

Susanna Ahola

Utaretulehduksen tunnistamiseen tarkoitettujen PathoProof-tuotteiden DNA-eristysosan laadunvalvonnan kehittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

3.10.2017

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Susanna Ahola Utaretulehduksen tunnistamiseen tarkoitettujen PathoProof-tuotteiden DNA-eristysosan laadunvalvonnan kehittäminen 34 sivua + 1 liite 3.10.2017
Tutkinto	Laboratorioanalytikko
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Tuotannon tutkija Paulus Artimo Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää PathoProof-tuotteiden DNA-eristysosan laadunvalvontaprosessia. PathoProof™ Mastitis PCR Assay -tuotteet ovat Thermo Fisher Scientific:n omistama tuoteperhe. Tuote on tarkoitettu mastiitin, eli utaretulehduksen, havainnointiin lehmien maidonäytteistä. Tuote koostuu DNA-eristysosasta ja reaaliaikaisesta PCR -osasta. DNA-eristyskitit tulevat ulkopuoliselta toimijalta, ja ne tarkistetaan toimivuuden ja puhtauden osalta ennen asiakkaalle myyntiä. Opinnäytetyön tavoitteena on vähentää laadunvalvontaan kuluva aikaa ja suoraviivaistaa työvaiheita.</p> <p>Mastiitti on suurin taloudellisia vahinkoja aiheuttava tauti maitokarjalle. Kuluja syntyy lehmien lääkitsemisestä ja pahimmissa tapauksissa lehmien lopettamisesta. Mastiitin hoito on yleensä halvempaa kuin lehmän lopettaminen. Mastiittia on perinteisesti tunnistettu laskemalla maidon somaattista solulukua ja mikrobiviljelyllä. Nämä ovat kuitenkin menetelmänä aikaa vieviä ja epätarkkoja. Taudin tunnistaminen on kuitenkin tärkeää oikean hoidon määrittämiseksi. PathoProof-tuotteilla tunnistus tapahtuu nopeammin ja tulokset saadaan jo yhden päivän aikana.</p> <p>Mastiittimaito on näytematriisina vaikea, sillä se sisältää useita inhibiittoreita, jotka voivat vaikuttaa reaaliaikaisen PCR:n tuloksiin. Tämän takia tuotteen laadunvalvonnassa tehdään toiminnallinen testi, jossa eristetään DNA:ta mastiittimaidosta. Mastiittimaidot ovat peräisin Thermo Fisher Scientific:n ylläpitämästä testilaboratoriosta, joka on lopetettu vuonna 2016. Tästä syystä toiminnallinen testi halutaan uudistaa maitojen loppumisesta aiheutuvien ongelmien vuoksi. Tässä työssä toiminnallista testiä pyrittiin korvaamaan standardimaidolla, joka oli rasvaista luomumaitoa, johon lisättiin kaikkia laajimman kitin tunnistamia patogeneja. Mastiittimaidon todettiin kuitenkin olevan niin erilainen matriisi tavalliseen maitoon verrattuna, että sitä ei voida korvata standardimaidolla. Tulevassa laadunvalvontaohjeessa päätettiin luopua toiminnallisesta testistä, sillä DNA-eristyskitin komponenteista testataan niiden kyky eristää DNA:ta jo valmistajan puolesta.</p> <p>Puhtaustestissä suoritetaan DNA-eristys ilman maitonäytettä. Näin saadaan tieto, etteivät kitin komponentit ole kontaminoituneet taudinaiheuttajilla. Testi on kuitenkin aikaa vievä ja sitä joudutaan uusimaan usein ympäristöstä tulevien kontaminaatioiden vuoksi. Uutta menetelmää varten kehitettiin tapa, jolla kitin reagenssit voidaan yhdistää ja sentrifugoida DNA-eristykseen käytetyn kolonnin läpi. Testauksessa todettiin, että ohjeeseen kuuluvat pesuvaiheet ovat tarpeellisia uudessa menetelmässä. Uuden ehdotetun menetelmän todettiin toimivan ja havaitsevan mahdolliset kontaminaatiot riittävän hyvin.</p> <p>Opinnäytetyössä onnistuttiin tavoitteessa vähentää laadunvalvontaan kuluva aikaa, sillä ajan säästön arvioitiin olevan 75 % verrattuna käytössä olevaan laadunvalvontaohjeeseen. Myös suoritettavien työvaiheiden määrä väheni.</p>	
Avainsanat	mastiitti, utaretulehdus, reaaliaikainen PCR, DNA-eristys

Author(s)	Susanna Ahola
Title	Development of Quality Control Method for PathoProof Products Designed for Bovine Mastitis Detection
Number of Pages	34 pages + 1 appendix
Date	3 October 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory sciences
Instructor(s)	Paulus Artimo, Manufacturing scientist Tiina Soininen, Senior lecturer
<p>The goal of this study was to develop the quality control (QC) process for DNA extraction part of PathoProof products. PathoProof™ Mastitis PCR Assay is a trademark of Thermo Fisher Scientific. Products are designed to detect bovine mastitis from milk samples. Detection is based on DNA extraction and real-time PCR. Extraction kits are manufactured by a third party and they go through quality control before they are sold to customers. Quality control consists of a functional and a contamination test. The aim of this study was to cut back time needed for QC and simplify the procedure.</p> <p>Mastitis is the single most cost causing disease in bovine milk production. Financial losses come from treatment of the cows and in the worst scenario culling of the cow. Treating mastitis with medication is often the most economical approach. The detection of mastitis has relied on counting somatic cell number and microbe culture. PathoProof products offer a faster and reliable method for analysis of mastitis.</p> <p>Mastitis milk is a difficult matrix for PCR based methods because it contains many PCR inhibitors. For this reason, PathoProof DNA extraction kits undergo a functional QC which determines that the product extracts good quality DNA. The test is performed with mastitis milk samples that originate from a mastitis test laboratory. The laboratory was discontinued and for that reason functional test can't rely on mastitis milk samples. In this study, a standard milk was created by adding pathogen cells to organic milk. The DNA extraction method was able to extract DNA from all the pathogens in standard milk. However, it was concluded that mastitis milk is too different from normal milk that the results are not comparable. The kits undergo a DNA extraction test by the manufacturer. For that reason it was decided that functional test would be left out from the new QC method.</p> <p>The test for contamination is carried out with DNA extraction protocol but no milk sample is added. In this way, the different reagents are proved to be contamination free from pathogen targets. The test is time consuming since it is prone to contaminations from environment. For a new QC method, a faster method was developed. The idea was to combine the reagents and centrifuge it through a DNA extraction column. The results proved that the washing steps in extraction protocol are needed, but otherwise the method works for contamination test.</p> <p>This thesis succeeded to cut back time needed for QC. The time that is saved with new QC method was estimated to be 75 % compared to the method used now.</p>	
Keywords	Mastitis, bovine, milk, real-time PCR, DNA extraction

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Mastiitti ja sen tunnistaminen	2
2.1	Mastiitti	2
2.2	DNA-eristys	5
2.3	Reaaliaikainen PCR	7
3	PathoProof-tuoteperhe	9
3.1	Tuotteiden kuvaus	9
3.2	Nykyinen laadunvalvontaprosessi	12
4	Materiaalit ja menetelmät	13
4.1	DNA-eristysmenetelmä	13
4.2	Toiminnallisen testin kehitys	13
4.3	Puhtaustestin kehitys	16
4.3.1	Nykyisen laadunvalvontaprosessin tarkastelu	16
4.3.2	Uuden laadunvalvontamenetelmän kehittäminen	17
4.3.3	Uuden laadunvalvontamenetelmän testaaminen	18
5	Tulokset	18
5.1	Toiminnallinen testi	18
5.2	Tilastollinen analyysi	21
5.3	Puhtaustesti	23
5.3.1	Nykyinen menetelmä	23
5.3.2	Uusi menetelmä	24
5.3.3	Toteamisraja ja laadunvalvonta uudella menetelmällä	26
6	Tulosten tarkastelu	26
6.1	Standardimaidon toimivuuden arvioiminen	26
6.2	Puhtaustestin arvioiminen	27
6.3	Nykyinen menetelmä	27

6.4 Uusi menetelmä	28
7 Johtopäätökset	31
Lähdeluettelo	33
Liitteet	
Liite 1. Ehdotus uudeksi laadunvalvontaohjeeksi	

Lyhenteet

C-16	PathoProof-tuoteperheen Complete 16 qPCR-kitti, joka tunnistaa 16 eri kohdetta mastiittimaidosta.
Cq-arvo	Quantification cycle. Sykli, jossa fluoresenssin taso nousee tunnistettavalle tasolle taustaan verrattuna.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
F-871	PathoProof-kitin DNA-eristysosan lyysauspuskuri 1
F-872	PathoProof-kitin DNA-eristysosan lyysauspuskuri 2
qPCR	Kvantitatiivinen PCR
Kitti	Tuotepaketti
L-kitti	PathoProof™ mastiitin tunnistukseen tarkoitettu L-kokoinen kitti, jolla voidaan käsitellä 384 näytettä
Real-time PCR	Reaaliaikainen PCR
S-kitti	PathoProof™ mastiitin tunnistukseen tarkoitettu S-kokoinen kitti, jolla voidaan käsitellä 50 näytettä

1 Johdanto

Mastiitti, eli utaretulehdus, on lehmien maidontuotannon yleisin ja eniten taloudellisia vahinkoja aiheuttava infektiotauti (1). Sitä esiintyy Suomessa vuosittain noin kolmasosalla lypsävistä lehmistä (2). Mastiittia aiheuttaa moninainen joukko bakteereita, leviä, hiivoja sekä sieniä. Tulehdus syntyy, kun patogeenit pääsevät lehmän utareen vedinkanavaan ja sitä pitkin utareeseen. Osa mastiittitapauksista on piileviä, eikä lehmällä ole välttämättä ulospäin näkyviä oireita (3). Mastiitti voi kuitenkin tarttua oireettomista lehmistä terveisiin lehmiin lypsykoneiden kautta. Pahimmissa mastiittitapauksissa infektio aiheuttaa utareeseen kuolion ja lehmä joudutaan lopettamaan. Lievemmissä tapauksissa tulehdus vaikuttaa maidon laatuun sekä sen tuottoon aiheuttaen näin taloudellisia menetyksiä. Tästä syystä mastiitin leviämistä pyritään välttämään testaamalla maitoa, jotta mastiitin leviäminen lypsykarjassa saadaan pysäytettyä ajoissa. Oikealla lääkityksellä lehmä voidaan parantaa ja välttyään suuremmilta taloudellisilta vahingoilta.

