteerit elävänä. Kirjallisuuden mukaan *L. monocytogenes* kasvaa pH-alueella 4 – 9,6 (Hallanvuo & Johansson 2010). Testausten mukaan *L. monocytogenes* säilyi elävänä tutkitulla pH-alueella 4,0 – 9,0, ja 30 °C:ssa esikasvatetut bakteerit kestivät puskureissa paremmin kuin 37 °C:ssa kasvatetut.

Kuvissa 18. ja 19. on esitetty PBS-, Tris-HCl-, boraatti- ja sitraattipuskurien vaikutus Qdot® 625:n fluoresenssin kirkkauteen. Suurissa pitoisuuksissa (1,25 nM) sitraattipuskuri toimii heikoimmin, kun taas muut puskurit antoivat lähes samansuuruisen signaalin (kuva 19.) Sen sijaan pienissä pitoisuuksissa < 4 pM, Tris-HCl-puskurin fluoresenssi oli selvästi voimakas (kuva 20.).



Kuva 19. Eri puskureiden vaikutukset Qdot® 625 (pitoisuudet 40pM–1,25 nM) fluoresenssin kirkkauteen. Paras kirkkaus saavutettiin Tris-HCl-puskurilla. Suurissa pitoisuuksissa (1,25 nM) sitraattipuskuri toimi heikoimmin, kun taas muut puskurit antoivat lähes samansuuruisen signaalin. Mittaukset Infinite® M1000 PRO -kuoppalevylukijalla, Tecan.



Kuva 20. Eri puskureiden vaikutukset Qdot® 625 (pitoisuudet 0,125–4 pM) fluoresenssin kirkkauteen. Paras kirkkaus saavutettiin Tris-HCl-puskuria käytettäessä. Mittaukset Infinite® M1000 PRO -kuoppalevylukijalla, Tecan.

2.4. Biodetektorin prototyypin kehitystyö

Alkuperäisen suunnitelman mukaisesti oli tavoitteena kehittää biodetektorin, jossa näytteet voitaisiin mitata suoraan kyvetissä, jossa näytteen konsentrointi olisi suoritettu. Suunnitelma perustui siihen, että kyvetit ovat halpoja, kertakäyttöisiä näyteastioita ja käsittelemällä näytteet suoraan mittausastiasa välttäisiin turhalta hävikiltä. Markkinoilla on tarjolla akryylistä valmistettuja kyvettejä, jotka läpäisevät vaimentumatta uv-valoa aallonpituudella 360 nm. Suunnitelmaa testattaessa ilmeni, että kyvetit ovat hankalia ja aikaa vieviä käyttää, kaatuvat helposti ja IMB:t kiinnittyvät kyvetin seinämään epätasaisesti (kuva 21.).



Kuva 21. IMB:t kiinnittyneinä magneetin avulla kyvetin seinämään (kuva Tiina Väyrynen).

Kyvettien käytön hankaluuden vuoksi mittaus päätettiin toteuttaa näytelevyllä. Näytelevyksi valittiin 96-kuoppalevy, jota käytetään yleisesti kaupallisissa fluoresenssia mittaavissa mittalaitteissa. Tämä mahdollisti tehokkaan laitevertailun, koska samoja näytelevyjä oli mahdollista mitata sekä kehitettävässä mittalaitteessa että kaupallisissa laitteissa.

2.4.1. Valonlähteen ja valon vastaanottimen valinta

Valonlähteen tuli olla yksinkertainen, pieni ja myös mekaanista tärinää sekä lämpötilaa kestävä valonlähde. Fluoresenssia mitaattavissa mittalaitteissa käytetään yleisimmin kaasupurkauslamppuja, koska ne mahdollistavat usean eri aallonpituuden käyttämisen vaihtamalla laitteeseen optisia suodattimia. Koska biodetektorissa tavoitteena oli yhden aallonpituuden mittaaminen, lähteeksi valittiin

uv-valoa emittoiva led, jonka aallonpituus on 360 nm (Nichia, led light sources). Led asennettiin lämpöpöytäjohtavalle alustalle, jotta siinä kehittyvä lämpö saatiin johdettua pois itse komponentista.

Valon vastaanottimeksi valittiin fotodiodi, jolla oli samoja mekaanisia ominaisuuksia kuin valonlähteellä (Hamamatsu, photodiodes). Koska mittalaitteen tuli kyetä mittaamaan erittäin pieniä valomääriä, vaadittiin valodiodilta erityisiä pimeävirta- ja herkkyysominaisuuksia.

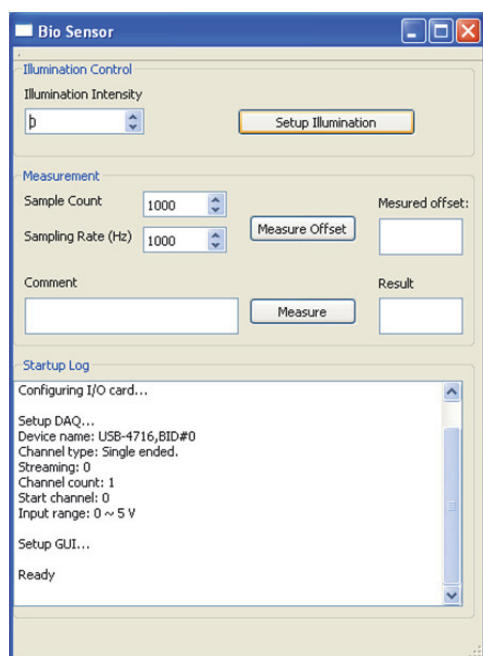
2.4.2. Signaalivahvistin

Signaalin esivahvistin toteutettiin ensimmäisessä vaiheessa logaritmisena. Tämä ratkaisu tarjoaa erittäin laajan mittausalueen ilman esivahvistimen saturaatiota. Hyvin pian ensimmäisten mittausten jälkeen selvisi, ettei esivahvistimen herkkyys riitä tarpeeksi pienten pitoisuuksien havaitsemiseen. Tästä johtuen seuraava esivahvistin suunniteltiin silmälläpitäen mahdollisimman pienten pitoisuuksien havaitsemista. Koemittauksia suoritettiin tällä vahvistimella kymmeniä ja herkkyys osoittautui hyväksi. Esivahvistimen tuottama jännite syötettiin 16 bittiseen ADC-moduliin (Advantech, AD muunninkortit) ja lukemat rekisteröitiin PC:llä.

2.4.3. Muu laite-elektronikka ja ohjelmisto

Muu laite-elektronikka koostui lähinnä tehollähteistä ja ledin ohjauselektronikasta. Lediä ohjattiin sitä varten suunnitellulla driverilla, joka takaisinkytketyllä signaalilla pitää ledin läpi menevää virtaa vakiona. Ledin virtaa voidaan säätää asteikolla 1–99, mikä mahdollistaa mittausdynamiikan laajemman alueen.

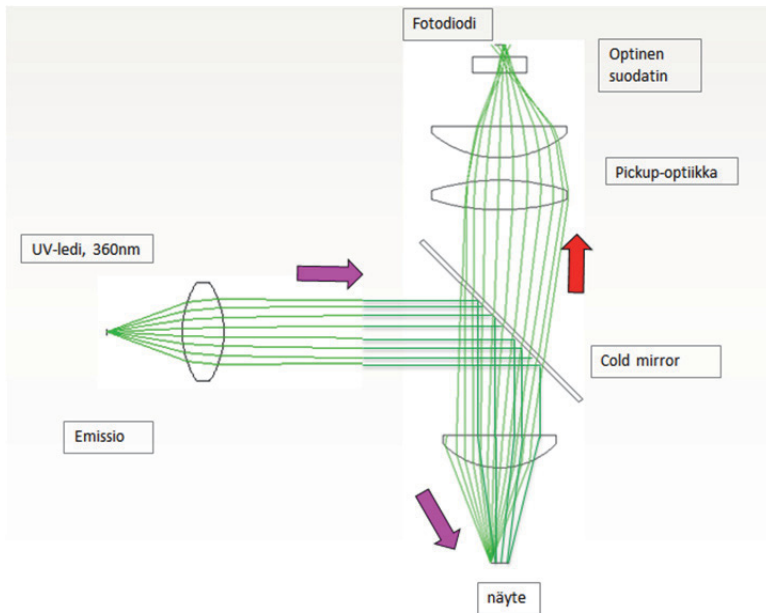
PC-ohjelmisto toteutettiin QT:llä. Ohjelmalla voidaan muuttaa mittaus- ja keskiarvoistusaikaa, valonlähteen kirkkautta sekä antaa kommentteja tallennettavaksi yhdessä mittauksien kanssa (kuva 22.).



Kuva 22. QT:llä toteutettu PC-ohjelmisto.

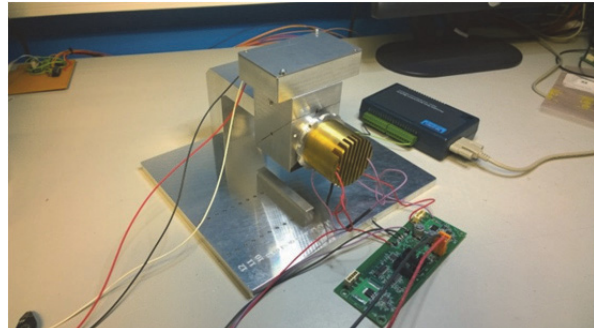
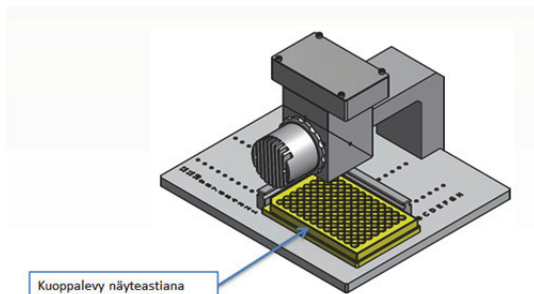
2.4.4. Laiteoptiikka

Laiteoptiikka suunniteltiin ja mallinnettiin Oslo-nimisellä optiikan simulaatio-ohjelmalla. Kuvassa 23. on esitetty biodektoirin optinen toimintaperiaate. Led emittoi valoa, joka kollimoidaan. Se heijastuu kylmäpeilin kautta linssille ja sieltä varsinaiseen näytteeseen. Fluoresoiva valo puolestaan läpäisee kylmäpeilin ja etenee edelleen kahden linssin ja optisen suodattimen läpi fotodiodille, joka mittaa fluoresoivan valon voimakkuutta.



Kuva 23. Biotektorin optinen toimintaperiaate.

Optiikan suunnittelun jälkeen suunniteltiin laitteen mekaniikka. Kuvassa 24. on esitetty biotektorin 3D malli sekä valmis mittalaite.

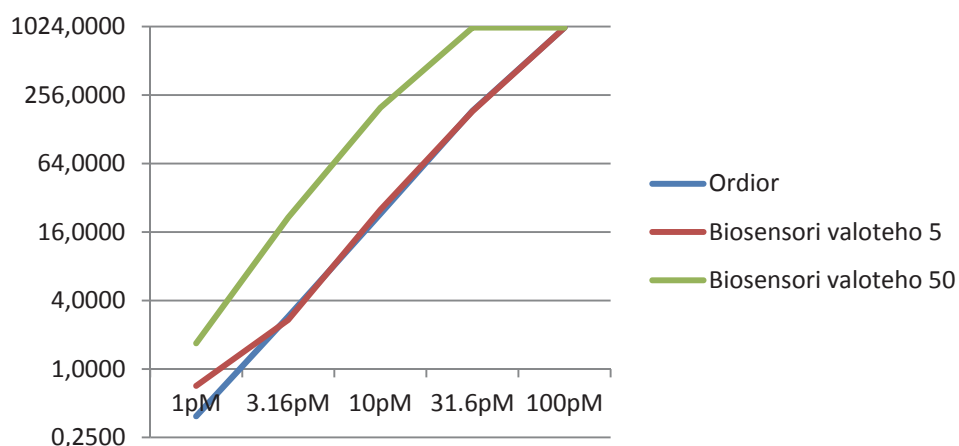


Kuva 24. Biotektorin 3D malli sekä valmis mittalaite SepLED.

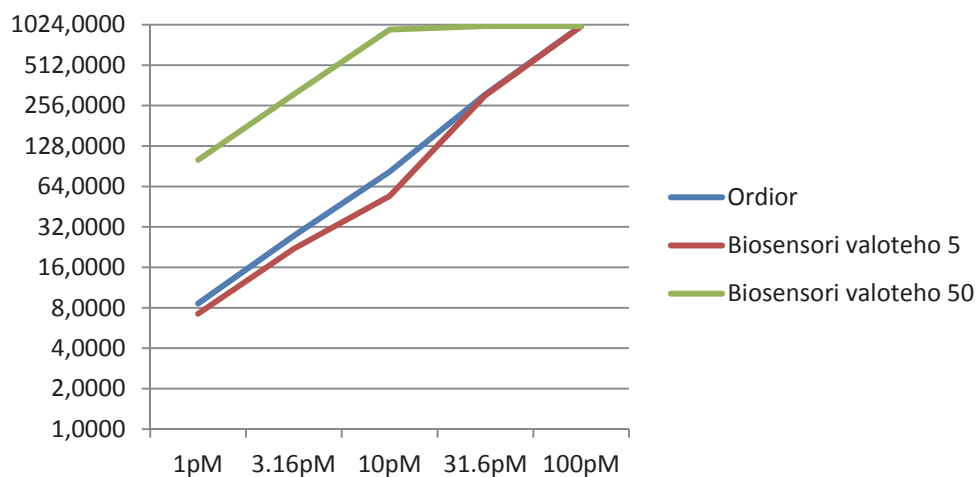
2.4.5. Biotektorin testimittaukset ja laitteen ominaisuudet

Testimittauksia suoritettiin käyttäen puhtaita Qdot 625 väriaineita sekä väriaineita yhdistettynä vasta-aineeseen. Varsinaisia herkkyysmittauksia suoritettiin kahdella puskurilla: PBS:llä ja Tris-HCl:llä. Näytteitä mitattiin kaupallisella FLUOstar Omega (Ordior) mittalaitteella ja projektissa kehitetyllä biotektorilla.