Mastiittia on perinteisesti määritetty somaattisen soluluvun ja mikrobiviljelmien avulla (3). Nämä menetelmät ovat kuitenkin aikaa vieviä ja niiden tulos ei ole tarkka. Finnzymes Oy:n (nykyisin Thermo Fisher Scientific:n omistama) kehittämä PathoProof-tuoteperhe mastiitin tunnistamiseen perustuu DNA:n eristämiseen maidosta ja taudinaiheuttajien tunnistamiseen käyttäen reaaliaikaista PCR:ää. DNA-eristyskittejä on saatavilla tällä hetkellä kolmea eri kokoa, joista yksi perustuu automaattiseen KingFisher-laitteella tehtävään DNA-eristykseen. Erilaisia reaaliaikaisia PCR-tuotepaketteja on tällä hetkellä 10. Nämä tunnistavat erilaisia yhdistelmiä taudinaiheuttajista ja tuloksia käsitellään erityisellä PathoProof-ohjelmistolla.

DNA-eristykseen käytetyt kitit tulevat Thermo Fisher Scientific:lle ulkopuoliselta toimittajalta ja näille suoritetaan laadunvalvonta ennen myyntiä asiakkaille. Laadunvalvontaan kuuluu tuotepaketin (kitin) testaus kontaminaatioiden varalta, jotka voisivat näkyä reaaliaikaisen PCR:n tuloksissa väärinä positiivisina tuloksina. Lisäksi suoritetaan toiminnallinen testi, joka varmistaa, että kitti toimii mastiittimaidon DNA:n eristämiseen. Mastiittimaito on matriisina vaikea DNA-eristykselle, sillä tulehdus

vaikuttaa maidon koostumukseen (4, s. 89-97). Maidossa on tällöin usein tavallista enemmän PCR-reaktiota häiritseviä inhibiittoreita.

DNA-eristyskitin toiminnallisuutta on ennen testattu Thermo Fisher Scientific:n ylläpitämästä mastiittitestilaboratoriosta saaduilla maidoilla, mutta näitä näytteitä ei ole enää saatavilla laboratorion lopettamisen vuoksi. Tarkoituksena on kehittää vastaava maitomatriisi, jonka tulokset ovat vertailukelpoisia mastiittimaitojen kanssa. Puhtaustesti kontaminaatioiden varalta on taas herkkä ympäristön kontaminaatioille, minkä takia eristystä joudutaan uusimaan usein. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on ratkaista ongelmat PathoProof-tuoteperheen DNA-eristyskittien laadunvalvonnassa toiminnallisen ja puhtaustestin osalta. Pyrkimyksenä on vähentää laadunvalvontaan kuluva aikaa ja yksinkertaistaa laadunvalvontaprosessia.

2 Mastiitti ja sen tunnistaminen

2.1 Mastiitti

Utaretulehdus on lehmien yleisin ja eniten taloudellisia vahinkoja aiheuttava tauti (1). Suomessa mastiitin vaikutuksia on tutkittu 1970-luvun loppupuolelta lähtien (2). Vuonna 1988 mastiittia esiintyi 47,8 % lehmistä. Uusimmassa 2001 vuoden tutkimuksessa mastiittia esiintyi 30,6 % lehmistä. Mastiitti aiheuttaa taloudellisia menetyksiä 270–670 euroa yhtä lehmää kohden riippuen tapauksesta (5). Nämä kustannukset johtuvat lehmien hoito- ja lääkitsemiskuluista sekä maitoerien hukkaan menosta. Jos lehmä päädytään poistamaan ja sen tilalle ostetaan uusi, ovat kustannukset huomattavasti suuremmat, noin 1500-1800 euroa. Mastiitin hoitaminen on siis taloudellisesti kannattavaa.

Tulehdus utareessa syntyy, kun bakteeri pääsee kulkeutumaan vedinkanavaan ja siitä utarekudokseen (4, s. 45–89). Vedinkanava aukeaa lypsyn yhteydessä ja pysyy auki muutaman tunnin lypsämisen jälkeen. Mastiittia esiintyy kolmena erilaisena tyyppinä (6). Tartunnallinen mastiitti leviää eläimistä toisiin, kun taas ympäristöstä aiheutuneesta mastiitissa infektio tulee eläimen elinympäristöstä. Kolmas mastiittityyppi on kesämastiitti, joka syntyy yleensä loppukesällä. Kesämastiittia esiintyy yleensä hiehoilla

ja ummessa olevilla lehmillä (4, s. 185–191). Sitä levittää yleisesti *Hydrothea irritans* -kärpänen. Kärpäsen mukana leviää mastiittia aiheuttavia bakteereita, joista yksi yleisimmistä on *Trueperella pyogenes*. Kesämastiitti on yleensä hyvin vaikeasti hoidettava ja oireet ovat vakavia. Tartunnan saaneista lehmistä vain alle viisi prosenttia palaa takaisin maidontuotantoon.

Mastiittia aiheuttaa moninainen joukko bakteereita, mykoplasmoja, hiivoja ja sieniä. Suomessa yleisin mastiitin taudinaiheuttaja vuonna 2001 tehdyn tutkimukseen mukaan on *Staphylococcus aureus* (7). Muita yleisiä taudinaiheuttajia ovat streptokokit ja koagulaasinegatiiviset stafylokokit. Mastiitin taudinaiheuttajan identifioiminen on tärkeää jatkohoidon kannalta. Esimerkiksi *Staphylococcus aureuksen* aiheuttamaa mastiittia sairastavaa lehmää on vaikea hoitaa, sillä infektoivat kannat ovat usein penisilliinille vastustuskykyisiä (4, s. 163–171). Penisilliini on yleisimmin käytetty antibiootti mastiitin hoitoon. Stafylokokkien antibioottiresistenssi liittyy β -laktamaasi-entsyymien tuottamiseen (7). Ominaisuus voidaan todeta helposti PCR-menetelmällä tai viljelemällä näytettä antibioottia sisältävällä kasvatusmaljalla. Penisilliiniresistenttiä kantaa vasten on valittava lääkkeeksi jokin toinen antibiootti tai yhdistelmä useammasta antibiootista.

Mastiitti voidaan jakaa kolmeen eri kategoriaan; piilevään, kliiniseen ja krooniseen (3). Piilevää mastiittia on vaikea diagnosoida, sillä näkyviä oireita ei välttämättä ole. Piilevä mastiitti aiheuttaakin isoja kustannuksia, sillä mastiitti pääsee leviämään huomaamatta muihin lehmiin. Kliinisessä mastiitissa sitä vastoin on ainakin yksi näkyvä oire tulehduksesta. Yleisiä oireita ovat utareen punerrus ja turpoaminen. Lehmän ruumiinlämpö on usein koholla. Myös maidon ulkomuodosta voidaan epäillä mastiittia, sillä mastiittimaito voi olla veristä tai siinä voi olla näkyviä saostumia. Krooninen tulehdus on harvinainen, mutta aiheuttaa jatkuvan tulehduksen utareeseen ja sitä on vaikea hoitaa.

Mastiitti vaikuttaa maidossa sen laatuun sekä määrään (4, s. 89–97). Jos tulehdus saa edetä ilman hoitoa, muuttuu maidon koostumus sitä mukaa huonommaksi. Maidon ulkomuoto muuttuu kokkareiseksi ja siihen voi lisäksi erittyä verta. Maidontuotto myös vähenee jatkuvasti tulehduksen edetessä. Tulehdus vaikuttaa muihin maidon

komponentteihin. Maidon rasva- ja proteiinikoostumus voi muuttua ja sen sisältämien kivennäis- ja hivenaineiden määrät muuttuvat. Maidossa tapahtuu myös muutoksia fysikaalisiin ominaisuuksiin. Tulehduksen johdosta maitoon pääsee kudostenestettä, joka johtaa pH:n ja sähkönjohtokyvyn muutoksiin. Samasta syystä maitoon pääsee myös normaalia enemmän soluja. Soluluvulla onkin suuri merkitys mastiittitapausten diagnoosissa.

Pahimmat mastiittitapaukset voidaan diagnosoida ilman lisätestejä lehmän oireiden perusteella (4, s. 97–139). Piilevät mastiittitapaukset on kuitenkin tunnistettava muilla tavoin. Yksi indikaattori tulehduksesta on somaattisen soluluvun nousu. Tulehdus utareessa aiheuttaa solujen erittymistä maitoon enemmän kuin normaalisti. Solulukku on perinteisesti määritetty CMT-kokeella (California Mastitis Test), joka antaa suuntaantavan tuloksen. Tarkempi tulos saadaan värjäämällä solujen tumat ja laskemalla ne mikroskoopin avulla. Laskentaan on myös kehitetty automaattisia laskentalaitteita. Muita indikaattoreita ovat esimerkiksi sähkönjohtokyvyn nousu, sillä tulehdus muuttaa myös maidon koostumusta. Hoitoa ja jatkotoimenpiteitä varten taudinaiheuttaja on usein tunnistettava. Tunnistaminen on tarpeen myös selvissä mastiittitapauksissa hoitotoimenpiteiden selvittämiseksi. Tunnistuksessa on perinteisesti käytetty erilaisia mikrobien viljelymenetelmiä sekä entsyymaattisia reaktioita. Maitoa viljellään veriagarilla (mastiittiagar), jota inkuboidaan ja jolta tarkastellaan mahdollisesti kasvavien pesäkkeiden ulkomuotoa ja määrää. Ulkomuodon perusteella voidaan tehdä jo alustavaa tunnistusta. Tarkemman tunnistuksen saamiseksi pesäkkeistä tehdään puhdasviljelmiä, joista tehdään jatkotestejä. Yleisiä jatkomenetelmiä ovat esimerkiksi gramvärjäys sekä katalaasi- ja oksidaasitesti.

Nykyaikana on kehitetty useita erilaisia moderneja ja tarkempia havaitsemismenetelmiä mastiitin diagnosoimiseksi (3). PathoProof-tuoteperheen menetelmät perustuvat taudinaiheuttajien tunnistamiseen DNA:n ja PCR:n avulla. Kitillä eristetään DNA:ta ja tätä analysoidaan reaaliaikaista PCR -tekniikkaa käyttäen. Muita yleisiä menetelmiä ovat immunovasteeseen perustuvat testit, kuten ELISA-testi. ELISA-testillä voidaan tunnistaa muutamia yleisimpiä taudinaiheuttajia, mutta sovellukset eivät ole yhtä monipuolisia kuin DNA:han perustuvat menetelmät. Markkinoilla on suuri tarve nopeisiin ja vaivattomiin testeihin, joissa ei olisi tarvetta laboratorioanalysoinnille. Nykyaikaisissa navetoissa

maidosta voidaan analysoida jatkuvasti pH:n, sähkönjohtokyvyn ja värin muutoksia. Navettaan voidaan myös asentaa lämpökameroita, jotta kuumeesta kärsivät eläimet voitaisiin huomata nopeammin. Tarkempaan tunnistukseen voidaan päästä erilaisilla biosensoreilla, jotka perustuvat biologisen reseptorimolekyylin käyttöön. Molekyylitunnistaa maidosta vain tiettyä kohdetta, kuten DNA:ta tai entsyymiä. Laboratoriossa mastiitin tunnistamista voi mahdollisesti nopeuttaa massaspektrometrian kehittyminen. Massaspektrometrillä voi olla mahdollista tunnistaa tulevaisuudessa tehokkaasti proteiineja, jotka liittyvät mastiittitulehdukseen.

2.2 DNA-eristys

Mastiitin taudinaiheuttajien diagnosointiin maidosta molekyylibiologisin menetelmin, on ensin eristettävä siitä DNA:ta. DNA:n eristykseen on kehitetty useita menetelmiä ja erilaisia kaupallisia tuotteita (8). Menetelmästä riippumatta eristykseen kuuluu neljä tarpeellista vaihetta. Ensimmäiseksi DNA on vapautettava solun sisältä. Solujen hajottamiseen on useita keinoja, kuten erilaisia kemikaaleja tai fysikaalinen voima. Seuraavaksi näytteestä on erotettava erilaisia solujen rakennusaineita, kuten proteiineja, hiilihydraatteja, lipidejä ja RNA:ta. Solun hajotessa liuokseen vapautuu myös erilaisia DNA:ta hajottavia molekyyliä, kuten DNAaseja, jotka on inaktivoitava näytteestä ennen näytteen puhdistusta. Viimeinen vaihe on näytteen puhdistaminen. Puhdistus tapahtuu usein sentrifugoimalla, jolloin kiinteä aines pakkautuu pohjalle. Lisäksi näytettä puhdistetaan lisää uuttamalla tai pesemällä pesuliuksilla.

Erilaiset menetelmät voidaan jakaa kahteen kategoriaan; liuoksia käyttävään uuttotekniikkaan ja kiinteää matriisia käyttäviin menetelmiin (8). Liuosfaaseja hyödyntävät uuttomenetelmät ovat perinteisiä menetelmiä, joita on käytetty DNA:n eristämisen keksimisestä asti. Liuokoisuuteen perustuvissa menetelmissä hyödynnetään DNA-molekyylin ominaisuuksia, joiden avulla näytettä voidaan puhdistaa eri liuosfaasien avulla. DNA on vesiliukoinen molekyyli sen sisältämien negatiivisesti varautuneiden fosfodiesterirungon vuoksi (9, s. 67–109). Typpiämäiset ovat kuitenkin poolittomia osia niiden ympyrärakenteen takia, mikä vähentää vesiliukoisuutta. Yleinen nestefaasierotuksessa käytettävä liuotin on fenoli. Näytteen sisältämät proteiinit liukenevat paremmin fenoliin kuin veteen ja DNA taas liukenee paremmin veteen. Tätä

ominaisuutta käyttämällä saadaan DNA uutettua vesifaasiin ja epäpuhtaudet fenolifaasiin. Fenoliin lisätään usein muita orgaanisia liuottimia, kuten kloroformia tai isoamyylialkoholia, jotta epäpuhtaudet liukenisivat paremmin orgaaniseen faasiin. Fenoli-vesi-uutto on vain yksi esimerkki käytetyistä menetelmistä, muita menetelmiä ovat esimerkiksi CTAB-menetelmä (Cetyl Trimethylammonium Bromide, Setrimoniumbromidi) ja alkalinen eristysmenetelmä (8).

Kiinteää faasia hyödyntävät menetelmät ovat uudempia keinoja DNA:n eristämiseen (8). DNA:n eristykseen on kehitetty useita kaupallisia tuotteita, jotka perustuvat kiinteään faasin käyttöön. Menetelmät ovat usein helpompia ja myös turvallisempia kuin uuttoon perustuvat menetelmät. Kiinteän faasin käytössä hyödynnetään pH:n vaihteluita sekä liuoksen suolakonsentraatiota. Lisäksi eristykseen vaikuttaa mitä kiinteää faasia käytetään. Kiinteä faasi voi olla esimerkiksi silikapohjainen, lasipartikkeleita tai anioninvaihtomatriisia. Kaupallisissa sovelluksissa kiinteä matriisi on usein pienen kolonnin sisällä, jonka läpi hajotettu näyte ajetaan hyödyntäen sentrifugia. Näyte jää oikeissa olosuhteissa kiinni kolonniin. Yleisesti ottaen DNA sitoutuu kolonniin korkeassa pH:ssa ja suolakonsentraatiossa. Kolonnia voidaan puhdistaa pesuliuksilla, jotka puhdistavat näytteestä jäljellä olevia kontaminaatioita. Lopuksi DNA saadaan eluoitua irti kolonnista vedellä tai TE-puskurilla.

Tämän lisäksi on kehitetty myös automaattisia DNA-eristysmenetelmiä (8). Automaattiset menetelmät ovat nopeuttaneet eristystä ja mahdollistavat suurten näytemäärien käsittelyn. Lisäksi automatiikkaan perustuva menetelmä sulkee pois käyttäjistä aiheutuvat virheet näytteenkäsittelyssä. DNA-eristys perustuu useimmissa automaattisissa järjestelmissä magneettien käyttöön. Korkeassa suolapitoisuudessa DNA sitoutuu magneettiseen aineeseen. Muuttamalla suolapitoisuutta DNA saadaan eluoitua pois magneeteista. Näytteen sisältämä DNA puhdistuu eristyksen aikana samalla tavalla kuin manuaalisissa menetelmissä. Magnetismia voidaan käyttää myös muissa kiinteään faasiin perustuvissa menetelmissä ilman automatiikkaa.

DNA-eristyksen onnistumisen tärkeys korostuu etenkin eristystä seuraavissa vaiheissa. DNA:n on oltava yhtenäistä ja mahdollisimman puhdasta kaikkiin jatkomenetelmiin, etenkin PCR-sovelluksiin sekä sekvensointiin. Erilaisia PCR-inhibiittoreita on useita ja

niitä tulee näytteeseen näytematriisista (10). Maidosta näytteeseen tulee esimerkiksi kalsiumia, ihosta kollageenia ja verestä hemiä. Inhibiittoreiden arvellaan vaikuttavan DNA-polymeraasiin tai alukkeiden sitoutumiseen. Inhibition takia on tärkeää, että käytetty DNA-eristysmenetelmä on sopiva näytteelle, jotta riittävästä puhtaudesta voidaan olla varmoja. Mastiittimaitojen kohdalla näytematriisi sisältää useita PCR-inhibiittoreita, kuten kalsiumia, rasvaa ja maidon proteiineja (11). Haasteena mastiittimaitojen tutkimuksessa inhibiition lisäksi on, että taudinaiheuttajia on näytteessä vain pienenä konsentraationa. Lisäksi solujen hajottamiseen tarvittavat menetelmät voivat hajottaa liaksi taudinaiheuttajia, jolloin soluseinän lisäksi myös DNA hajoaa. Hajonnut DNA voi vaikuttaa PCR-menetelmillä toteutettaviin menetelmiin ja saatu tulos voi olla hajonneen DNA:n takia väärä negatiivinen. Joihinkin mastiittimaitojen DNA:n eristysprotokollin sisältyykin esikasvatusvaihe, jolla rikastetaan maidon sisältämiä taudinaiheuttajia, jotta ne olisivat paremmin tunnistettavissa.

2.3 Reaaliaikainen PCR

PCR, eli polymeraasiketjureaktio, on menetelmä DNA:n monistamiseksi. Reaaliaikainen PCR (real-time PCR) on muunnelma tavallisesta PCR:stä ja sillä on mahdollista saada tietoa myös DNA:n määrästä alkuperäisessä näytteessä. Menetelmä perustuu samoihin vaiheisiin, kuin tavallisessa PCR:ssä. DNA denaturoidaan korkeassa lämpötilassa yksijuosteiseksi ja lämpötilaa laskemalla saadaan alukkeet sitoutumaan yksijuosteiseen DNA:han. DNA-polymeraasi tunnistaa alukkeet ja aloittaa DNA:n vastinjuosteen syntetisoimisen.