Mittauksessa 1 (kuva 25.) on käytetty pelkkää väriainetta. Biotektorin vaste valoteholla 50 saturoituu 31.6 pM ja 100 pM näytteillä, mutta herkkyys on parempi kuin referenssilaitteella mitattuna. Y-akselilla arvo 0 vastaa tilannetta, jolloin signaalia ei näytteestä enää ole. Mittauksessa 2 (kuva 26.) käytetty puskuri Tris-HCl on herkkyydeltään huomattavasti parempi ja signaalit ovat molemmilla mittalaitteilla parempia kuin mittauksessa 1. Biotektorin herkkyys paranee kuitenkin enemmän verrattuna referenssilaitteeseen. Mittauksessa 2. biotektori on saturoitumassa jo 10pM:n näytteellä ja on selkeästi herkempi kuin referenssilaitte.

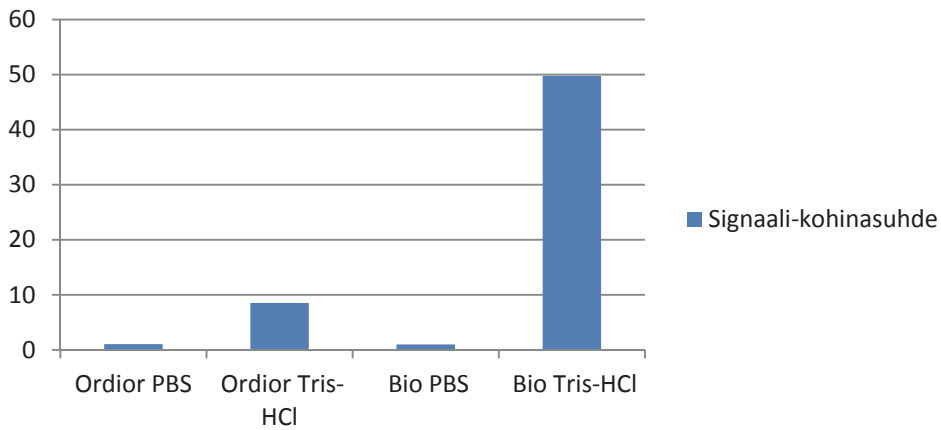


Kuva 25. Mittaus 1: Qdot 625 PBS-puskurissa, mittaukset FLUOstar Omega vs. Biodetektori kahdella valaisuteholla. Mittaustulokset skaalattu samalle tasolle ja pohja poistettu.



Kuva 26. Mittaus 2: Qdot 625 Tris-HCl-puskurissa, mittaukset FLUOstar Omega vs. Biodetektori kahdella valaisuteholla. Mittaustulokset skaalattu samalle tasolle ja pohja poistettu.

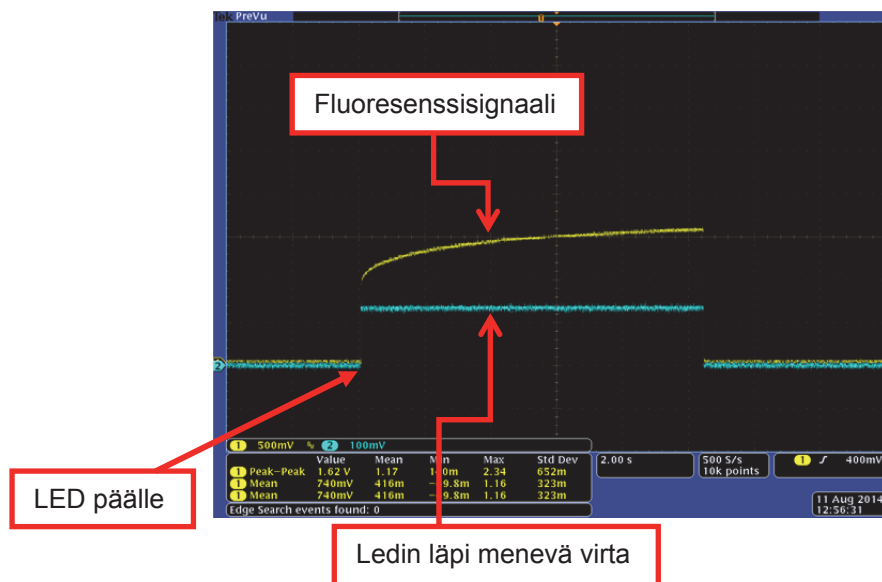
Tutkittaessa laitteiden signaali-kohinasuhdetta (kuva 27.) 0.25 pM:n Qdot 625 -näytteillä havaittiin, että Tris-HCl puskuri tuottaa selkeästi parempia arvoja. PBS-puskurilla molempien laitteiden suorituskyky on samalla tasolla, mutta Tris-HCl puskuria käytettäessä biodetektori on noin 7 kertaa herkempi. Levyllä oli 3 kpl 0.25 pM:n näytettä ja 20 puskuria. Puskureista laskettiin keskiarvo ja keskihajonta ja näitä verrattiin 0.25 pM:n näytetulosten keskiarvoon.



Kuva 27. Signaali-kohinasuhde 0.25 pM:lla Qdot 625 PBS- ja Tris-HCl-puskureissa FLUOstar Omega vs. Biodetektor.

Kuten mittaustuloksista voi päätellä, on Tris-HCl selkeästi herkempi puskuri. Herkkyyden lisäksi se tuottaa selkeästi stabiilimman mittaustuloksen verrattuna PBS:ään. PBS -puskuria käytettäessä signaali 'syttyy' hitaasti, tarkoittaen, että signaali kasvaa ensimmäiset sekunnit ennen kuin signaali tasoittuu (kts mittaustulos alla). Tris-HCl puskurilla tätä ei tapahdu. Ilmiö voitiin havaita molemmilla mittalaitteilla.

Alla olevassa (kuva 28) mittauksessa ledin syttyessä on äänitetty laitteen rekisteröimää fluoresenssisignaalia. Tästä nähdään selvästi, että PBS-puskurissa Qdot 625:n fluoresenssisignaali (keltainen) kasvaa koko 10 sekunnin ajan ledin ollessa päällä.



Kuva 28. Äänitetty fluoresenssisignaali Qdot 625 PBS-puskurissa.

2.4.6. Biodetektorin jatkokehitys

Biodetektorin mittaustulokset ovat erittäin lupaavia ja jatkokehityksellä voidaan parantaa mittalaitteen suorituskykyä huomattavasti. Laitteen valoteho mittauksissa oli puolet maksimista, joten valotehoa kasvattamalla on mahdollista lisätä herkkyyttä. Ongelmaksi tällöin muodostuu kuitenkin laitteen signaalin pohjataso, joka kasvaa; laitteen sisällä tapahtuu valoheijastuksia, jotka aikaansaavat valosignaalia fotodiodilla. Paremmilla linsseillä ja valon rajauksilla suorituskykyä voidaan lisätä, samoin esivahvistimen vahvistusta on varaa kasvattaa. Lisäksi laitteeseen tulee lisätä valotehon kompensointi, jolla voidaan eliminoida led-valonlähteen pienet vaihtelut (ns. DC-drift). Varovaisesti arviotuna mahdollista on saavuttaa vielä noin 5–10 -kertainen suorituskyvyn parannus nykytilanteeseen verrattuna, mikäli ongelmakohdat saadaan ratkaistua.

2.5. Biosensoritutkimuksen yhteenveto

Food Safety Cluster -projektin yhtenä tavoitteena oli kehittää elintarvikediagnostiikkaan on-line-biosensori, jolla elintarvikepatogeeni(t) voitaisiin tunnistaa suoraan tuotantolinjalta. Taustaselvityksen perusteella oli ilmeistä, että vuonna 2012 käytössä olevilla teknologioilla on-line-biosensorin kehittäminen ei olisi mahdollista. Tavoitteeksi asetettiin vaihtoehdoisen pikamenetelmän kehittäminen ja analyysiajan lyhentäminen merkittävästi perinteisiin viljelymenetelmiin verrattuna. Diagnostiikan kehityskohteeksi elintarvikepatogeenista, erityisesti selkärankaisesta eläimestä ihmiseen ja päinvastoin tarttuvista zoonoottisista bakteereista, valittiin *L. monocytogenes* -bakteeri.

L. monocytogenes -bakteerin mikrobiologinen analysointimenetelmä perustuu nanobioteknologian työkaluihin ja optoelektronikkaan (fluoresenssi). Kehitetyssä menetelmässä bakteerit rikastetaan selektiivisessä kasvatusliemessä. Spesifisyyttä lisäävänä ja kasvatusaika lyhentävänä erottelu- ja konsentroidintimenetelmänä käytetään immunomagneettista erotusta, jossa nanokokoiset magneettihelmet päällystetään kohdemikrobille spesifisillä vasta-aineilla tai muulla materiaalilla, johon kohdemikrobi tarttuu. Fluoroforina käytetään ns. kvanttipistevärejä (Qdots). Ne ovat epäorgaanisia nanokokoisia kolloidisia puolijohteita, jotka fluoresoivat kirkkaammin kuin orgaaniset värit ja kestävät valoaltistusta useita tunteja värin intensiteetin hiipumatta. Detektoinnissa fluoresenssi mitataan käyttäen ultraviolettilähteen ja fotodiodin perustuvaa räätälöityä mittalaitetta (SepLED).

Pikamenetelmän kehitystyön tulokset:

- Kehitetyllä mikrobittunnistusmenetelmällä määrittämysaika voidaan lyhentää merkittävästi: määrittämysaika lyhenee jopa 26 tuntiin (esirikastus: 18 h; IME, 1. vasta-aineen lisäys+inkubointi, 2. vasta-aineen lisäys ja inkubointi sekä lopuksi mittaus yhteensä 8h), kun se ISO-standardin mukaisella vertailumenetelmällä on noin 7 vuorokautta.
- FSC-projektissa tavoitteena oli hyödyntää nanoteknologiaa; pikamenetelmän kehitystyössä erottelu- ja konsentroidintimenetelmänä käytettiin magneettihelmiä (IMB) ja detektoinnissa fluoroforina käytettiin kvanttipistevärejä (Qdots), jotka molemmat ovat nanobioteknologian työkaluja.
- Qdottien valinta oli onnistunut. Kirkkautensa ja kestäväyytensä lisäksi niiden virittyminen LED:llä ja UV-alueella, kaukana toisistaan olevat eksitaatio- ja emissioalueet sekä kapea emissiopiikki lisäävät mahdollisuuksia taustafluoresenssin vähentämiseksi ja siten menetelmän herkkyyden lisäämiseksi.
- Qdot-fluoroforien kirkkautta onnistuttiin parantamaan merkittävästi erityisesti detektorin lähellä olevilla pienillä pitoisuuksilla muuntelemalla käytettävien puskuriliuosten koostumusta. Tällä tulee olemaan merkittävä vaikutus menetelmän herkkyyteen. Tällaista ilmiötä ei tiettävästi ole alan kirjallisuudessa kuvattu.

- Yllä mainitun pikamenetelmän lisäksi syntyi toinen pikatesti. Se perustuu monoklonaalisiin ”capture”-vasta-aineisiin, joiden detektoinnissa fluorofoarina käytetään kvanttipistevärejä (Qdots). Tämä testi voidaan todennäköisesti yhdistää vasta-aine-IMB -rikastustekniikkaan.
- SepLED -mittalaitteen kehitystyö. Kaupalliseen laboratoriomittalaitteeseen (Ordior) verrattuna suorituskyky räätälöidyllä laitteella on selvästi parempi kuin laboratoriolaitteella mitattaessa Qdot 625:n tuottamaa fluoresenssisignaalia Tris-HCL-puskurissa. Yleisemmin käytetyllä PBS-puskurilla suorituskyky on tämänhetkiselä versiolla samaa tasoa.

Kehitettävää:

- Kehitystyössä käytetyt kaupalliset IMB:t on päällystetty polyklonaalisella vasta-aineella. Tämä tarkoittaa sitä, että IMB:hin tulee mukaan muitakin Listeria-suvun bakteereita; menetelmä ei ole tällöin tarpeeksi spesifinen. Spesifisyyden lisäämiseksi IMB:t pitäisi päällystää monoklonaalisella vasta-aineella.
- Kehitetyn ”capture”-vasta-aineeseen ja Qdot-leimaan perustuvan testin yhdistäminen IMB-teknikkaan. Yhdistämisestä olisi merkittävää etua testin detektioherkkyyden ja vaaditun esikasvatusajan kannalta. Yhdistämiseen vaadittavat ratkaisut on pitkälti selvitetty. Testaus ja optimointi ovat tekemättä.
- Immunomagneettinen erottaminen on hyvä konsentroitimenetelmä. Tämän tutkimuksen perusteella immunomagneettisia helmiä ei kannata yhdistää suoraan vasta-aine-Qdot-kompleksiin, vaan vapauttaa helmistä vasta-aineet tai DNA:t, vasta-aine-Qdot-kompleksilla tai edistyneellä PCR-tyyppisellä menetelmällä detektoitavaksi.
- Qdot-leimat ovat käyttöominaisuuksiltaan orgaanisia parempia. Ne ovat kuitenkin ”isokokoisia” orgaanisiin väreihin verrattuna ja voivat aiheuttaa steeristä estoa, joka himmentää fluoresenssia. Vertailun vuoksi olisi hyvä testata uusia orgaanisia leimävärejä.
- SepLED-prototyyppi mittaa vain yhtä eksitaatio-emissio-paraa (360/625). Laitetta olisi kehitettävä mitta-alueeltaan monipuolisemmaksi myös muille UV-valolla virittyville leimaväreille kaupallistamispotentiaalin lisäämiseksi.
- IMB:hin perustuva kompetitiivinen fluoresenssitesti olisi ehdottomasti kehitettävä ja optimoitava valmiiksi, koska se olisi nopea ja yksinkertainen toteuttaa rutiinimenetelmänä.
- Hankkeessa kehitettyjen Qdot-leimauksien rinnalle olisi syytä kehittää luminesenssiin perustuvat vaihtoehdot (ATP- ja peroksidaasi) sekä capture-antibody -testiin että IMB:n kanssa käytettäviksi. Tämä parantaisi detektioherkkyttä entisestään ja vähentää testien reagenssikuluja.
- Selektiivisenä kasvatusmediumina ½ Fraser estää muiden mikrobien kasvua, mutta se myös hidastaa *L.monocytogenes* -bakteerin kasvua. Lisäksi se näyttää muuttavan kyseisen bakteerisolun pintarakennetta siten, että vasta-aineiden kiinnittyminen vaikeutuu. Kiinnittymisen parantamiseksi ja kasvun nopeuttamiseksi tulisi käyttää vähemmän selektiivisiä kasvatusmediumia.