Reaaliaikaisessa PCR:ssä menetelmään kuuluu myös DNA:n määrän arvioiminen fluoresenssia apua käyttäen. Menetelmä voidaan jakaa kahteen eri kategoriaan, joista toinen perustuu koettimien käyttöön ja toinen epäspesifiseen sitoutumiseen (12, s. 215–250). Koettimeen on lisätty nukleotidien lisäksi jokin fluoroflori, joka fluoresoi, eli lähettää valoa. Fluorofloreja on erilaisia ja niiden synnyttämä valo näkyy eri aallonpituuksilla. Lisäksi koettimeen liittyy usein sammuttaja, joka estää fluorofloria fluoresoimasta ennen kuin laite mittaa valoa. Koettimeen perustuva tunnistaminen on hyvin spesifiä ja erilaisten fluoroflorien käyttö mahdollistaa myös monen eri kohdasekvenssin tunnistamisen samanaikaisesti (multiplex-reaktiot).

Epäspesifiseen sitoutumiseen perustuvissa menetelmissä ei tarvita jokaiselle näytteelle suunniteltua omaa koetinta (12, s. 228–236). Epäspesifejä menetelmiä on koettimien tapaan useita, mutta yksi yleisimpiä on SYBR™-teknologiaan perustuva. Tässä menetelmässä fluoresoiva väri sitoutuu vain kaksijuosteiseen DNA:han. Denaturaatiovaiheessa juosteet erkanevat ja väri irtautuu juosteesta. Laite mittaa fluoresenssia pidentymisvaiheen jälkeen. Epäspesifiä menetelmästä tekee sen, että väri sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han. Ongelmia voi seurata huonosta alukesuunnittelusta, jolloin DNA:ta monistuu eri paikoista kuin oli suunniteltu. Lisäksi ongelmana ovat alukedimeerit, joissa kaksi yksijuosteista aluketta pariutuvat toistensa kanssa kaksijuosteiseksi DNA:ksi. Tätä ongelmaa voidaan tarkkailla suorittamalla sulamiskäyräanalyysi, joka kertoo millaista DNA:ta näytteestä on monistunut.

Näytteestä mitattu fluoresenssi on suoraan verrannollinen DNA:n määrään (12, s. 239–250). Reaaliaikaisessa PCR:ssä DNA tarkkaa määrää ei määritetä tarkasti. Tarkastelussa voidaan käyttää C_q-arvoja, jotka kertovat millä monistussyklillä fluoresenssi ylittää taustan tason. C_q-arvo liittyy suoraan DNA:n alkuperäiseen määrään. Pieni C_q-arvo kertoo alkuperäisen DNA:n suuresta määrästä ja suuri arvo taas pienemmästä määrästä. C_q-arvot ei anna tarkkaa tulosta DNA:n määrästä, mutta sitä voidaan käyttää vertailuun.

DNA:n määrän tarkkaan määrittämiseen käytetään kvantitatiivista PCR:ää (qPCR, quantitative polymerase chain reaction). DNA:n tarkka määrä saadaan selville käyttäen standardisuoraa, joka on tehty kohde-DNA:sta, jonka kopiomäärä tiedetään. Määrittäminen perustuu myös C_q-arvoihin, koska näytteen arvoa verrataan standardisuoran C_q-arvoihin. Näin saadaan laskettua näytteen alkuperäinen DNA:n määrä. Reaaliaikainen PCR ja qPCR perustuvat samaan tekniikkaan, mutta reaaliaikainen PCR ei anna absoluuttista arvoa DNA:n kopiomäärälle.

3 PathoProof-tuoteperhe

3.1 Tuotteiden kuvaus

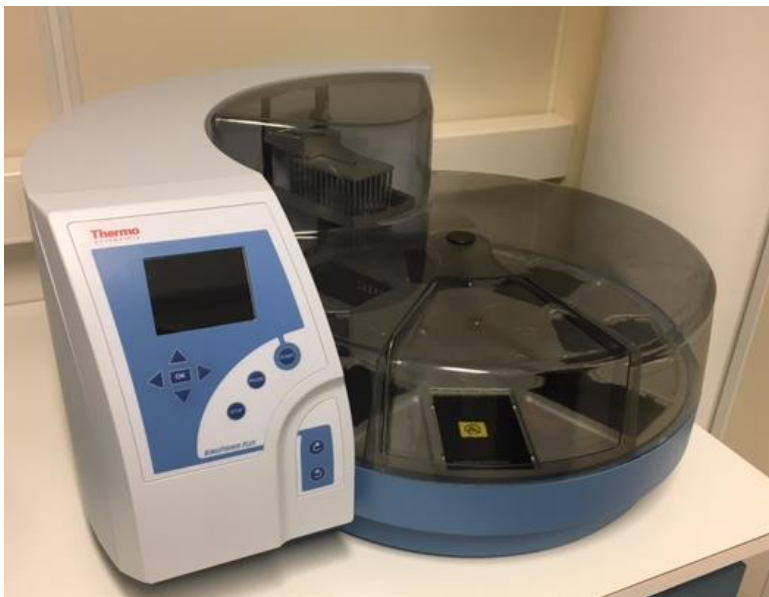
PathoProof™ Mastitis PCR Assay -tuoteperheeseen kuuluu kolme erikokoista DNA-eristyskittiä. S-kokoinen kitti on tarkoitettu 50 näytteen eristykseen ja eristysmenetelmä vaatii eniten käytännön työtä (kuva 1). L-kokoisella kitillä voidaan eristää 384 näytettä ja eristysmenetelmässä on vähemmän käsityötä kuin S-kitissä (kuva 2). KingFisher-kitti on samankokoiselle näytemäärälle kuin L-kitti, mutta DNA-eristys tapahtuu automaattisesti KingFisher-laitteella (kuva 3). Laitteen käyttö on helppoa ja se vähentää käsityön määrää huomattavasti.



Kuva 1. S-kokoinen PathoProof DNA-eristyskitti, jolla voidaan eristää 50 näytettä. DNA-näyte sentrifugoidaan kuvassa näkyviin yksittäisiin kolonniputkiin.



Kuva 2. L-kokoinen PathoProof DNA-eristyskitti, jolla voidaan eristää 384 näytettä. DNA kiinnitetään kuvassa näkyvään kolonnilevyyn, johon mahtuu kerrallaan 96 näytettä.



Kuva 3. KingFisher-laite, jota käytetään PathoProof KingFisher-kitin näytteiden käsittelyyn. Eristyksiä voidaan tehdä samanaikaisesti 96. Eristys tapahtuu automaattisesti ja se perustuu magnetismiin hyödyntämiseen.

Tuotteiden DNA-eristys perustuu kiinteän faasin käyttöön. S- ja L-kiteissä näyte kiinnitetään solujen hajotuksen jälkeen kolonniin, jossa näytettä pestään. Solujen hajotus tapahtuu entsyymaattisesti. KingFisher-kitti on automaattinen eristysmenetelmä, joka perustuu magneettien käyttöön.

DNA-eristyskittien lisäksi tuotteeseen kuuluu reaaliaikainen PCR-kitti, joita on tällä hetkellä markkinoilla kymmenen. Kitit eroavat niiden tunnistamien patogeenien määrän perusteella ja lisäksi PCR-kittejä on kahdelle eri laiteperheelle tarkoitettuja. Laajin PathoProof PCR-kitti on Complete-16 –kitti (C-16), joka tunnistaa 16 eri kohdetta. Tämän kitin tunnistamat kohteet on esitelty taulukossa 1. Tuotteiden PCR-osat perustuvat kaikki koettimien käyttöön neljänä eri multiplex-reaktiona. Tuloksia käsitellään PathoProof-ohjelmistolla. Ohjelma antaa tulokseksi joko negatiivisen tuloksen tai positiivisen tuloksen, joka on jaoteltu neljään eri luokkaan näytteestä saadun signaalin mukaan.

Taulukko 1. Complete 16-kitin tunnistamat kohteet.

Complete 16-kitin tunnistamat kohteet	Lyhenne	Kuvaus
<i>Corynebacterium bovis</i>	C. bov	Gram-positiivinen bakteeri
<i>Enterococcus</i> -suku	Entero	Gram-positiivinen bakteerisuku
<i>Escherichia coli</i>	E. col	Gram-negatiivinen bakteeri
<i>Klebsiella oxytoca</i> ja <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klebs	Gram-negatiivisia bakteereita
<i>Mycoplasma bovis</i>	M. bov	Soluseinätön bakteeri
<i>Mycoplasma</i> -suku	My.sp	Soluseinättömiä bakteereita
<i>Prototheca</i> -suku	Proto.	Yksisoluisia leviä
<i>Serratia marcescens</i>	S. mar	Gram-negatiivinen bakteeri
<i>Staphylococcus aureus</i>	S. aur	Gram-positiivinen bakteeri
<i>Staphylococcien</i> β -laktamaasi geeni	blaZ	Geeni, joka liittyy penisilliiniresistenssiin
<i>Staphylococcus</i> -suku	Staph	Gram-positiivinen bakteerisuku
<i>Streptococcus agalactiae</i>	S. aga	Gram-positiivinen bakteeri
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	S. dys	Gram-positiivinen bakteeri
<i>Streptococcus uberis</i>	S. ube	Gram-positiivinen bakteeri
<i>Trueperella pyogenes</i> ja/tai <i>Peptoniphilus indolicus</i>	py/in	Gram-positiivisia bakteereita
Hiivat	Yeast	Erlaisia hiivoja

3.2 Nykyinen laadunvalvontaprosessi

PathoProof-tuotteiden DNA-eristykseen tarvittavat kitit saapuvat ulkopuoliselta toimittajalta ja ne testataan ennen asiakkaille myymistä. Laadunvalvonta jakautuu toiminnalliseen testiin sekä puhtaustestiin. Toiminnallisessa testissä varmistutaan siitä, että DNA-eristys toimii mastiittimaidossa. Tämä testataan eristämällä näytemaidoista reaaliaikaisen PCR-kitin tunnistamien kohdepatogeenien DNA:ta. Näytemaitoina käytetään maitonäytteitä, jotka on kerätty mastiittia sairastavilta lehmillä. Näytemaitoja on saatu Thermo Fisher Scientific:n ylläpitämästä mastiittitestilaboratoriosta, jonne asiakkaat lähettivät maitonäytteitä mastiittianalyysiä varten. Näytteistä on määritetty testauslaboratoriossa niiden sisältämät taudinaiheuttajat, joten kittien laadunvalvonnassa näytteistä on saatava vastaava tulos. Laboratorion lopettamisen jälkeen vuonna 2016, maitonäytteitä ei ole enää saatavilla, joten tulevaisuutta varten on kehitettävä uusi tapa suorittaa toiminnallinen laadunvalvonta.

Puhtaustestissä kittiä testataan eristämällä 12 eristysnollaa käyttäen kitin kaikkia reagensseja, mutta mukaan ei lisätä maitonäytettä. Eristysnollissa ei saa esiintyä Cq-arvoja kohdepatogeenien osalta, jotta laadunvalvontatulos voidaan hyväksyä. Ongelmana ovat kuitenkin ympäristön aiheuttamat kontaminaatiot, joista on vaikea päästä eroon. Etenkin *Staphylococcus*-kontaminaatiot ovat yleisiä, koska niitä esiintyy yleisesti iholla ja limakalvoilla (4, s. 163-171). Puhtaustestin DNA-eristykset tehdään laminaarikaapissa, mutta se ei aina ole riittävä kontaminaatioiden estämiseksi työn suorittajasta.

Uuden laadunvalvontamenetelmän tarkoituksena olisi ratkaista nämä ongelmat. Tavoitteena on vähentää laadunvalvontaan kuluva aikaa sekä vähentää työvaiheita. Lisäksi on ratkaistava mastiittimaitojen loppumisesta aiheutuvat raaka-aineongelmat.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 DNA-eristysmenetelmä

Kaikki tässä opinnäytetyössä suoritettut DNA-eristykset tehtiin käyttäen PathoProof-tuoteperheen L- ja S-kokoista kittiä ja niiden menetelmäohjeita. S-kitillä tehtiin vain puhtaustestin näytteitä, joihin ei lisätty lainkaan maitoa. L-kitillä tehtiin sekä eristysnollia, että maitonäyte-eristysnäytteitä. Kaikki DNA-eristykset tehtiin PathoProof-kittien menetelmäohjeiden mukaisesti (PathoProof Complete-16 kit, Instructions for Use).

Eristyksissä ei käytetty KingFisher-tuotteita, sillä automaattisesta eristyksestä voi seurata vääristymiä tuloksiin. Näytteitä hajotetaan automaattisessa eristyksessä kemiallisesti ja fyysisesti, joten tulokset voisivat olla parempia KingFisher-eristyksessä. Tästä syystä KingFisher-laitetta ei otettu mukaan vertailuihin.

4.2 Toiminnallisen testin kehitys

Standardimaito valmistettiin käyttäen rasvaista täysmaitoa (Valio, vanhan ajan luomu täysmaito), johon lisättiin C-16-kitin tunnistamia taudinaiheuttajalajeja. Osa kasvatuksista oli valmiina tätä opinnäytetyötä varten, mutta osan kasvatusta aloitettiin kaupallisesti saatavilla olevista bakteerikannoista. Näitä soluja kasvatettiin kaupallisilla maljoilla (Tryptone soya agar/Brain heart infusion agar, OXOID) solumäärän kasvattamista varten. Pesäkkeet siirrettiin kasvatusliemeen (Tryptone soya broth/Brain heart infusion broth, OXOID) ja niistä määritettiin kolonneja muodostavien pesien lukumäärä millilitraa kohden (cfu/ml). Kasvatusliemessä olevat solut pakastettiin odottamaan pesäkelaskun tuloksia. Pesäkeluku määritettiin tekemällä 1:10-laimennossarja soluista. Sarjan laimennoksia viljeltiin maljoilla (Tryptone soya agar/Brain heart infusion agar, OXOID) kolme vuorokautta. Tämän jälkeen pesäkkeet laskettiin maljalta, jolta pesäkkeiden laskeminen oli mahdollista. Ottamalla huomioon laimennuskertoimet, saatiin laskettua cfu/ml-pitoisuus.

Standardimaitoa varten bakteerikasvatuksia pipetoitiin maitoon niin, että jokaisen kohteen pitoisuus maidossa olisi 10^6 cfu/ml. Tästä poikkeuksena olivat *Corynebacterium bovis* ja *Prototheca*-suvun edustaja, joiden kohdalla bakteerikasvatukset olivat liian laimeita haluttuun pitoisuuteen. Näiden kohteiden kohdalla pitoisuus oli järjestyksessä 10^4 cfu/ml ja 10^5 cfu/ml. Solujen lisääntyminen standardimaidossa estettiin lisäämällä maitoon säilöntäainetta (Broad spectrum microtabs ® II, Advanced Instrumets), joka estää solujen kasvun, mutta ei tapa niitä.

Standardimaidosta eristettiin DNA:ta L-kitin ohjeiden mukaisesti. Eristys toistettiin kaksi kertaa ja kummallakin kerralla tehtiin 16 toistoa. Eristetyt DNA-näytteet analysoitiin reaaliaikaisella PCR:llä käyttäen PathoProof C-16 real-time PCR-kittiä (Thermo Fisher Scientific). Yhteen reaktioon lisättiin 15 µl master mixia (PathoProof-kitti) ja 5 µl primer mixia (PathoProof-kitti). Jokaiseen reaktioon lisättiin 5 µl DNA-näytettä. Primer mixin tunnistamat kohteet on kuvattu taulukossa 2. Trueperella pyogenes ja/tai Peptoniphilus indolicus

Taulukko 2. Primer mixien sisältämät kohteet PathoProof C-16-tuotteessa.

Primer mix 1	Primer mix 2	Primer mix 3	Primer mix 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	Beta-laktamaasi geeni	<i>Staphylococcus</i> -suku	<i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Enterococcus</i> -suku	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Trueperella pyogenes</i> / <i>Peptoniphilus indolicus</i>
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma</i> -suku	<i>Prototheca</i> -suku	Hiivat
Sisäinen kontrolli	Sisäinen kontrolli	Sisäinen kontrolli	Sisäinen kontrolli

Kaikki reaaliaikaiset PCR-ajot suoritettiin Staratagene MX3005P -laitteella (Agilent Technologies) ja ohjelman PCR-parametrit ovat listattuna taulukossa 3. Tulokset analysoitiin MxPro-ohjelmalla (Stratagene, versio 4.10).

Taulukko 3. Analyysissä käytetty reaaliaikainen PCR -ohjelma.

Vaihe	Lämpötila	Kesto
1 Alkudenaturaatio	95 °C	10 min
2 Denaturaatio	95 °C	5 s
3 Pidentymisvaihe	60 °C	60 s
4 Fluoresenssin mitta		
5 Toista syklin vaiheet 2-4 39 kertaa		

Standardimaidon lisäksi tehtiin vertailumaito mastiittilaboratoriosta saatuihin näytemaitoihin. Vertailumaitoa varten yhdistettiin useampi näyte, jotka olivat sisältäneet analyysien perusteella vain yhtä taudinaiheuttajaa. Tähän maitoon lisättiin samoja patogeneja samassa suhteessa kuin standardimaitoon ja se analysoitiin samalla tavalla kuin standardimaito. Lisäksi DNA:ta eristettiin kahdesta Valion luomu vanhanajan täysmaitoerästä, jotta saatiin tietoa maidon sisältämistä DNA-määristä. Toinen eristä oli sama kuin standardimaitoon käytetty erä.

Standardimaidon toimivuutta arvioitiin vertaamalla saatuja Cq-keskiarvoja tuloksia mastiittimaidon tuloksiin. Tuloksia testattiin myös tilastollisesti. Ennen tilastollisten analyysien suorittamista saaduista tuloksista testattiin normaalijakautuneisuus Minitab-ohjelmiston (Minitab 17, USA) avulla. Tämän jälkeen standardimaitoa ja mastiittimaitoa vertailtiin parittaisella t-testillä Minitab-ohjelmistolla. Normaali-jakautuneisuuden testaus ja parittainen t-testi toistettiin myös jokaiselle kohteelle, jotta voitiin tarkastella lähemmin eroja kahden maidon välillä.

4.3 Puhtaustestin kehitys

4.3.1 Nykyisen laadunvalvontaprosessin tarkastelu

Puhtaustestin kehitys aloitettiin testaamalla nykyistä laadunvalvontaprosessia, joka tehdään suorittamalla DNA-eristys lisäämättä mukaan maitonäytettä. DNA-eristysprotokollaan kuuluu kahdeksan eri liuosta. Näistä lyysauspuskuri 2:sta valmistetaan Thermo Fisher Scientific:n Vantaan toimipisteessä ja sille tehdään oma laadunvalvonta valmistusvaiheessa. Siksi tämän liuoksen kontaminoitumista ei testattu tässä opinnäytetyössä. Muut seitsemän reagenssia kontaminoitiin erikseen *Serratia marcescens* bakteerin soluilla ja DNA:lla. Lisäksi kontaminoitiin maitonäyte (Valio, vanhanajan luomu täysmaito), jotta reagenssien tuloksia voitiin verrata samalla tavalla kontaminoituun näytematriisiin. *Serratia marcescens* bakteerin solut olivat samoja kuin funktionaalisessa testauksessa käytetyt solut. DNA oli eristetty aikaisemmin tutkimuslaboratoriossa käytetystä bakteerikannasta.