3. Vierasesinetutkimus

3.1. Taustaselvitys

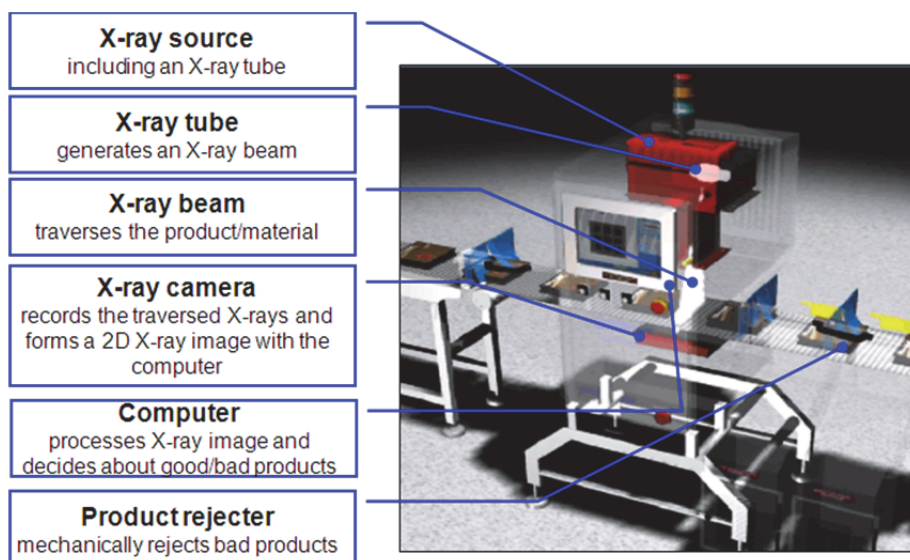
Elintarviketeollisuuden globalisoitumisen ja keskittymisen johdosta myös elintarvikkeiden vierasesinetarkastuksen tarve on jatkuvasti lisääntynyt. Elintarvikkeiden valmistajilta odotetaan yhä laajempaa omavalvontaa myös ruokaan päätyvien vierasesineiden eliminoimiseksi jo valmistuspaikalla.

Vuosikymmenien ajan pääasialliset menetelmät vierasesineiden eliminoimiseksi ovat olleet tuotteiden visuaalinen tarkastus sekä metallinpaljastimien käyttö. Ihmisen silmä on ainutlaatuinen instrumentti tuotteiden tarkastuksessa, mutta työ on raskasta, ei erityisen mielekästä ja tehokkuus lopulta melko huono. Metallinpaljastinlaitteet ovat olleet pitkään jossain mielessä perusteltuja investointeja kun muitakaan menetelmiä ei ole ollut saatavilla kohtuullisilla investoinneilla. Jonkinlainen tarkastusmenetelmä on asiakkaiden tai kilpailun niin vaatiessa pitänyt toteuttaa.

Vasta viimeisen 10 vuoden aikana röntgenkuvausmenetelmät ja -laitteet ovat yleistyneet elintarvikkeiden laadunvalvonnassa. Röntgenkuvaukseen perustuvan tuotetarkastuksen ilmiselviä etupuoolia ovat ainakin

- mahdollisuus havaita kaikkia vierasesineitä, mm. lasia ja kiviä metallien lisäksi
- mahdollisuus tarkastaa metallipakkaukseen tai folioon pakattuja tuotteita
- tuotteen muidenkin ominaisuuksien kuten koon, määrän tai muodon mittaaminen

Röntgenlaitteiden yleistymistä elintarviketeollisuudessa on pitkään jarruttanut matkatavaroiden tarkastuslaitteista lainattu liian raskas ja kallis teknologia sekä liian vähäinen kilpailu. Vasta viime vuosina on kehitetty elintarvikkeiden tarkastukseen optimoituja laitteita (kuva 29.), joiden hinta alkaa olla varsin kilpailukykyinen metallinpaljastinlaitteisiin verrattuna. Lähes kaikki suuret elintarvikkevalmistajat ovat tehneet strategisen päätöksen röntgenteknologian yhä laajemmasta käytöstä valmistuslinjoillaan.



Kuva 29. Elintarviketarkastuksessa käytettävän röntgenlaitteen pääosat.

Elintarvikkeiden vierasesinetarkastukseen suunniteltu röntgenlaite (kuva 30.) muistuttaa toimintaperiaatteeltaan lentokenttien käsimatkatavaran tarkastuksessa käytettyjä laitteita. Laitteessa on röntgenlähde, kuvan muodostava röntgenkamera tai -ilmaisin, sekä tyypillisesti tuotetta kuljettava liukuhihnakuljetin. Viallinen tuote poistetaan kuljettimelta esim. paineilmalla toimivaa hylkääjää käyttämällä, röntgenlaitteen ohjelmisto ohjaa hylkääjää automaattisesti.

Elintarvikkeiden vierasesinetunnistus toteutetaan tuotantolinjalla linjanopeudella ja useimmissa tapauksissa tarkastus suoritetaan valmiille, pakatulle tuotteelle. Nykyisellä röntgenteknologialla nähdään hyvin metalleja, lasia ja keraamisia materiaaleja sisältäviä vierasesineitä. Röntgentarkastus erottaa lähtökohtaisesti hyvin kaikki tiheydeltään merkittävästi itse elintarvikkeesta poikkeavat esineet, jotka ovat lisäksi röntgenlaitteen röntgenkameran resoluution kannalta riittävän suuria. Materiaalista riippuen tyypillinen, pienin havaittava vierasesine on kooltaan 0.6–2.0 mm.

Elintarvikkeiden röntgentarkastuslaitteet ovat teknologisesti vielä jäljessä esim. matkalaukkujen tarkastuksessa käytettäviä laitteita ja lääketieteellisiä röntgenlaitteita. Pääasiallisesti kehitystä ovat rajoittaneet yleiset hintapaineet elintarvikkeiden tarkastuslaitteiden osalta sekä havaittavien vierasesineiden pieni koko. Merkittävänä tekijänä on kuitenkin ollut myös vähäisempi panostus tuotekehitykseen; markkina ei ole aiemmin ollut riittävän suuri tuotekehityspanostuksen vaatimalle rahoitukselle.



Kuva 30. Elintarvikkeiden vierasesinetarkastukseen suunniteltu Meki-röntgenlaite.

FSC-hankkeen tutkimuksellisessa osuudessa tutkittiin ja testattiin uutta teknologiaa ja mittausmenetelmiä on-line vierasesinetunnistukseen.

Vierasesinetunnistukseen liittyen FSC-hankkeen pääasiallinen tutkimustyö kohdistui ns. moni-energiatunnistukseen. Tarkastettavasta tuotteesta muodostetaan erityisen, tätä tarkoitusta varten kehitetyn Dual-Energy-röntgenkameran (DE) avulla kaksi eri röntgenkuvaa. Röntgenkuvien matemaattisella käsittelyllä voidaan muodostaa prosessoitu tulokuva, jossa esim. määrätyn vierasesineen kontrastia voidaan korostaa itse elintarvikkeeseen nähden. Tällä menetelmällä voidaan erotuskykyä parantaa sellaisten vierasesinemateriaalien osalta, jotka ovat tiheydeltään lähempänä itse elintarviketta.

FSC-hankkeessa suoritettu tutkimus- ja testaustyö edellytti teknistä erityisosaamista mm. röntgenteknologian, optisen teknologian, ohjelmoinnin, sekä datan- ja kuvankäsittelytekniikan osalta.

Tutkimustyön käynnistysvaiheessa toteutettiin erilaisten röntgenlaitteiden ja mittausmenetelmien testaukseen vaadittava testirata, jolla röntgenlaitteita voidaan koekäyttää ja testata elintarvikkeiden valmistuslinjoja vastaavissa olosuhteissa. Rengasmaisen testiradan suunnittelua on selvitetty erillisesti jäljempänä hankkeessa toteutetun toimintaympäristön kuvauksen yhteydessä.

Tutkimustyön lähtökohtia selvitettiin laajasti tutkimalla konventionaalisella teknologialla toimivan, elintarvikkeiden tarkastukseen suunnitellun röntgenlaitteen suorituskykyä. Näin pyrittiin selvittämään vertailukohta tulevalle DE-kehitystyölle.

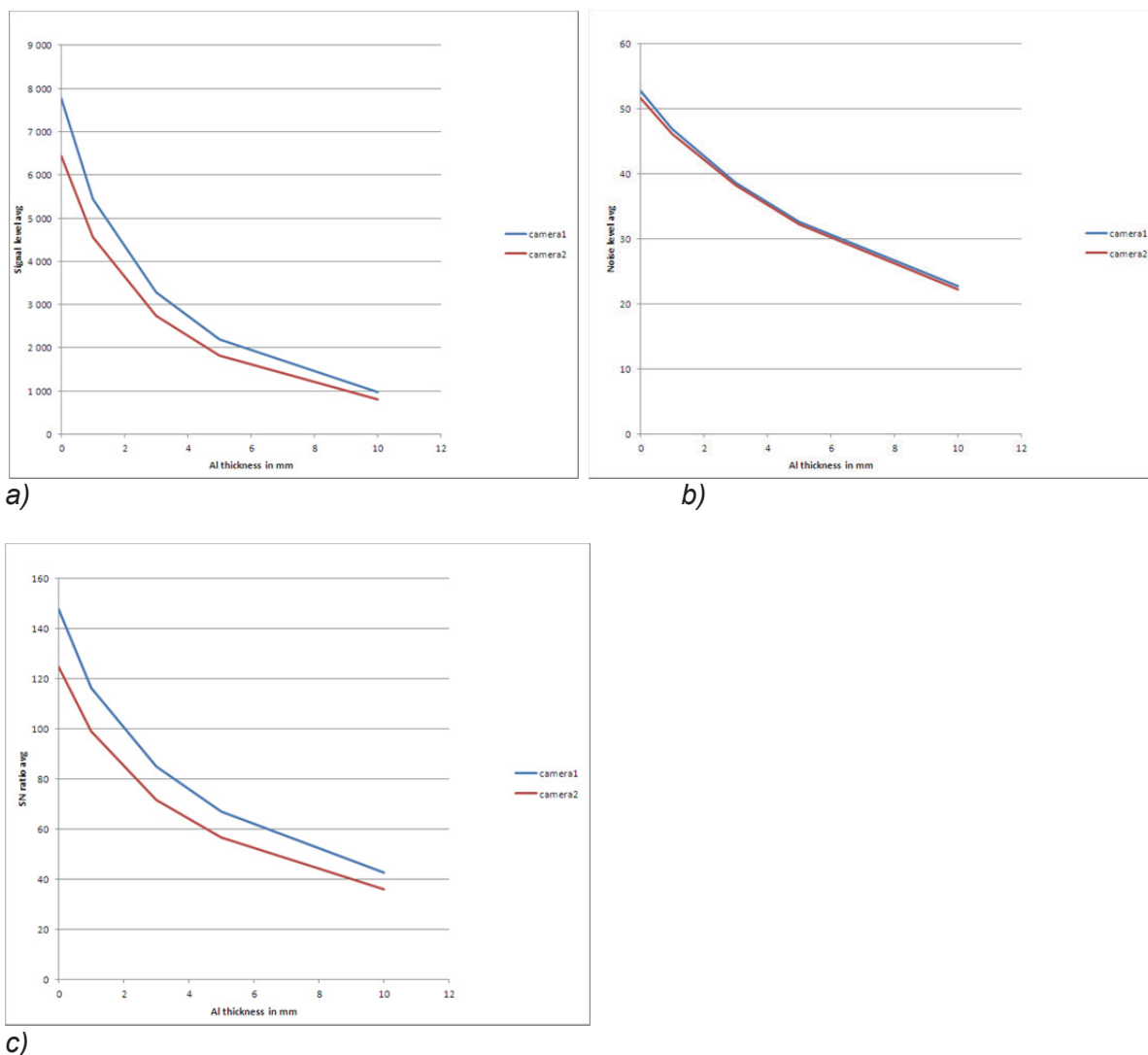
Alla on selvitetty aluksi konventionaalisella (Single Energy, SE) röntgenkuvaustekniikalla saavutettua suorituskkyä sekä sen jälkeen esitetty pääasialliset tulokset DE-menetelmän, DE-röntgenkameran ja DE-röntgenlaitteen kehitystyöstä.

3.2. Konventionaalisen (SE) röntgenlaitteen suorituskkyymittaukset

FSC-laboratoriossa koottiin 3 kpl Mekitec Oy:n ns. MEKI-laitteita, joiden suorituskkyä testattiin alla kuvatulla tavalla. Näiden suoritusarvojen pohjalta lähetettiin kehittämään paremman suorituskvyn omaavaa DE-kuvaustekniikkaa. Pääasialliset mittaustulokset on esitetty alla.

3.2.1. Signaalitason ja kohinan mittaus

MEKI-laitteen signaali-kohina suorituskkyä selvitettiin kahdella erilaisella röntgenkameralla, tyypillisillä röntgenasetuksilla ja kuljetinnopeudella ilman kuvauskohdetta sekä erilaisilla alumiinisilla testikappaleilla. Tulokset on esitetty kuvassa 31.