Testaus suoritettiin kontaminoimalla yksi reagenssi kerrallaan. Jokaisessa kokeessa yksi reagenssi kontaminoitiin soluilla ja DNA:lla. Kontaminoitavasta reagenssista valmistettiin kaksi näytettä, joista toiseen lisättiin soluja ja toiseen DNA:ta. Muut reagenssit olivat aina puhtaita. Jokaisesta näytteestä eristettiin 10 rinnakkaista eristystä käyttäen L-kitin eristysprotokollaa. Soluja lisättiin jokaiseen näytteeseen 4000 cfu:ta ja DNA:ta lisättiin 10 000 kopiota. Solujen ja DNA:n lisäys oli sama jokaisen reagenssin kohdalla, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Näytteiden lisäksi jokaisella eristyskerralla eristettiin eristysnollia, jotka eristettiin käyttäen puhtaita reagensseja. Eristetyt DNA-näytteet analysoitiin käyttäen PathoProof master mixiä 15 µl ja PathoProof primer mixiä neljä 5 µl reaktiota kohden. DNA:ta lisättiin reaktioon 5 µl. Ajo suoritettiin samoilla parametreilla kuin taulukossa 3 Stratagene MX3005P -laitteella (Agilent Technologies). Tulokset analysoitiin MxPro-ohjelmalla (Stratagene, versio 4.10). Tuloksiksi hyväksyttiin tulokset vain sellaisista eristyksistä, joiden eristysnollat ja PCR-nollat olivat negatiivisia.

Tuloksia arvioitiin vertailemalla Cq-keskiarvoja jokaisen reagenssin kohdalla solu- ja DNA-kontaminaation kohdalla. Isot erot Cq-arvoissa kertovat eroista siitä kuinka hyvin mahdolliset kontaminaatiot voidaan todeta missäkin lisäysvaiheessa.

4.3.2 Uuden laadunvalvontamenetelmän kehittäminen

Uudeksi menetelmäksi tutkittiin tapaa, jolla DNA-eristyksessä käytetyt reagenssit voitaisiin yhdistää samaksi näytteeksi ja kiinnittää eristyksessä käytettyyn kolonniin ja eluoida sieltä pois. Kehitysprosessissa kokeiltiin 17 eri menetelmää, jotka on kuvattu taulukossa 4. Kokeissa vaihtelivat yhdistetyt reagenssit sekä erilaiset käsittelyt. Inkuboinnit ja pesut kuuluvat PathoProof-tuotteiden eristysprotokollaan.

Taulukko 4. Puhtaustestin DNA-eristysmenetelmän kehityksessä käytetyt reagenssit ja käsittelyt.

	Koe																
	L-kitti													S-kitti			
Yhdistetyt reagenssit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F-871	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
F-872		x	x	x	x	x		x	x		x	x		x	x	x	
AL	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Proteinaasi K	x	x	x	x	x			x			x			x	x		
Etax	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
AW 1								x	x	x	x	x	x				
AW 2								x	x	x	x	x	x				
Käsittelyt																	
Inkubointi 5 min 55 °C	x																
Inkubointi 10 min 37 °C	x	x	x														
Inkubointi 10 min 55 °C	x	x		x							x	x	x	x			
Pesu AW 1 + AW 2	x	x	x	x	x	x	x							x	x	x	x
Eluointi	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Jokaisessa menetelmässä mukaan lisättiin *Serratia marcescens* bakteerin soluja 4000 cfu:ta yhtä näytettä kohden. Toistoja tehtiin jokaisen menetelmän kohdalla kymmenen. Lisäksi jokaisella eristyskerralla eristettiin eristyskontrolleja, joihin ei lisätty soluja, jotta voitiin varmistus käytettyjen reagenssien puhtaudesta. Eristyksiä tehtiin ensin L-kitillä

ja näiden tulosten perusteella valittiin osa testeistä toistettavaksi S-kitillä. Tuloksia arvioitiin vertaamalla menetelmillä saatuja keskimääräisiä Cq-arvoja keskenään ja vertaamalla eri kittien tuloksia toisiinsa. Eri kittien eroja tarkasteltiin myös parittaisella t-testillä Minitab-ohjelmistolla (Minitab 18).

4.3.3 Uuden laadunvalvontamenetelmän testaaminen

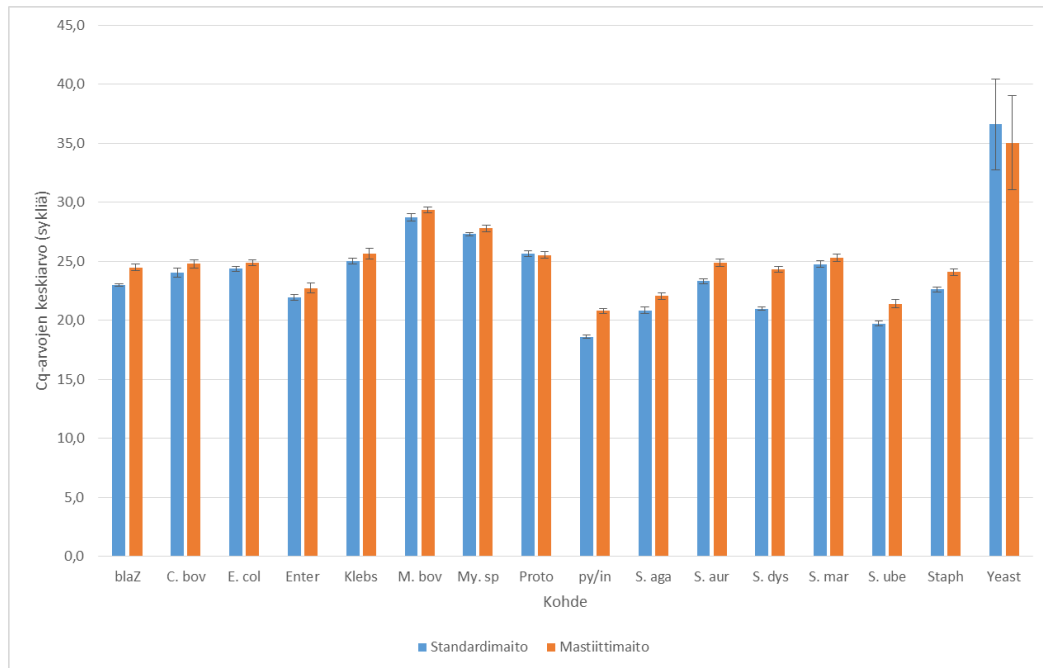
Uudeksi menetelmäksi valittiin koe numero seitsemän, jossa näytteille suoritettiin pesut, mutta ei inkubaatioita tai lisätty lyysauspuskuri 2:ta tai proteiinikinaasi K:ta. Uudelle menetelmälle määritettiin toteamisraja (LOD, Limit of detection) ja lisäksi suoritettiin laadunvalvonta kontaminoimattomilla reagensseilla. Uudella menetelmällä tehtiin laadunvalvonta, jossa tuloksia verrattiin kitin aikaisempaan oikeaan laadunvalvontatuloksiin. Uudessa laadunvalvonnassa tehtiin 12 toistoa ja eristys tehtiin L-kitillä.

Toteamisraja määritettiin eristämällä DNA:ta laimennetuista solunäytteistä lyhennetyllä menetelmällä. Soluista tehtiin kymmenkertainen laimennossarja. Eristyksiä tehtiin kymmenen ja toteamisrajaksi laskettiin eristys, jossa kaikki kymmenen toistoa antavat Cq-arvon.

5 Tulokset

5.1 Toiminnallinen testi

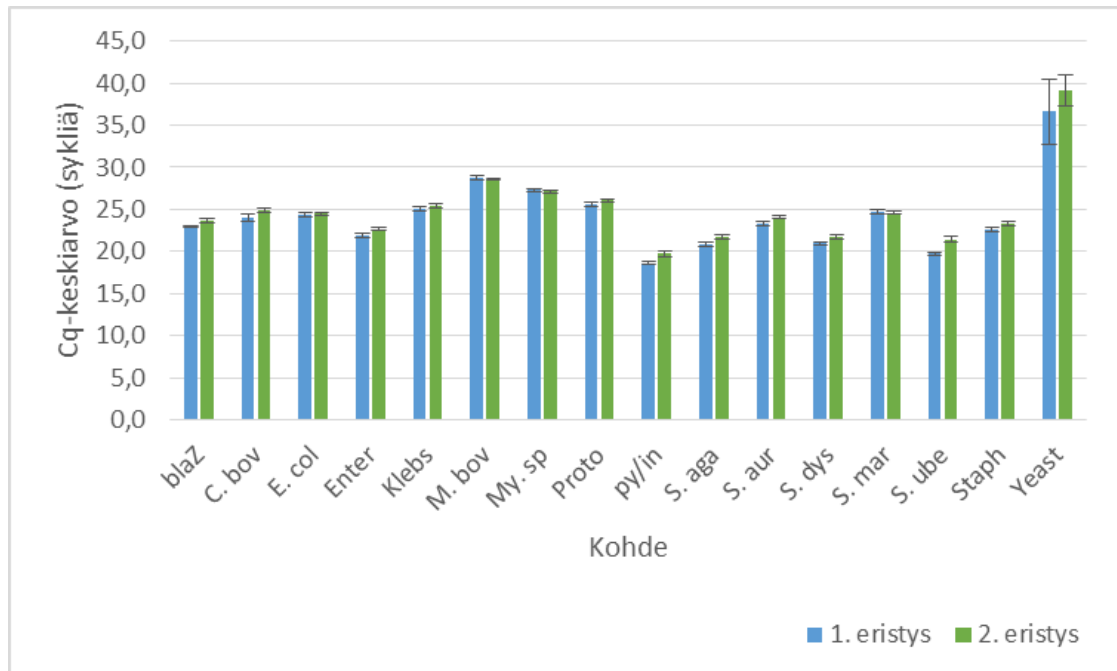
Toiminnallisessa testissä standardimaidosta ja mastiittimaidosta saatiin eristettyä kaikkia C-16-tuotteen tunnistamia taudinaiheuttajia (kuva 4). Hiiva monistui molemmilla maidoilla huonosti, mikä on nähtävissä myöhäisenä Cq-keskiarvona sekä isona keskihajontana kuvassa 4. Hiiva monistui standardimaidossa vain yhdeksässä reaktiossa kuudestatoista toistosta. Mastiittimaidossa vastaava luku oli 11. Tuloksia analysoitaessa reaktioille, jotka eivät saaneet Cq-arvoa, annettiin Cq-arvoksi 40. Arvo 40 tarkoittaa käytännössä negatiivista arvoa analyysissä ja näin tuloksista voidaan laskea keskiarvo. Tätä samaa tekniikkaa käytettiin muidenkin tulosten käsittelyn kohdalla.