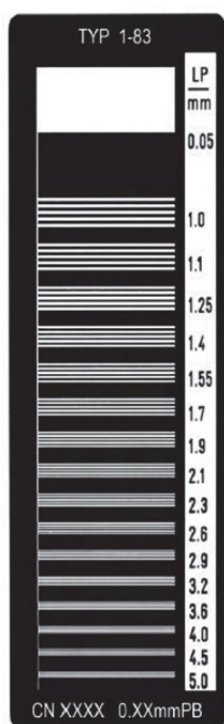


Kuva 31. Meki-röntgenlaitteen: a) signaalitaso, b) kohinataso, ja c) signaali-kohinasuhde.

Testaus suoritettiin kahta erilaista kamerarakennetta käyttäen.

3.2.2. Paikkaresoluution mittaus

Pienten esineiden erotuskykyä mitattiin käyttäen referenssinä kahta erilaista, lääketieteellisten laitteiden arvioinnissa yleisesti käytettyjä testilevyä (kuva 32). Testilevyt ovat hyvin ohuita, muovin sisään valettuja lyijyfolioita (Pb). Foliassa on ohuita, erilevyisiä lyijynauhoja järjestettynä siten, että kunkin erilevyisen nauhan vieressä on aina saman levyinen rako. Esimerkiksi alueella, jolla on 0.5 mm levyisiä lyijynauhoja, kahden vierekkäisen nauhan välissä on 0.5mm rako. Vastaavasti 0.1 mm levyisten lyijynauhojen välillä on 0.1 mm rako jne. Resoluutio arvioidaan visuaalisesti röntgenkuvasta siten, että haetaan kuvasta se nauhaleveys, jolla erilliset nauhat voidaan vielä kuvasta erottaa.

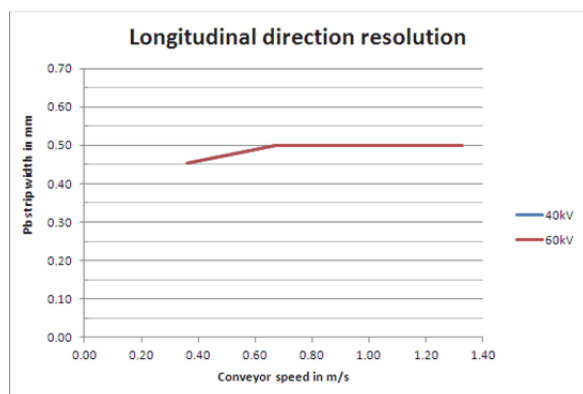


Kuva 32. Resoluutiotestauksessa käytetty testilevy CN41103.

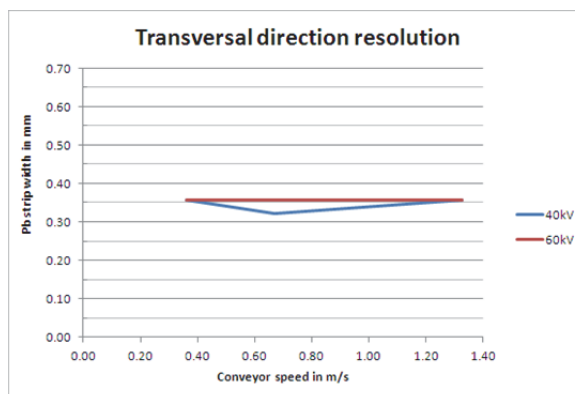
Testilevyllä on useita alueita, joiden sisällä lyijynauhat ja niiden väliset raot ovat saman levyisiä. Kunkin alueen viereen on testilevyllä merkitty lyijynauhojen leveys yksikössä LP/mm, mikä tarkoittaa viivaparia millimetrillä (LP=Line Pair). Kyseistä yksikköä on perinteisesti käytetty lääketieteellisten röntgenlaitteiden arvioinnissa. Viivapari tarkoittaa yhtä lyijynauhaa ja sen vieressä olevaa, saman levyistä rako. Siten esimerkiksi 3 LP/mm tarkoittaa 3 lyijynauhaa ja 3 samanlevyistä rako millimetrin matkalla. Yhden lyijynauhan leveys tällä alueella on siten $1\text{mm}/(3 \times 2) = 0.167\text{ mm}$.

Kukin testilevy mitattiin kolmeen kertaan kahdessa kohtisuorassa suunnassa sekä 45 asteen kulmassa. "Longitudinal" testituloksissa tarkoittaa, että lyijynauhat ovat kohtisuorassa laitteen kuljettimen kulkusuuntaa vastaan. Vastaavasti "Transversal" testituloksissa tarkoittaa, että lyijynauhat ovat samansuuntaiset kuin laitteen kuljettimen kulkusuunta.

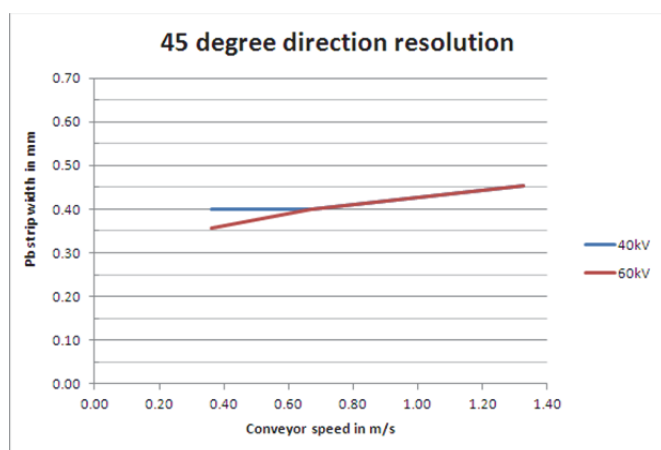
Resoluutiomittausten päätulokset on esitetty kuvassa 33.



a)



b)



c)

Kuva 33. Meki-röntgenlaitteen paikkaresoluutio: a) laitteen tuotekuljettimen pituussuunnassa, b) laitteen tuotekuljettimen poikittaissuunnassa, ja c) 45 asteen kulmassa. Kukin mittaus on suoritettu kahdella eri röntgenputken kiihdytysjännitteellä sekä eri kuljetinnopeuksilla.

Tuloksista voidaan todeta, että poikittaissuunnan resoluutio on odotetusti parempi kuin pituussuuntainen resoluutio, koska röntgenkameran rakenne on poikittainen ja pikselien erottuminen tuossa suunnassa parempi. Hieman ennako-odotusten vastaisesti kohtisuorien suuntien resoluutio ei heikkene vaikka kuljetinnopeus nostetaan sangen suureksi (1.33 m/s). Tämä on luonnollisesti toivottu ominaisuus nykyaikaisilla, nopeilla tuotantolinjoilla.

3.3. Dual Energy -tutkimukseen liittyvä kehitystyö ja mittaukset

3.3.1. Teoreettinen tausta

Dual Energy tekniikasta (DE) on paljon kokemusta lääketieteellisessä kuvantamisessa. Samoin käytännössä kaikki lentokenttien matkalaukujen ja käsimatkatavaroiden läpivalaisulaitteet toimivat nykyään DE-tekniikalla.

Erona elintarvikkeiden tarkastukseen, jossa tyypillisesti etsitään pienikokoisia vierasesineitä ennalta tunnetun aineen joukosta, matkatavaratarkastuksessa on läpivalaistava paksuja, ennalta tuntemattomista materiaaleista koostuvia kohteita. Tällä erolla on olennainen merkitys DE- tekniikan soveltuvuudelle elintarviketeollisuuteen.

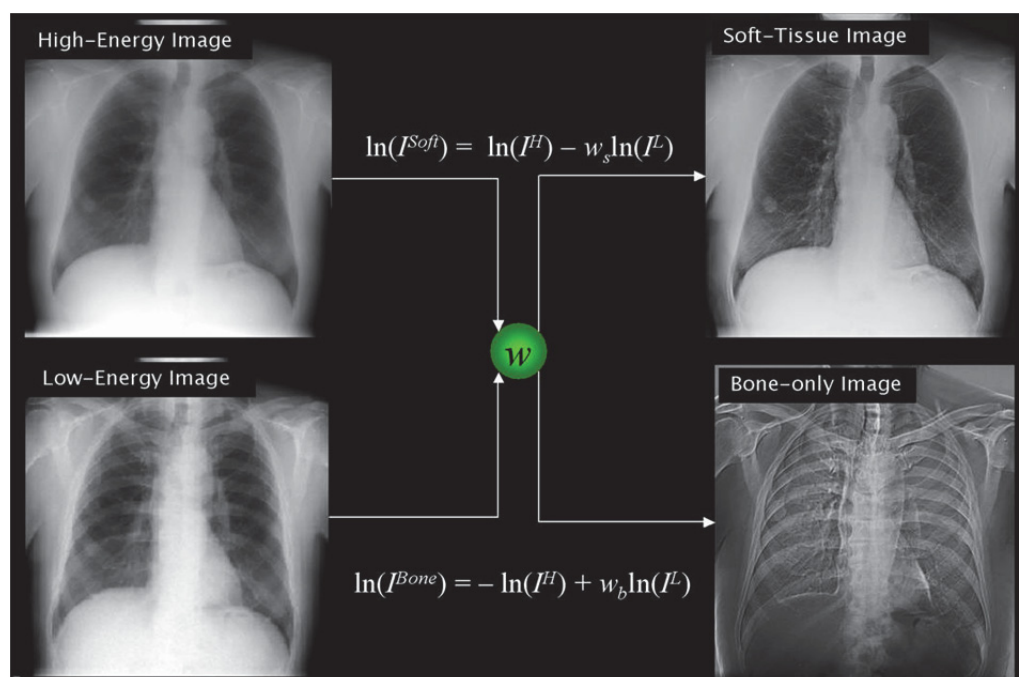
DE-tekniikan taustalla olevan teorian alkuperäisenä kehittäjänä pidetään R.E Alvarezia, jonka jatkotyön tuloksia (Lehmann 1981) voidaan soveltaa myös elintarvikkeiden DE-röntgenkuvaukseen.

Alvarez osoitti monienergiaisen röntgenkuvauksen hyödyt ja sen, että materiaalien erottuvuutta toisistaan voidaan parantaa monienergistä kuvausta hyödyntämällä. Teorian yksityiskohtia ei esitellä tässä yhteydessä, mutta perushavainto on se, että muodostamalla kahdesta, eri tavoin säteilyä vaimentavasta materiaalista kantavektorit, voidaan minkä tahansa muun materiaalin röntgenvaimeneminen esittää näiden kantavektoreiden vektorisummina. Hieman yksinkertaistaen voidaan sanoa, että röntgensäteilyn kannalta minkä tahansa materiaalin voi esittää kahden muun materiaalin sopivasti valittujen paksuuksien summana.

Alvarezin teorian yleistyksiä kaksienergiseen läpivalaisuun ja eri materiaalien erottumisen parantamiseen on esitetty mm. hyvin perusteellisessa Rebuffelin ja Dintenin yleiskatsauksessa (Rebuffel & Dintem 2006) sekä olennaisesti samaa teemaa yksinkertaistettuna toistavassa Upstate Medical University verkkokoulutusmateriaalissa (Upstate).

Dual Energy -kuvauksessa hyödynnetään sitä, että matalilla ja korkeilla röntgensäteilyn energioilla röntgensäteily vuorovaikuttaa materiaalien kanssa eri tavoin. Lisäksi eri aineilla korkea- ja matala-energisien säteilyn vuorovaikutusvakioiden suhteet poikkeavat toisistaan. Näin voidaan ottamalla kuvia eri röntgenenergioilla samasta kohteesta saada näkyviin eri materiaaleja olevia kohteita.

DE-kuvaus tarjoaa sopivilla reunaehdoilla merkittäviä etuja erottuvuuden ja kontrastin parantamiseen, koska menetelmällä voidaan poimia erityisen hyvin näkyviin tai poistaa näkyvistä haluttuja materiaaleja. Kirjallisuudessa tyypillinen esimerkki on lääketieteellinen röntgenkuva, jossa on poistettu DE-menetelmällä luut näkyvistä ja näin helpotettu pehmytkudosten yksityiskohtien erottamista, kts kuva 34.



Kuva 34. Esimerkki DE-kuvauksen hyödyntämisestä lääketieteellisessä kuvauksessa (Richard).

FSC-hankkeessa on DE-kuvausmenetelmien teoriaa sovellettu siten, että laskennallisessa DE-röntgenkuvassa on pyritty hävittämään itse elintarvike jäljelle jäävän vierasesinemateriaalin kontrastin parantamiseksi. Joissain tapauksissa voi olla edullista toimia päinvastoin. DE-röntgenkuvauksella kuvauskohteesta saadaan kaksi datapistettä, eli röntgensäteilyn vaimenemiskertoimet kahdella eri energialla. Kahdella eri energialla otetuista kuvista saadaan siis kaksi mittausarvoa kunkin kuvapikselin osalta. DE-teorian mukaisesti kuvasta voidaan ideaalitapauksessa tällöin häivyttää kokonaan toinen edellä kuvatuista, kantavektormateriaaleista. Mikäli tuo aine on tunnettu ja sen paksuus tunnetaan, se voidaan etukäteen karakterisoida ja ohjelmoida röntgenlaitteen muistiin. Rakenteeltaan suhteellisen homogeenisen elintarvikkeen osalta nämä ehdot toteutuvat: itse elintarvikemateriaali

on toisen kantavektorin kanta-aine, sen paksuus tunnetaan eikä paksuus suuresti vaihtele ja tuote voidaan "opettaa" laitteen ohjelmistolle, jolloin kyseisen materiaalin röntgenvaimennuskertoimet tallennetaan laiteohjelmiston muistiin. On huomattava, että tämä menettely on erityisen edullinen koska toisen kanta-aineen röntgenabsortio tulee tallennettua muistiin juuri sellaisena kuin se todellisuudessa on, eikä röntgensäteilyn spektrin yksityiskohdista tai kyseisen elintarvikkeen alkuainerakenteesta tarvita yksityiskohtaisempaa tietoa.

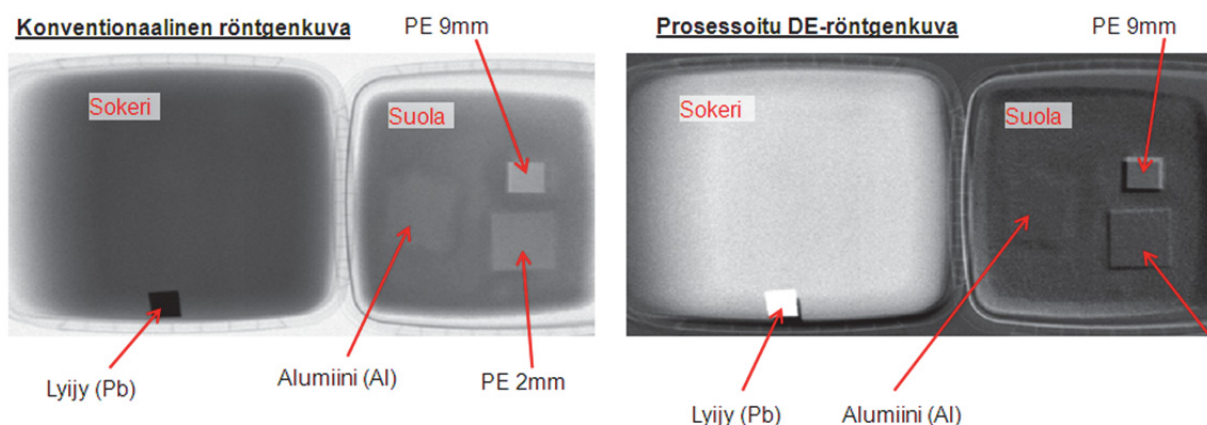
Todellinen DE-kuvaus poikkeaa kuitenkin huomattavasti teoreettisesta, ideaalisesta DE-kuvauksesta. Itse kuvaustapahtumaan sekä kuvankäsittelyyn liittyy useita virhelähteitä ja kuvan laatua heikentäviä tekijöitä. Erittelemättä tarkemmin kunkin osatekijän vaikutuksia, seuraavassa on listattu pääasialliset DE-kuvan laatuun vaikuttavat tekijät:

- DE-teoria lähtökohtaisesti edellyttää monokromaattista eli kahdella diskreetillä energialla esiintyvää röntgensäteilyä; todellisen röntgenlaitteen röntgenlähteenä on röntgenputki, jonka energiaspektri on jatkuva, eli röntgensäteily emittoituu laajalla energiakaistalla
- Toisen kantavektormateriaalin poistaminen röntgenkuvasta on erityisen edullista silloin kun kuvassa on esim. kahta erilaista, paksuudeltaan samassa suuruusluokassa olevaa ainetta (vrt. luu-pehmytkudos), elintarvikkeilla kuitenkin usein elintarvike on huomattavasti paksumpi kuin vierasesine, joka yritetään havaita
- Kustannussyistä kahden erillisen röntgenlähteen ja kahden erillisen röntgenkameran käyttö ei ole mahdollista, joten kahdella energialla suoritettavan kuvauksen tulee perustua yhden röntgenlähteen käyttöön ja säteilyn spektrin suodattamiseen kahden, mahdollisimman erillisen röntgenenergiakaistan aikaansaamiseksi
- Röntgenspektrin suodattimen edellyttää aika merkittävien kompromissien tekoa, energiakaistat erottuvat lähtökohtaisesti huonosti toisistaan
- Elintarvikkeet ovat merkittävästi esim. käsimatkatavaraa kevyempiä ja ohuempia kuvauskohteita, joten käytettävät röntgenenergiat ovat merkittävästi alempia mikä tuo omat erityispiirteensä DE-röntgenkameran suunnitteluun
- DE-röntgenkamerassa kahdella eri energialla toimivat kamera-anturit voidaan järjestää joko päällekkäin, kuten käsimatkatavaraa kuvaavissa laitteissa, tai peräkkäin, jolloin ongelmaksi muodostuvat kuvaustapahtuman geometriset virheet ja kahden eri ajanhetkillä muodostetun kuvan keskinäinen kohdistaminen
- DE-laskenta lähtökohtaisesti lisää kuvan kohinaa, joten kontrastin tulee parantua merkittävästi todellisen kuvanlaadun lisäämiseksi
- Elintarvikkeiden kuvauksessa käytettävät alhaiset röntgenenergiat ovat alttiimpia röntgensäteilyn sironnan aiheuttamille kuvavirheille ja DE-kuvauksen geometria tulee suunnitella ja testata erityisen huolellisesti.

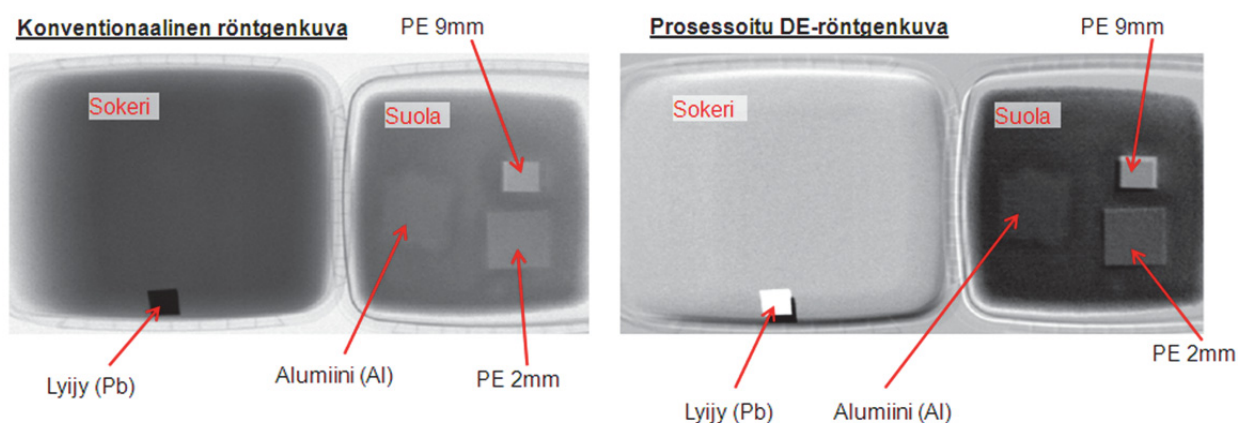
3.3.2. Suoritetut DE-testaukset

DE-teorian ja elintarvikkeiden DE-kuvauksen testausta suoritettiin aluksi ns. kaksoiskuvaustekniikalla, eli kuvaamalla sama kohde kahteen kertaan kahdella erillisellä röntgenlähteen energia-asetuksella. Tällä pyrittiin selvittämään DE-kuvauksen perusalgoritmien soveltuvuutta elintarvikkeiden tarkastamiseen ja saavutettavan kontrastinparannuksen merkitystä. On huomattava, että tämä menettely antaa optimistisen kuvan saavutettavasta kuvanlaadun parantumisesta, koska todellisella DE-kameralle ei suodatusmenetelmästä johtuen voida saavuttaa yhtä hyvää energiaseparaatiota.

Kuvissa 35. ja 36. on esitetty tuloksia DE-algoritmin toimivuudesta kuvattaessa kahta, alkuainekoostumukseltaan toisistaan merkittävästi poikkeavaa elintarviketta, sokeria ($Z_{eff} = 7.0$) ja suola ($Z_{eff} = 15.3$). Aineen efektiivinen järjestysluku Z_{eff} -kuvaa materiaalin todellista röntgensäteilyn pysäytystehokkuutta. Eräiden elintarvikkeiden tarkastuslaitteiden kannalta olennaisten materiaalin Z_{eff} -arvoja on esitetty taulukossa 2.



Kuva 35. Esimerkki DE-algoritmin testauksesta kahdella alkuainekoostumukseltaan merkittävästi poikkeavalla elintarvikkeella, suola eliminoitu kuvasta, kts. teksti.



Kuva 36. Sama kuvaustapahtuma kuin kuvassa 36 mutta eri DE-algoritmi, sokeri eliminoitu kuvasta, kts. teksti.

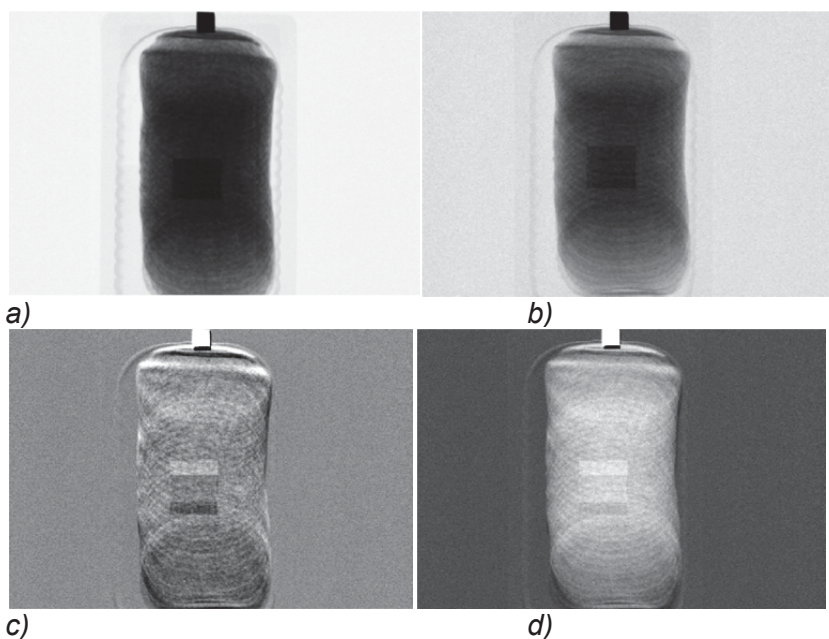
Kuvassa 35 on esitetty konventionaalinen, yhdellä röntgenenergialla otettu röntgenkuva ja prosessoitu DE-röntgenkuva vierekkäisistä muovirasioista, joista vasemmanpuoleisessa on sokeria ja oikeanpuoleisessa on suolaa. Materiaalipaksuudet on valittu siten, että konventionaalisisessa kuvauksessa saavutetaan likimain sama harmaasävytaso, eli materiaalit näyttävät kuvassa likimain samalta. Lisäksi suolapurkkiin on asetettu kuvan mukaisesti kaksi eripaksuista (2 mm ja 9 mm) polyeteenipalaa ja yksi 0.5mm paksuinen alumiinilevy. Kuvan 36 tapauksessa on käytetty DE-algoritmiä, joka pyrkii kokonaan poistamaan suolan kuvasta. Algoritmin vaikutuksesta suolan tilalla ei ole mitään materiaalia vaan kuvan tulisi muistuttaa tilannetta jossa purkissa ei ole suolaa, ja jäljelle jäävät vain mainitut PE ja alumiinikappaleet. Suolan "poistuminen" voidaan todeta siitä, että suola ja kuvan reunan tausta-alue ovat likimain samansävyisiä. Vastaavasti sokeri erottuu selkeästi kuvan taustaväristä. On huomattava että DE-algoritmi on logaritminen ja harmaasävyasteikko prosessoidussa DE-kuvassa ei enää millään lailla suoraan kuvaa röntgensäteilyn intensiteettiä.

Taulukko 2. Eräiden materiaalien efektiivisiä järjestyslukuja (Z_{eff})

Compound	Elements of the compound				Molecular mass	Contributing mass of element	Mass % of element	Zeff	Notes
	Name	#	Z	A					
Water	H	1	1	1.008	33.006	1.01	3.05 %	7.86	
	O	2	8	15.999		32.00	96.95 %		
Polyethene	C	2	6	12.011	28.054	24.02	85.63 %	5.53	
	H	4	1	1.008		4.03	14.37 %		
Salt	Na	1	11	22.990	58.44	22.99	39.34 %	15.31	Table Salt
	Cl	1	17	35.450		35.45	60.66 %		
Sugar	C	12	6	12.011	342.297	144.13	42.11 %	7.00	Table Sugar, Sucrose, Saccharose
	H	22	1	1.008		22.18	6.48 %		
	O	11	8	15.999		175.99	51.41 %		
Aluminum								13.00	

Samoja lähtökuvia on prosessoitu kuvassa 37. tällä kertaa siten, että on käytetty DE-algoritmia, joka pyrkii kokonaan poistamaan sokerin kuvasta. Tässä tapauksessa puolestaan sokeri ja kuvan reunan tausta-alue ovat samansävyisiä. Nyt suola erottuu selkeästi taustaväristä.

Polyeteenin $Z_{\text{eff}} = 5.5$ ja siten se poikkeaa melko vähän sokerista, jonka $Z_{\text{eff}} = 7.0$. Tässä esimerkissä polyeteenin kontrasti suolan seassa paranee "sokerin poistolla", koska sokerin poistaminen kuvasta hävittää myös efektiiviseltä järjestysluvultaan lähellä olevan polyeteenin vastetta. Polyeteenin tilalla ei prosessoidussa kuvassa ole mitään ja siten tuon tyhjän tilan pieni vaste erottuu paremmin suolan selvästi korkeammasta röntgenabsorptiosta. Tämä esimerkki osoittaa sen, että oikean algoritmin valinta ei aina ole päivän selvää, vaan se tulee tehdä ottaen huomioon sekä kuvattavan elintarvikkeen, että oletettujen vierasesinemateriaalien röntgenabsorptio-ominaisuudet.



Kuva 37. Leikemakkarakpakkaus, alkuperäiset röntgenkuvat a) 30 kV, b) 60 kV, sekä DE-prosessoidut kuvat c) leikemakkara eliminoitu ja d) 0.5 mm alumiinilevy eliminoitu.