Kuva 4. Standardimaidon ja mastiittimaidon vertailu jokaisen kohteen kohdalla. Vertailun on käytetty Cq-arvojen keskiarvoja. Virhepalkit kertovat näytteiden keskihajonnan, joka on suuri etenkin hiiva-kohteella. Standardimaitojen keskiarvoiset Cq-arvot ovat hieman alhaisempia kuin mastiittimaitojen, eli ne monistuvat paremmin kuin mastiittimaito.

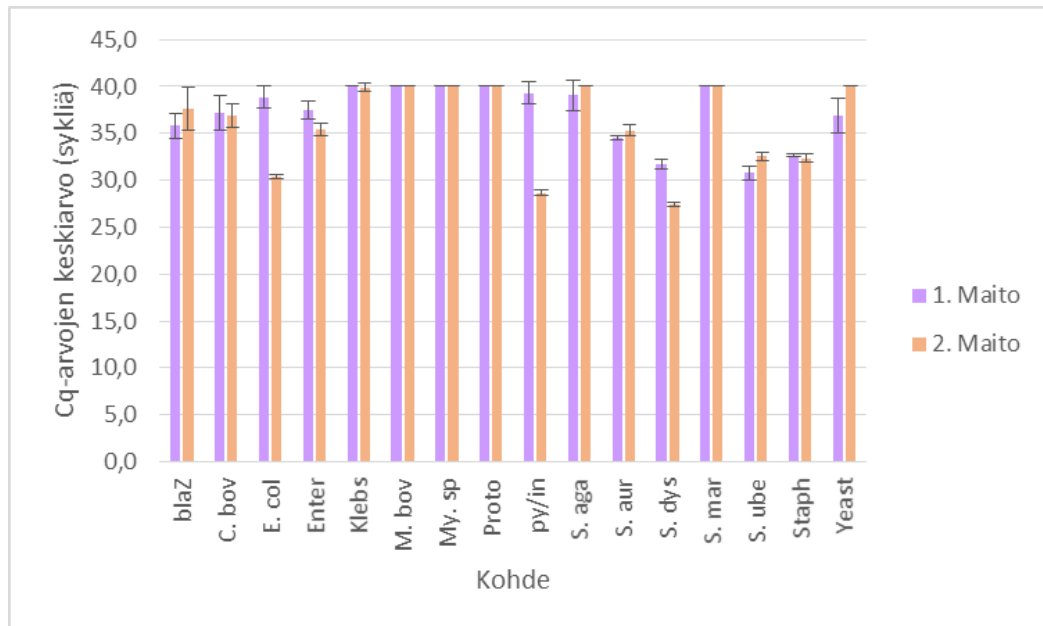
Kuvasta 4 nähdään myös, että mastiittimaidon keskimääräiset Cq-arvot jokaisen kohteen kohdalla ovat hieman suurempia kuin standardimaidon. Tämä tarkoittaa, että standardimaidossa kohteet ylittävät kynnysyklarvon aiemmin, eli ne monistuvat paremmin verrattuna mastiittimaitoon.

Standardimaidon DNA-eristys toistettiin ja tämän eristyksen tulokset olivat yhteneviä ensimmäisen eristyksen kanssa (kuva 5). Hiiva monistui jälleen huonosti ja muut kohteet monistuivat kaikissa näytteissä hyvin.



Kuva 5. Standardimaidon ensimmäisen ja toisen eristyksen Cq-keskiarvot vertailtuna keskenään. Hiiva monistui toisellakin eristyskerralla huonosti. Muiden kohteiden kohdalla oli myös eroja, mutta nämä olivat hyvin pieniä ja voivat johtua näytteen käsittelystä.

Valion luomu täysmaidosta tehtiin myös DNA-eristys, jonka tulokset on esitetty kuvassa 6. Tuloksista huomataan, että maito ei ole puhdasta taudinaiheuttajien DNA:sta. Maitonäytteessä olleiden DNA-kontaminaatioiden johdosta hankittiin toinen maitonäyte, jonka eristysnollien tulokset on esitetty samassa kuvassa. Myös uudessa maitoerässä havaittiin samanlaista DNA-kontaminaatiota kuin ensimmäisessä erässä. Näiden tulosten perusteella on selvää, etteivät maitoerät ole puhtaita mastiittipatogeenien DNA-kontaminaatioista.



Kuva 6. Valio luomu vanhanajan täysmaidosta eristettyjen maitonäytteiden tulokset. Eristykset tehtiin kahdesta eri maitoerästä, eikä niihin ole lisätty taudinaiheuttajia ennen analyysiä. Kuvasta nähdään, ettei kumpikaan maitoerä ole puhdas tutkittujen taudinaiheuttajien DNA:sta. Virhepalkit kertovat näytteiden keskihajonnasta. Kohteet, joiden Cq-keskiarvo on 40, eivät monistuneet PCR-reaktiossa.

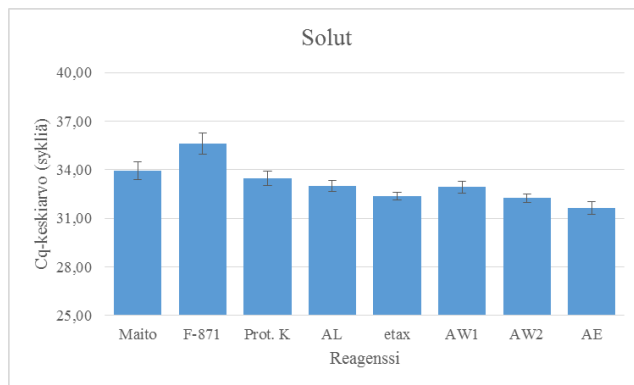
5.2 Tilastollinen analyysi

Aineistoa analysoitiin tilastollisesti ja todettiin, että standardimaidon ja mastiittimaidon välillä on tilastollisesti merkittävä ero ($p < 0,05$). Kuvassa 7 on vertailtu standardimaidon ja mastiittimaidon eroja. Kuvasta nähdään, että maitonäytteiden erot keskiarvoon nähden ovat selvästi erilaisia. Standardimaidon kohdalla erot ovat enemmän positiivisen puolella, koska näytteiden Cq-arvot olivat aikaisempia kuin mastiittimaidolla. Standardimaidon ensimmäisen ja toisen eristyksen välillä oli myös tilastollinen ero. Erityisesti hiivan epätasainen monistuminen vaikuttaa eroavaisuuksiin eristyksien välillä. Ero oli kuitenkin merkittävä, vaikka hiivatulokset otettiin pois tuloksista. Erot kahden eri eristyksen välillä ovat kuitenkin pieniä ja ne voivat johtua eroista näytteen käsittelyssä ja pipetoinnissa.

5.3 Puhtaustesti

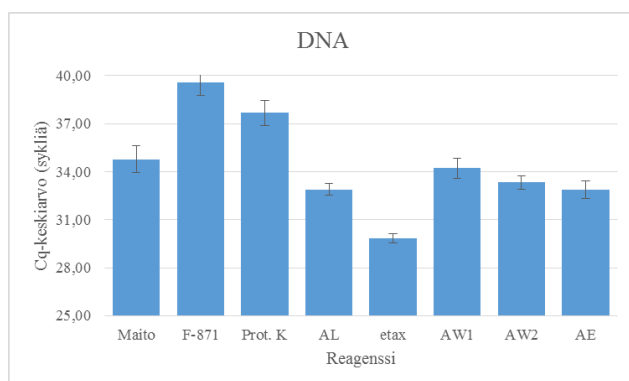
5.3.1 Nykyinen menetelmä

Käytetty laadunvalvontamenetelmä onnistui löytämään kontaminaation kaikista reagensseista soluilla ja DNA:lla (kuvat 8 ja 9). Lyysauspuskuri 1:den (F-871) DNA-kontaminaatio näkyi vain kolmessa näytteessä kymmenestä rinnakkaisesta näytteestä. Kaikilla muilla kontaminaatio näkyi kaikissa näytteissä.



Kuva 8. Solukontaminaation Cq-keskiarvot jokaisen testatun reagenssin kohdalla. Kontaminaatio on havaittavissa kaikkien kohdalla, mutta Cq-arvot eroavat toisistaan hieman.

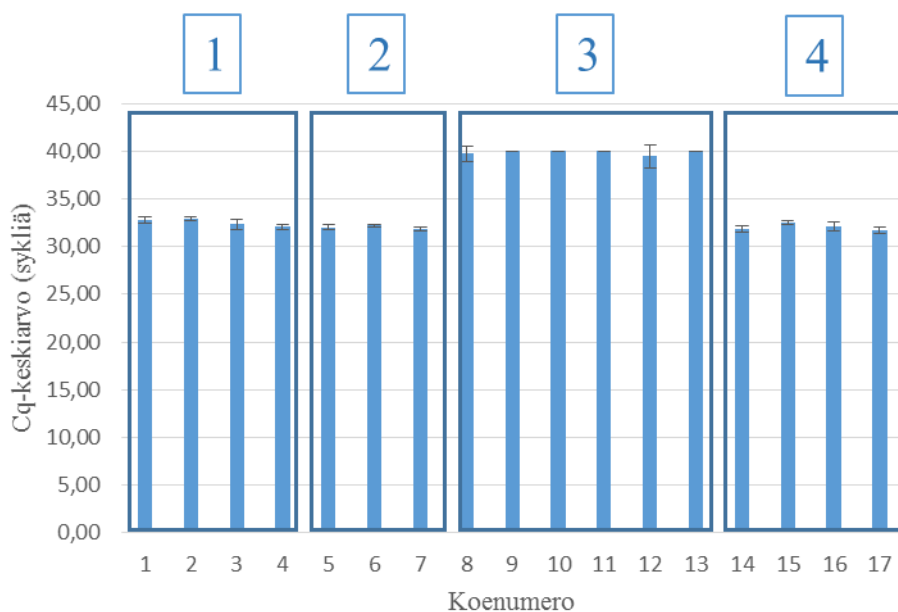
DNA-lisäyksen kohdalla reagenssien keskimääräisten Cq-arvojen välillä oli enemmän eroa, sillä ne vaihtelivat välillä 29,8–39,5 sykliä. Solukontaminaation kohdalla keskiarvot olivat toisistaan neljän syklin sisällä.