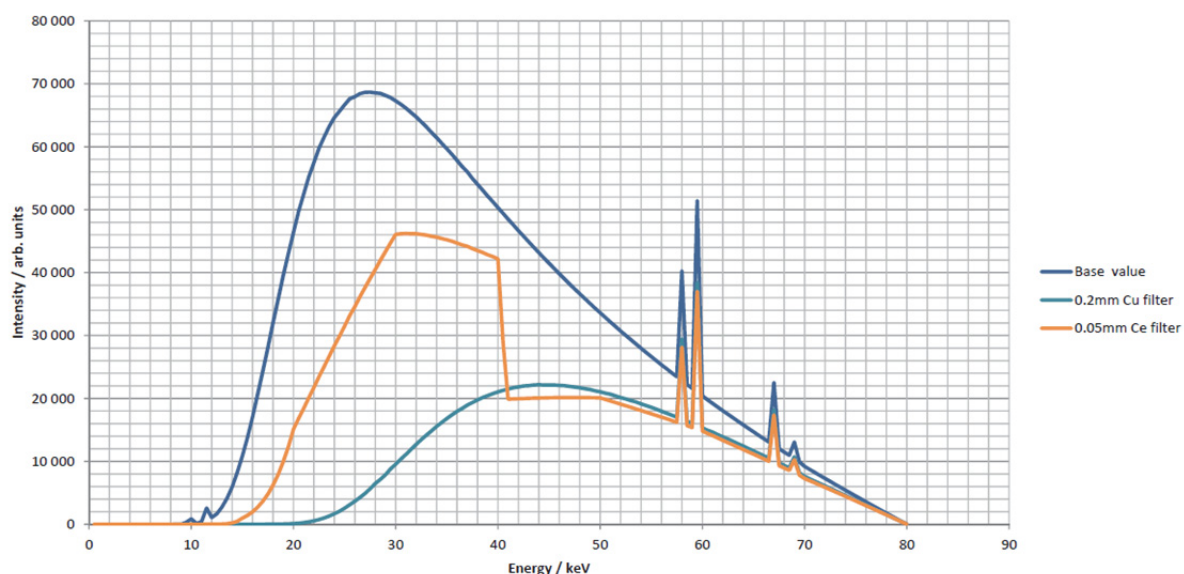
Kuten edellä mainittiin, DE-algoritmi lisää kuvan kohinaa ja saavutettavan kontrastin parantumisen tulee olla riittävän suuri syntyneeseen lisäkohinaan nähden. DE-kuvauksella voidaan useassa tapauksessa merkittävästi parantaa vierasesineen tai vieraan materiaalin erottumista elintarviketuotteen seasta. Dual energy tekniikka ei kuitenkaan sovellu hyvin ohuiden vierasesineiden tai vierasmaterialien kontrastin parantamiseen. Hyvin ohuen vierasesineen/vierasmaterialin ja kohtuullisen paksun elintarviketuotteen tapauksessa röntgenvasteen määrää niin suurelta osin itse elintarvike, että DE-algoritmin käyttäminen heikentää vierasesineen erottumista. Kuvassa 38. on esitetty konventionaaliset, yhdellä röntgenenergialla otetut röntgenkuvat 30 kV ja 60 kV röntgenputken jännitteillä sekä prosessoidut DE-röntgenkuvat vakuumpakatusta leikemakkarasta. Pakkauksen päälle on kuvauksessa asetettu 0.5 mm paksuinen alumiinilevy. On huomattava, että näin ohuen alumiiniesineen havaitseminen on yleisesti ottaen hyvin vaikeaa.

Alumiinilevy erottuu suuren kokonsa vuoksi kohtuullisesti molemmissa konventionaalisissa röntgenkuvuissa. DE-algoritmi sen sijaan tässä tapauksessa heikentää vierasesineen erottumista lisääntyneen kohinan johdosta. Prosessoiduissa kuvissa on lisäksi nähtävissä efekti, joka aiheutuu alumiinilevyn erilaisesta sijoituksesta alkuperäisissä röntgenkuvuissa. Alueet, joilla vain jommassakummassa kuvauksessa on ollut alumiinilevy, erottuvat vaaleina ja tummina alueina varsinaisen kohdealueen ylä- ja alareunassa.

3.3.3. Röntgenspektrien simuloinnit

Optimaalisen DE-röntgenkameran suunnitteluun liittyen suoritettiin laajalti simulaatioita MEKI-röntgenlaitteen röntgenspektriin ja sen suodattamiseen liittyen. Aiemmin esitetyllä tavalla DE-kuvaukseen suunnitellun elintarvikkeiden tarkastuslaitteen tulee kyetä toimimaan yhdellä röntgenlähteellä, jonka röntgenspektriä muokataan suodattamalla siten, että kahdelle röntgenkameralle saadaan mahdollisimman erilliset spektrit. DE-kameran Low Energy (LE) ja High Energy (HE) antureiden suodatinmateriaalina on perinteisesti käytetty ohutta kuparia laskemaan röntgensäteilyn intensiteettiä matalilla röntgenenergioilla. Korkeiden energioiden suodattamiseen ainoa vaihtoehto on eräiden harvinaisten metallien käyttö hyvin ohuina kerroksina. Näistä metalleista cerium on soveltuvin elintarvikkeiden tarkastukseen suunnatuissa röntgenkameroissa sillä tämän materiaalin ns. k-alfa reuna asettuu likimain 40 keV röntgenenergian kohdalle. Tästä johtuen ohut cerium folio pysäyttää yli 40 keV energian omaavat röntgenfotonit tehokkaammin kuin tuon energiatason alapuoliset fotonit.

Kuvassa 38 on esitetty simulaatiotulos 0.2 mm kuparifolion ja 0.05 mm cerium-folion suodatuseräisyyksistä. Tästä nähdään, että cerium suodatuksella voidaan selvästi korostaa alle 40 keV:n röntgenenergioita kun taas esim. 0.2 mm paksuinen kuparisuodatin korostaa korkeampia energioita. On kuitenkin huomattava, että röntgenspektrit ovat huomattavan päällekkäisiä ja energiaseparaatio on paljon heikompi kuin käytettäessä kahta eri röntgenputken kiihdytysjännitettä.



Kuva 38. Simulaatio DE-röntgenlaitteen mahdollisesta röntgenspektrin suodatuksesta, base value on suodattamaton röntgenspektri suoraan röntgenlähteestä. Kts lisäselvitys tekstistä.

3.3.4. DE-röntgelaitteprototyyppi

FSC-projektissa rakennettiin elintarvikkeiden kuvaukseen suunnitellun DE-röntgenkuvauslaitteen prototyyppi (kuva 39). Laitteen alustana käytettiin Mekitec Oy:n MidMeki-laitetta, joka muunnettiin tarkoitukseen sopivaksi. Prototyypin kehitystyö on kuvattu seuraavassa.



Kuva 39. Dual Energy -röntgenlaitteprototyyppi.

3.3.5. Dual Energy (DE) –kameran laiteympäristön, elektroniikan ja käyttöjärjestelmän suunnittelu ja toteutus

DE-kameraa ja ohjelmistoa testattiin MidMeki-röntgenlaitteistossa. DE-kameran toteutusta varten laitteiston alkuperäinen 80 kV röntgengeneraattori vaihdettiin 100 kV röntgengeneraattoriin, jotta saatiin enemmän eroa röntgenspektrin matalaenergisestä ja korkeaenergisestä osasta. Lisäksi uutta DE-kameraa varten suunniteltiin oma kuljetin, jotta tavallista kameraa huomattavasti kookkaampi DE-kamera saatiin mahtumaan kuljettimen sisälle. MidMeki-röntgenlaitteiston tietokoneen suorituskykyä DE-laskentaan epäiltiin ja sen vuoksi hankittiin tehokkaampi tietokonekortti ja prosessori varmistamaan DE-laskennan onnistuminen nopean tuotevirran analysoinnissa.

DE-röntgenkamera sisältää kaksi rinnakkaista, röntgenlaitteen kuljettimen kulkusuuntaan nähden poikittaista rivikameraa. Toisen kameran detektorit muodostavan kuvan käyttäen röntgenspekttrin matalaenergista osaa (LE-kamera) ja toinen käyttäen röntgenspekttrin korkeaenergista osaa (HE-kamera). Molemmat kamerat kuvaavat samanaikaisesti kuljettimella kulkevaa tuotetta, muodostaen kaksi kuvaa, LE-kuvan ja HE-kuvan. Toisiinsa kytketyt kamerat synkronoidaan ja kameroiden tuottamat kuvapaketit aikaleimataan, jotta kuvat voidaan kohdistaa keskenään ennen laitteiston tietokoneessa tehtävää DE-kuvan laskentaa ja generointia. Kameroiden synkronointi ja kuvapaketien aikaleimaus on toteutettu elektroniikalla kamerakortin FPGA:ssa.

Kuvapaketit siirretään USB-väylän kautta analyysiohjelmistolle. Koska DE-röntgenkamera tuottaa huomattavasti enemmän siirrettävää kuvadataa kuin perinteinen kamera, DE-kameran ja tietokoneen välistä tiedonsiirtoa ja siirrettävän kuvadatapaketin ominaisuuksia on optimoitu, jotta maksimi datansiirron suorituskyky saavutetaan.

DE-kameraa varten on kamerakortin FPGA:n elektroniikalla ja ohjelmistolla toteutettu myös dual energy -kuvantamisessa tarvittavat röntgenkameran lisäkalibrointimoodit (kuvan kalibrointi detektorin antaman signaalin minimi-, maksimi- tai keskiarvoon), DE-kameran mahdollisen viallisen kuvapisteen korjaaminen sekä lämpötilamuutosten aiheuttaman kuvan vääristymisen korjaaminen. DE-kameran tuottamat kuvat vastaanotetaan projektia varten kehitetyllä DE-ohjelmistolla, työnimeltään MultiAQUMaster. Ohjelmiston tärkeimpiä ominaisuuksia ovat

- Kytkeytyy röntgenkameraan kahta USB-porttia käyttäen
- Lähettää käskyjä kameralle USB-väylien kautta
- Vastaanottaa kameran vasteita, vastauksia ja kuvadataa kameralta
- Vastaanottaa virheettömästi kuvadataa kummastakin USB-portista nopeudella 110 Mbits/s eli yhteensä 2 x 110Mbits/s
- Purkaa datapakettit oikealla tavalla ja tunnistaa kuvadatan paketeissa olevat aikamerkinnot siten, että kaksi erillisesti kerättyä kuvakehystä voidaan ajallisesti kohdistaa toisiinsa
- Informoi näytöllä ja logitiedostoissa, mikäli datapaketteja on kadotettu
- Muodostaa laskennallisen, kolmannen kuvan kahdesta kameralta vastaanotetusta kuvasta on-line nopeudella
- Tunnistaa röntgenkameran lähettämästä datasta sen, että kuvausalueella on elintarviketuote/kuvattava esine ja liipaisee kuvakehyksen (frame). Liipaisu tapahtuu kun kuvassa näkyy riittävän monessa signaalikanavassa signaalilasku, joka merkitsee, että röntgensäteilyä vaimentaa jokin objekti
- Mahdollistaa käskyjen antamisen kameralle käyttäen graafista käyttöliittymää (GUI, esim. käskyvalikot, graafiset painikkeet) ja/tai käyttäen erillistä komentoriviä
- Esittää näytöllä käyttäjän valinnan mukaan joko 1024*n tai 640*m kokoisen röntgenkuvan joko jommankumman alkuperäisistä, kahdesta röntgenkuvasta, tai laskennallisesti muodostetun kolmannen kuvan

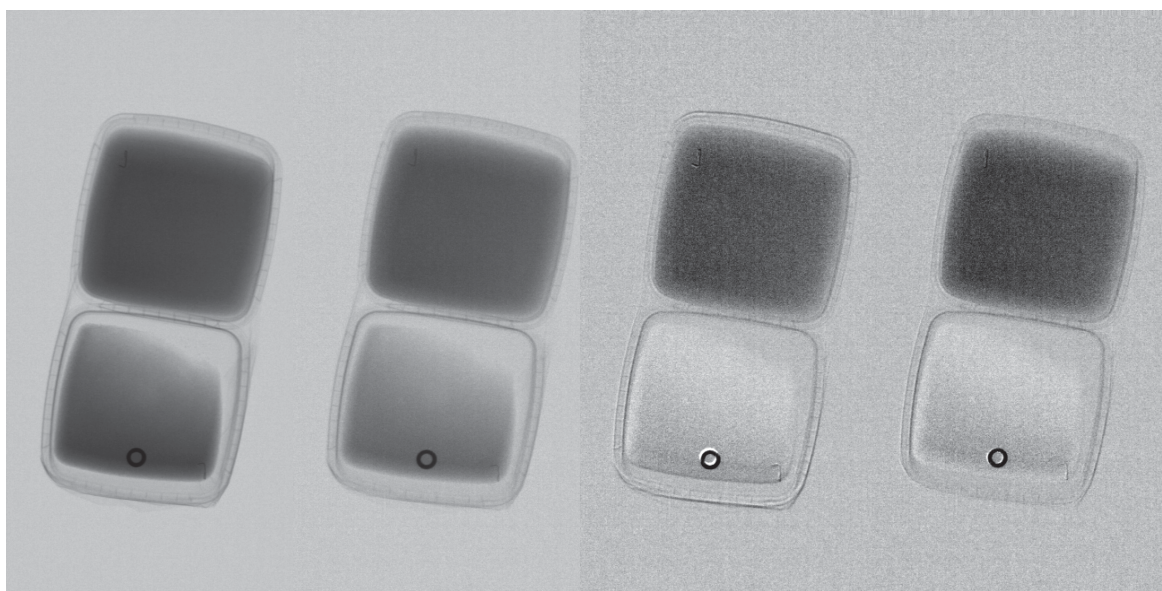
Edellä kuvattujen päätoimintojen lisäksi ohjelmistolta vaadittiin lisätoimintoja, joista toteutettiin seuraavat:

- Laitteen ja kameran käynnistyessä tai koska tahansa toiminnan aikana tunnistaa ja haluttaessa näyttää käyttäjälle röntgenkameran tyyppin lukemalla identifiointitiedot kamerasta ja säättää kuvankoon sekä USB-datapakettien formaatin tämän mukaisesti
- Asettaa kameran alustusarvot
- Mahdollistaa tärkeimpien kameran toimintaparametrien asettamisen GUI:ta käyttäen
- Mahdollistaa kaikkien kameran toimintaparametrien asettamisen komentoriviä käyttäen
- Suorittaa kameran offset- ja gain-korjaukset ohjaamalla laitteen röntgenlähdettä ja keräämällä kuvadataa korjausarvojen laskemiseksi. Korjausarvot lasketaan kerätystä kuvadatasta yksinkertaisilla yhteen/vähennys/kerto/jakolaskuilla
- Käynnistää ja keskeyttää röntgenkuvien ottamisen.

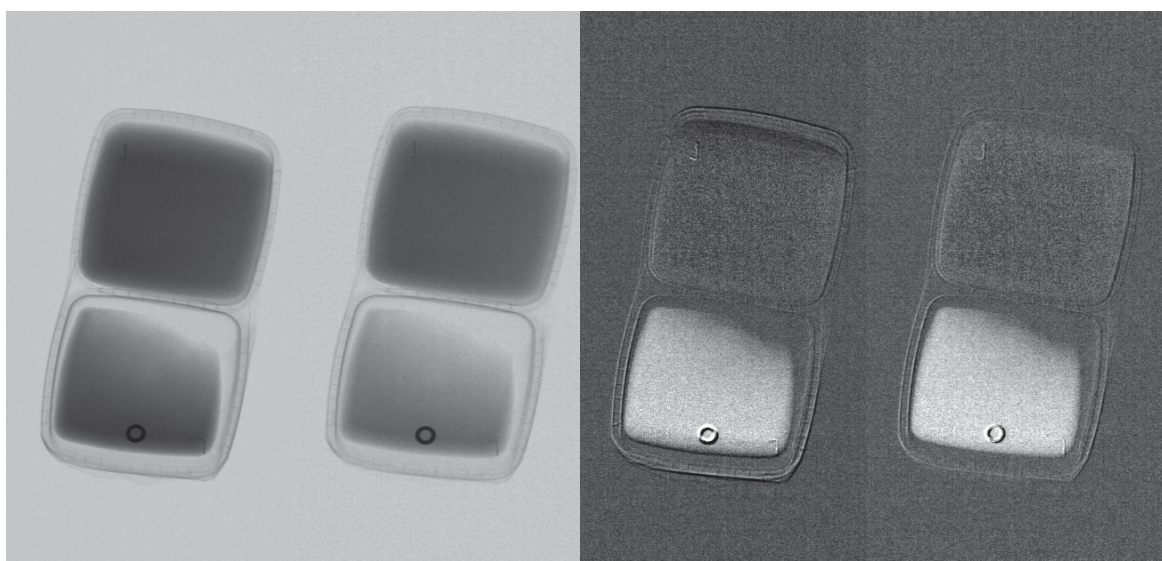
- Tallentaa kameralta kerätyt kuvat *.bmp tai *.txt formaatissa, käyttäjän valinnan mukaan, joko kaikki otetut kuvat tai vain ne kuvat, joissa vierasesine tunnistettu
- Mahdollistaa kuvien zoomauksen näytöllä samanaikaisesti taustalla tapahtuvan normaalin toiminnan ohessa, eli viimeisimpänä otettua kuvaa voidaan zoomata näytöllä
- Mahdollistaa röntgenkuvan harmaasävytason säädön tuotteen opetusvaiheessa
- eli kuvan mustaa ja valkoista vastaavia data-arvoja voidaan liukuvasti säätää esim pyöritettävällä tai liu'utettavalla näytön "säätimellä"
- Mahdollistaa uuden firmware-ohjelmiston lataamisen röntgenkameraan

3.3.6. Dual Energy -röntgenlaiteprototyypin testaus

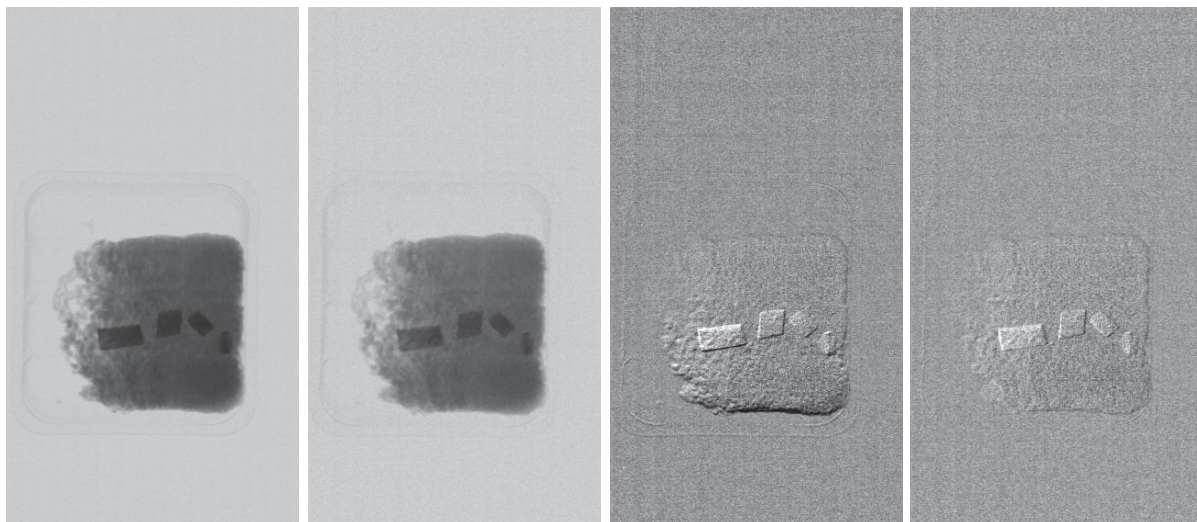
Rakennettua DE-röntgenlaiteprototyyppiä testattiin erityyppisillä elintarvikematriiseilla laitteiston toimivuuden ja menetelmän soveltuvuuden todentamiseksi. Alla on esitetty esimerkkikuvia Dual Energy-kuvauksen toimivuudesta erilaisilla elintarvikenäytteillä.



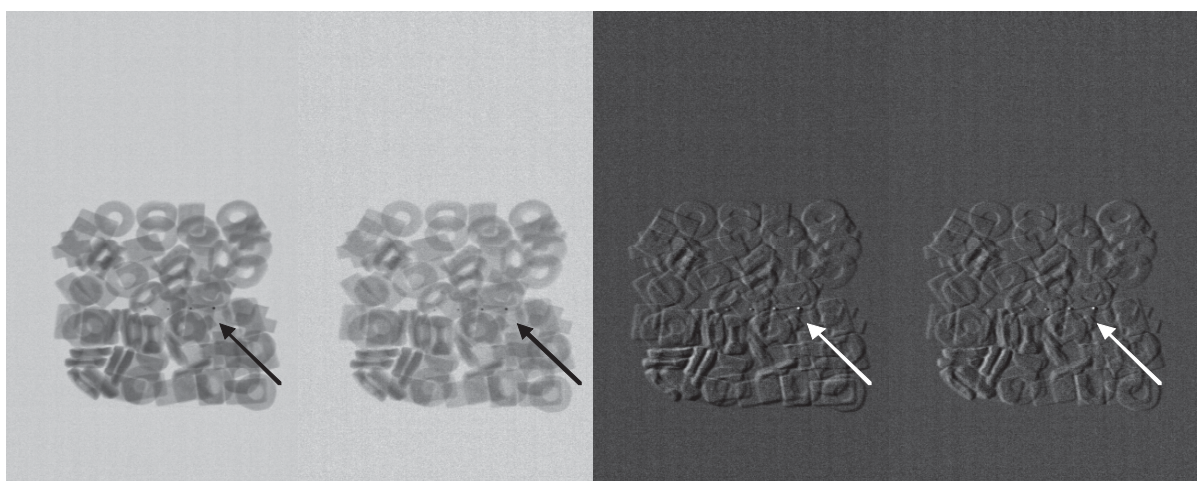
Kuva 40. Matalaenergia, korkeaenergia ja kaksi DE-kuvaa suolasta ja sokerista. DE-kuvissa suola hävitetty kuvasta, jolloin sokeri korostuu.



Kuva 41. Matalaenergia, korkeaenergia ja kaksi DE-kuvaa suolasta ja sokerista. DE-kuvissa sokeri hävitetty kuvasta, jolloin suola korostuu.



Kuva 42. Matalaenergia, korkeaenergia ja kaksi DE-kuvaa lihasta ja luusta. DE-kuvissa liha hävitetty kuvasta, jolloin luu korostuu.



Kuva 43. Matalaenergia, korkeaenergia ja kaksi DE-kuvaa karkkipussista ja teräsvierasesineliuskasta. DE-kuvissa karkit hävitetty kuvasta, jolloin teräspallot korostuvat.

4. Yhteenveto

Ruuan profiloituminen vientituotteeksi, kuluttajien liikkuvuus, suurina erinä valmistettavien prosessoitujen ja valmisruokien käytön lisääntyminen sekä globaalit trendit lisäävät merkittävästi ruokaturvallisuusriskiä. Viranomaiset kiristävät valvontavaatimuksia ja kuluttajat haluavat enemmän tietoa ruokansa turvallisuudesta. Tämä kasvattaa elintarviketeollisuuden vierasesineiden- ja aineiden oma-valvontatarvetta.

FSC -projektin tavoitteena oli luoda toimintaympäristö, joka mahdollistaa ja tukee ruokaturvallisuusratkaisujen kehittämistä globaalien markkinoiden lisääntyviin tarpeisiin. Tavoitteena oli luoda pohja uudelle liiketoimintasegmentille, joka hyödyntää vahvaa teknologiaosaamista ja luo jatkossa uusia työpaikkoja.

Projektin tavoitteena oli synnyttää alueelle yrityksistä sekä tutkimus- ja koulutusorganisaatioista koostuva toimintarypäs, joka hyödyntää projektissa syntyvän FSC-toimintaympäristön palveluita elintarvikkeiden turvallisuusratkaisujen kehittämiseen. Tärkeinä yhteistyökumppaneina Oulun Food Safety Clusterissa olivat elintarvikeyritykset, joilla on tarvetta kehittyneeseen omavalvontaan. Toimintaympäristön ja sen -mallin toimivuuden testaamiseksi projektissa tavoitteena oli kehittää uusia mittalaitteprototyyppejä. Prototyypin avulla tarkoitus oli tehdä osaamista tunnetuksi alueella sekä toimivien kohdeyritysten keskuudessa että kansallisesti ja kansainvälisesti. Tavoitteena oli myös koota ruokaturvallisuusklusteripohja edistämään ja laajentamaan kehitystyötä useampien toimijoiden joukossa sekä edistää uuden yritys- ja liiketoiminnan sekä työpaikkojen syntyä. Syntyneet prototyypit ovat yhteistyöympäristössä kohdeyritysten testattavissa luodussa testausympäristössä ja kohdeyritysten tuotantolinjoilla.

FSC toimintaympäristöön on rakennettu Oulun elintarviketurvallisuuden tutkimuksen ja kehityksen osaamiskeskittymä. Toimintaympäristö on kokonaan uuden tyyppinen poikkitieteellinen lähestymistapa elintarviketurvallisuuden menetelmien ja teknologioiden kehittämiseen. Toimintaympäristö on myös pohja, jolle tulevaisuuden elintarviketurvallisuusklusteri rakentuu.

FSC laboratorio on varusteltu vierasesinetunnistukseen (kuva 44) sekä mikrobittunnistukseen liitetyillä uusimmilla tutkimuslaitteilla ja -välineillä. FSC-laboratorio sisältää myös elektroniikka- ja mekaniikkatyöpajat välineineen. Toimintaympäristössä yhdistyy molekyylibiologian ja teknologian osaamisalueet poikkiteknologisessa osaamisverkostossa. Alan yritystoiminta on läsnä toimintaympäristössä tiiviisti.



Kuva 44. FSC toimintaympäristön vierasesinetunnistuksen testirata mittalaitteineen.

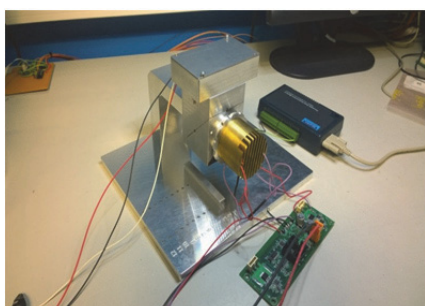
Projektin tutkimukselliset ja kehitykselliset tavoitteet jakautuivat vierasesinetunnistukseen ja mikrobittunnistukseen. Vierasesinetunnistuksessa tutkimustyön lähtökohtia selvitettiin laajasti selvittämällä konventionaalisella teknologialla toimivan, elintarvikkeiden tarkastukseen suunnitellun röntgenlaitteen suorituskykyä. Näin pyrittiin selvittämään vertailukohta tulevalle Dual Energy-kehitystyölle. DE-kuvaus tarjoaa sopivilla reunaehdoilla merkittäviä etuja erottuvuuden ja kontrastin parantamiseen, koska menetelmällä voidaan poimia erityisen hyvin näkyviin tai poistaa näkyvistä haluttuja materiaaleja. Dual Energy (DE) röntgenkameralla pyritään parantamaan vaikeasti erottuvi-

en vierasesineiden (mm. muovit, alumiini, keraami) erottumista elintarvikkeiden tuotannon tarkastuslaitteissa. Hankkeessa suunniteltiin ja rakennettiin DE-kameran prototyyppi menetelmän testaamiseksi elintarviketurvallisuusmittauksissa erilaisissa elintarvikematriiseissa (esimerkiksi luunsirujen erottaminen lihasta). Monienergiamittauksen (DE) lisäksi hankkeessa suunniteltiin ja toteutettiin monikulmageometriaan perustuva prototyyppi vierasesineiden tunnistamiseksi nestepakkauksista. Kuva 45.



Kuva 45. Vierasesinetunnistuksen mittalaitteprototyypit: Dual Energy -vierasesinetunnistuksen prototyyppi (vas.) ja monikulmamittauksen vierasesinetunnistuksen prototyyppi (oik.).

Mikrobitunnistusosion tavoitteena oli kehittää elintarvikediagnostiikkaan on-line-biosensori, jolla elintarvikepatogeenit voitaisiin tunnistaa suoraan tuotantolinjalta. Mittavan taustaselvityksen perusteella oli ilmeistä, että nykyisillä teknologioilla on-line-biosensorin kehittäminen ei olisi mahdollista. Sen sijaan ilmeni, että mahdollista olisi kehittää vaihtoehtoinen pikamenetelmä. Mallipatogeeniksi valittiin *L. monocytogenes* ja tavoitteeksi näytteen analysointiprosessin nopeuttaminen noin viikosta vuorokauteen. Kehitetyssä menetelmässä patogeenien konsentrointi perustuu immunomagneettiseen erotteluun. Immunologisten menetelmien yhdistämisellä nanoteknologiaan leima-aineisiin saavutettiin herkkyys, jota voitiin hyödyntää biodektoimittalaitteen prototyyppiin, SEPLed (kuva 46), toteutuksessa. Menetelmän tuotantokäyttönäyttöön vaatii vielä yksityiskohtien hiomista. Nopeutetun näytteenkäsittelymenetelmän lisäksi tuloksena saatiin erittäin herkkä fluoresenssimittalaitte valitun malliorganismien detektointiin erittäin pienissä pitoisuuksissa.



Kuva 46. Bidektoimittalaitteen, SEPLed, prototyyppi.

Projekti toteutettiin tiiviissä yhteistyössä projektihenkilöstön ja yhteistyöyritysten henkilöstön kanssa. Molekyylibiologian, immunologian ja elintarviketeknologian yhdistyminen röntgenteknologiaan, optiseen mittausteknologiaan, järjestelmäsuunnitteluun sekä ohjelmistosuunnitteluun samassa toimintaympäristössä on ollut poikkeuksellisen onnistunutta ja nostaa toimintaympäristön kiinnostavuutta merkittävästi.

Viitteet

- Advantech. http://www.advantech.com/products/Data-Acquisition-%28DAQ%29-Control/sub_1-2MLJZA.aspx
- Allerberger, F. & Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infections* 16:16-23.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine* 342: 1236-1241.
- Bannon, D., Van Veen, C. Hyperspectral imaging gets stamp of approval for food processing. *Photonics Spectra* June 2012 p. 44 – 48.
- Biologend Fluorescence Spectra Analyzer. <http://www.biologend.com/spectraanalyzer>
- Byers, R.J. & Hitchman, E.R. (2011). Quantum dots brighten biological imaging. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 45: 201-237.
- Byrd-Bredbenner, C., Berning, J., Martin-Biggers, J. & Quick, V. 2013. Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 4060-4085.
- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N. & O'Kennedy, R. (2009). Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors* 9: 4407-4445.
- Carpentier, B. & Cerf, P. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145: 1-8.
- Cho, I.-H., Mauer, L. & Irudayaraj, J. (2014). In-situ fluorescent immunomagnetic multiplex detection of foodborne pathogens in very low numbers. *Biosensors and bioelectronics* 57: 143-148.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *PNAS* 108 (49): 19484-19491.
- Cowart, R.E. & Foster, B.G. (1985). Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *Journal of Infectious Diseases* 151: 721 – 730.
- Dickson, J.S. (1990). Comparison of homogenization by blending or stomaching on the recovery of *Listeria monocytogenes* from beef tissues. *Journal of Food Science* 55(3): 655-657.
- Dwivedi, H.P. & Jaykus, L.-A. (2011). Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology* 37: 40-63.
- Dynabeads anti-*Listeria* manual, (2012). Applied biosystems by Life Technologies, Dynabeads anti-*Listeria*, catalog number 71006.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/dynabeads_anti_listeria_man.pdf
- EFSA, The European Food Safety Authority. 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011; 9(3):2090.
- EFSA, The European Food Safety Authority, (2013a). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013 11(4):3129 [250 pp], doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- EFSA (2013b). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations)1 *EFSA Journal* 2013 11(1): 3025
- European patent application EP 2527431A1, (2012). Novel *Listeria* bacteriophage tailspike protein and uses thereof. <http://www.google.co.ug/patents/EP2527431A1?cl=en&hl=fi>
- Evira (2009). Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen. Ohje elintarvikealan toimijoille. Eviran ohje 10501/1. <http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/julkaisut/?a=view&productId=124>
- Eviran ohje 3463/6. *Listeria monocytogenes* -bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen. <http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/esittely/toiminta/laboratoriotoiminta/vertailulaboratoriotoiminta/ohjeita+laboratorioille/menetelma--+toiminta-+ja+tyoohjeet/>
- Eviran ohje 3477/2. *Listeria monocytogenes* -bakteerin määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka. http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ohje_tutkimus/evira3477_v2_listeria_monoc_maaritt_pesakelaskpdf.pdf

- FDA, U.S. Food and Drug Administration (2008). Elemental Analysis Manual: Section 2.2 Analytical Sample to Analytical Portion. 2.2.1 Homogenization Equipment.
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm195202.htm>
- Francis, G.A. & O' Beirne, D. (1997). Effects of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *International Journal of Food Science and Technology* 32: 141-151.
- Fraser, J.A. & Sperber, W.H. (1988). Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *Journal of Food Protection* 51(10): 762 – 765.
- Gilmartin, N. & O'Kennedy, R. (2012). Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzyme and Microbial Technology* 50: 87- 95.
- Hagens, S. & Loessner, M.J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of food-borne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 513-519.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2: 95-108.
- Hallanvuo S. & Johansson T. (2010). Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. *Eviran julkaisuja* 1/2010. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. <http://www.evira.fi/portal/fi/evira/julkaisut/?a=category&cid=20>
- Hamamatsu. <http://www.hamamatsu.com/eu/en/4001.html>
- Hempen, C. & Karst, U. (2006). Labeling strategies for bioassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384(3): 572-83.
- Hyglos (2011). Package Insert for *Listeria* Capture Kit for Plate.
<http://www.hyglos.de/en/products-services/products/bacteria-capture-kits.html>
- ISO, International Organization for Standardization. (2004a). EN ISO 11290–1:1996/A1:2004 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection Method.
- ISO, International Organization for Standardization. (2004b). EN ISO 11290–2:1998/A1:2004 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 2: Enumeration method.
- Ivanova S., Gabrovska K. & Godjevargova T. (2014). Fluorescent immunoassay for determination of penicillin and sulphonamide residues in milk using carboxylic magnetic nanoparticles. *International Journal of Dairy Technology* 67 (4): 521-529.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27: 710-730.
- Junttila, J.R., Niemelä, S.I. & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 321-327.
- Kramarenko, T. Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pöltsama, P. & Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30: 24-29.
- Kretzer, J.W., Lehmann, R., Banz, M., Kim, K.P., Korn, C. & Loessner, M.J. 2007. Use of high affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Applied Environmental Microbiology* 73: 1992-2000.
- Kricka L.J. 1992. Advantages and disadvantages of different labels in immunoassays. *Teoksessa: Nakamura R.S., Kasahara Y. and Rechnitz G.A. (toim.). Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990's. Washington DC., USA: American society for microbiology. Sivut 37-56.*
- Lehmann L.A., Alvarez, R.E. et.al, 1981. Generalized image combinations in dual KVP digital radiography. *Med. Phys.* 8(5): 659-667.
- Lifetechnologies. <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/qdot/technology-overview.html>
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W, Yonekura, M.L., Hayes, P. & Weaver, R. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319: 823-828.
- MMM, Maa- ja metsätalousministeriö. 2013. Eläinten ja ihmisten välillä tarttuvat taudit. Suomen zoonosisstrategia 2013 - 2017. Työryhmämuistio mmm 2013:1.
- Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R. & Mattoussi, H. 2005. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials* 4(6): 435-446.
- Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S. & Weiss. S. 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics *Science*. Jan 28, 2005; 307(5709): 538–544.

- Nakamura, Y. 1992a. Fluorescence immunoassays. Teoksessa: Nakamura R.S., Kasahara Y. and Rechnitz G.A. (toim.). Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990's. Washington DC., USA: American society for microbiology. Sivut 205-227.
- Nakamura, Y. 1992b. General principles of immunoassays. Teoksessa: Nakamura R.S., Kasahara Y. & Rechnitz G.A. (toim.). Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990's. Washington DC., USA: American society for microbiology. Sivut 3-21.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J. & Kruse, H. 2010. Food-borne diseases — the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. International Journal of Food Microbiology 139: S3–S15.
- Nichia. Saatavissa: <http://www.nichia.co.jp/en/product/uvled.html>
- Nugen, S.R. & Baeumner, A.J. 2008. Trends and opportunities in food pathogen detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391: 451-454.
- Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but non-culturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews 34: 415-425.
- Peel, M., Donachie, W. & Shaw, A. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. Journal of General Microbiology 134: 2171-2178.
- Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A. & Dahan. M. 2010. Probing cellular events, one quantum dot at a time. Nature Methods 7: 275-285.
- Rebuffel, V. & Dintern, J.M. 2006. Dual-energy X-ray imaging: benefits and limits, ECNDT 2006 – Th.1.3.1
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. & Nann, T. 2008. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature Methods 5: 763-775.
- Richard http://individual.utoronto.ca/s_richard/DEimaging.htm
- Rollmark mittalaitteen määrittelydokumentit ja tuote-esitteet
- Salkinoja-Salonen, M. 2002. 4.1.3.4. Veden aktiivisuus ja suolapitoisuus. Teoksessa: Salkinoja-Salonen, M. (toim.). Mikrobiologian perusteita. Mikrobiologian julkaisuja 49/2001. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. Sivu 201.
- Sanvicens N., Pascual N., Fernández-Argüelles, M.T., Adrián J., Costa-Fernández, J.M., Sánchez-Baeza, F., Sanz-Medel, A. & Marco, M.P. 2011. Quantum dot-based array for sensitive detection of *Escherichia coli*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 399(8): 2755-2762.
- Schütz, M. & Heed, K. High quality food sample preparation for PCR based on bacteriophage proteins, poster. http://www.hyglos.de/uploads/tx_sbdownloader/Poster_High_Quality_Food_Sample_Preparation_for_PCR_based_on_Bacteriophage_Proteins_Schuetz_et_al..pdf
- Seeliger, H.P.R. & Höhne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Methods Microbiology 13: 31-49.
- Shen, A., Kamp, H.D., Grundling, A. & Higgins, D.E. 2006. A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. Genes & Development 20: 3283-3295.
- Silva S., Teixeira, P., Oliveira, R. & Azeredo, J. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. Journal of Food Protection 71: 1379-1385.
- Sivonen A. 1996. Difteroidit ym. grampositiivisia sauvoja. Teoksessa: Tiilikainen A.S., Vaara, M. & Vaheri A. (toim.). Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. painos. Helsinki: Duodecim. Sivut 343-345.
- Smith, A.M. & Nie, S. 2004. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. Analyst 129: 672-677.
- Sosiaali- ja terveysministeriö, Työsuojeluosasto 2004. Biologisten tekijöiden luokitus. Turvallisuustiedote 43. http://www oulu.fi/sites/default/files/content/BCO_biologistentekijoidenluokitus.pdf
- Stevens, K.A. & Jaykus, L.-A. 2004. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review. Critical Reviews in Microbiology 30: 7-24.
- Thisted Lambertz, S, Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L.-M. & Lindblad, M. 2012. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. International Journal of Food Microbiology 160 (1): 24-31.
- Thompson, R.S. Optical Filters Take food Inspection to a whole new level. Photonics Spectra July 2011 p. 56 – 59.
- Thomsen, M.R., Shiptsova, R. & Hamm, S.J. 2006. Sales responses to recalls for *Listeria monocytogenes*: Evidence from branded ready-to-eat meats. Review of Agricultural Economics 28, 482-493.

- Ueda, S. & Kuwabara, Y. 2010. Evaluation of an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Listeria monocytogenes* from food. *Biocontrol Science* 15(3): 91-95.
- Upstate. <http://www.upstate.edu/radiology/education/rsna/radiography/dual/>
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland J. & Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review* 14: 584-640.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. & Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances* 28: 32-254.
- Walker, S.J., Archer, P. & Banks J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 68: 157-162.
- Wall, J.K., Crowley, E. & Conrad, R. (2013). Validating Pathatrix: a complete AOAC-approved workflow for the detection of *Salmonella* spp. in pooled food samples. *Life Technologies*. <http://arkafp.org/images/conf2013.wall.pdf>
- Wang, L., Wu, C.-S., Fan, X. & Mustapha, A. 2012. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and salmonella in ground beef by a bead-free quantum dot-facilitated isolation method. *International Journal of Food Microbiology* 156: 83-87.
- WHO. Baseline information for food safety policy and measures. Estimating the global burden of foodborne diseases. http://www.who.int/foodsafety/about/flyer_foodborne_disease.pdf
- Wu, V.C.H. 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology* 25: 735-744.
- Yang, A., Zheng, Y., Long, C., Chen, H., Liu, B., Li, X., Yuan, J. & Cheng, F. 2014. Fluorescent immunosorbent assay for the detection of alpha lactalbumin in dairy products with monoclonal antibody bioconjugated with CdSe/ZnS quantum dots. *Food Chemistry* 150: 73-79.
- Yang, L. & Li, Y. 2006. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst*. 131(3): 394-401.
- Zeng, X., Shen, Z. & Mernaugh, R. 2012. Recombinant antibodies and their use in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(10): 3027-3038.
- Zhao, Y., Ye, M., Chao, Q., Jia, N., Ge, Y. & Shen, H. 2009. Simultaneous detection of multifoodborne pathogenic bacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation in food samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 57(2): 517-524.



luke.fi

Luonnonvarakeskus
Viikinkaari 4
00790 Helsinki
puh. 029 532 6000