Kuva 9. DNA-kontaminaation Cq-keskiarvot jokaisen reagenssin kohdalla. Näytteiden välillä on suuria eroja.

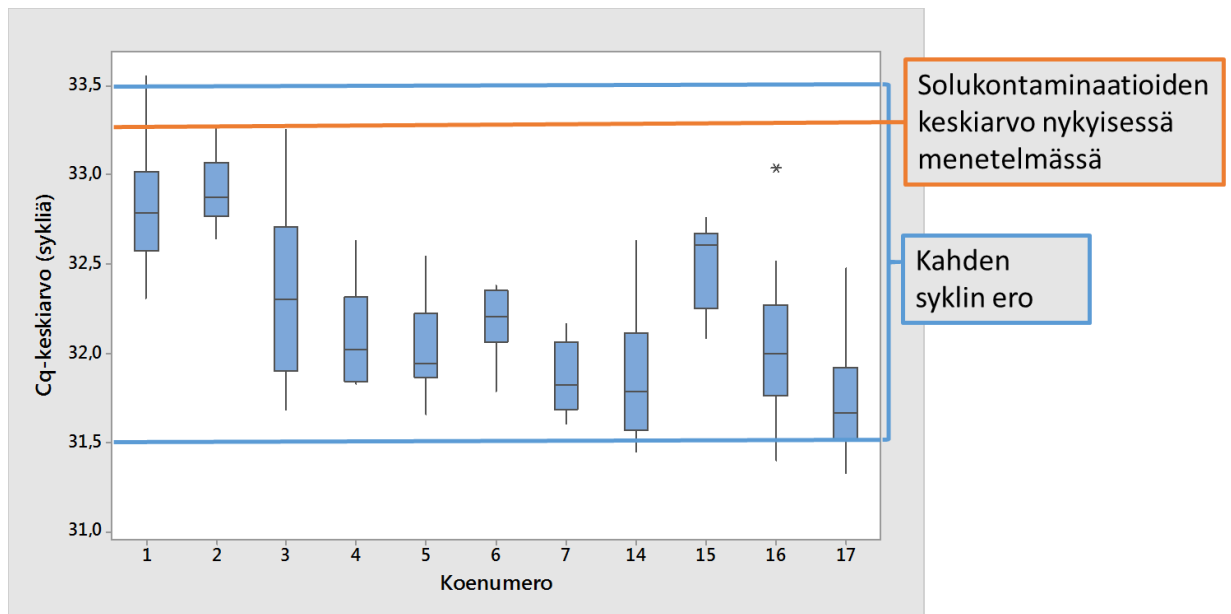
5.3.2 Uusi menetelmä

DNA:n saostamiseen ja kolonnin läpi sentrifugoimista varten tutkitut menetelmät osoittivat, että DNA-eristysmenetelmässä käytetyt pesut ovat tarpeellisia (kuva 10). Tulokset on jaettu kuvassa neljään eri ryhmään. Ryhmät eroavat niiden eristykseen käytettyjen käsittelyjen ja kittien kohdalla. Ryhmät 1, 2 ja 3 on eristetty L-kitillä ja ryhmä 4 taas S-kitillä. Ryhmän 3 eristyksissä ei käytetty pesuvaihetta ja tuloksista nähdään, että PCR-tulokset eivät antaneet Cq-arvoa tai vain muutamassa toistossa monistui DNA:ta. Tämä näkyy kuvassa myöhäisinä Cq-arvoina.



Kuva 10. Uuden menetelmän kokeiden keskimääräiset Cq-arvot. Kokeet on jaettu neljään eri tarkasteluryhmään. Ryhmät 1, 2 ja 3 on eristetty L-kokoisella kitillä. Ryhmän 3 kokeissa ei käytetty pesuvaiheita. Ryhmät 1 ja 2 eroavat inkubaatioiden osalta. Ryhmä 4 on eristetty S-kitillä. Kokeet, joissa ei käytetty pesuvaiheita, epäonnistuivat kaikki. Muut kokeet onnistuivat.

Onnistuneiden kokeiden, eli ryhmät 1, 2 ja 4 kaikkien Cq-keskiarvot olivat 1,5 syklin päässä toisistaan. Kuvassa 11 nähdään lähemmin miten Cq-keskiarvot eroavat toisistaan boxplot-kuvaajassa. Lähes kaikki arvot ovat kahden syklin päässä toisistaan. Menetelmien tuloksia verrattiin myös nykyisen menetelmän testauksessa saatuun solukontaminaatioiden keskiarvoon. Tämä keskiarvo oli suurempi kuin suurin osa uusien menetelmien tuloksista.



Kuva 11. Kaikkien onnistuneiden kokeiden Cq-arvojen boxplot-kuvaaja. Kuvasta nähdään, että tuloksista suurin osa sijoittuu kahden syklin sisälle toisistaan. Erot eri menetelmien välillä ovat siis hyvin pieniä. Kuvassa näkyy oranssilla viivalla myös nykyisen menetelmän solukontaminaation Cq-keskiarvo laskettuna kaikista reagensseista. Lähes kaikki uusien menetelmien Cq-arvoista on alle tämän, eli ne monistuvat tehokkaammin.

Tarkasteluun otettiin myös samanlaiset kokeet, jotka oli tehty L- ja S-kitillä. Samanlaisiksi kokeiksi laskettiin ne, joihin oli lisätty samat reagenssit ja niitä oli käsitelty samalla tavalla. Näin saatiin verrattua ovatko tulokset samoja kittien välillä. Parittaisen t-testin tulokset on esitetty taulukossa 6. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että vain kokeilla 5 ja 15 oli tilastollisesti merkittävä ero. Muilla kokeilla ero ei ollut merkittävä.

Taulukko 6. Eri kiteillä tehtyjen samojen kokeiden väliset erot arvioituna parittaisella t-testillä. Kokeilla 5 ja 15 ero oli merkittävä. Muiden kohdalla eroa ei ollut havaittavissa.

Kokeet	p-arvo
4+14 Prot.K + F-872 + 55 ° inkubointi	0,172
5+15 Prot.K + F-872	0,001
6+16 F-872	0,478
7+17	0,380

5.3.3 Toteamisraja ja laadunvalvonta uudella menetelmällä

Toteamisrajaksi saatiin määritettyä x cfu:ta. Tämä on pitoisuus, jossa kaikki kymmenen toistoa olivat positiivisia. Uudella laadunvalvontamenetelmällä tehdyn normaalin laadunvalvonnan tuloksissa esiintyi kaksi *Staphylococcus*-kohteen kontaminaatiota. Kontaminaatioiden Cq-arvot olivat yli 38 sykliä. Tämä tulos ei eroa kitin aikaisemmasta laadunvalvontatuloksesta. *Staphylococcus* monistumiset ovat hyvin tavallisia laadunvalvontatuloksissa.

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Standardimaidon toimivuuden arvioiminen

Standardimaidosta onnistuttiin eristämään kaikkia taudinaiheuttajia ongelmitta. Vain hiiva monistui epätasaisesti näytteissä. Hiivan huono monistuminen saattaa johtua käytettyjen solujen laadusta tai PCR-kitin ominaisuuksista. Mastiittimaitoon tehdyt lisäykset antoivat saman tuloksen, mutta niiden Cq-keskiarvojen erot olivat myöhäisempiä kuin standardimaidolla (Kuva 4). Tähän eroon voivat vaikuttaa mastiittimaidon sisältämän inhibiittorit. Mastiittia sairastavalla lehmällä maitoon erittyy enemmän soluja ja sen koostumus muuttuu etenkin rasvojen ja kivennäisaineiden osalta. Rasva ja kalsium inhiboivat PCR-reaktiota, josta seuraa myöhäisempi Cq-keskiarvo. Toiminnallisen testin tarkoitus on osoittaa, että myytävä tuote puhdistaa maitonäytteen niin, että inhibiittorit eivät estä reaaliaikaisen PCR:n toimimista. Tästä syystä standardimaitoa ei voida pitää täysin vastaavana ratkaisuna mastiittimaidolle. Maidon ominaisuuksien muuttaminen keinotekoisesti olisi liian vaikeaa ja epäluotettavaa. Mastiittimaitojen hankkiminen laadunvalvontaa varten taas olisi hankalaa ja saatavuus epäluotettavaa.

Kaupasta ostetussa maidossa havaittiin myös taudinaiheuttajien DNA:ta. Valion luomu täysmaito on pastöroitu, joten taudinaiheuttajien DNA on luultavasti maidossa jo kuolleista soluista, eikä kyseessä ollut elävien solujen aiheuttama kontaminaatio. Tämä on voinut vaikuttaa myös tuloksiin aikaistamalla Cq-arvoja. Toisaalta maitoon lisätty määrä taudinaiheuttajia oli niin suuri, että ne peittivät alleen maidon aiheuttaman taustan.

Standardimaidosta saatujen tuloksien perusteella sitä ei voida pitää mastiittimaitojen korvaajana. Mastiittimaitoa ei voida jäljitellä tarpeeksi hyvin ja näytteitä ei ole helposti saatavilla jatkossa. Valmistajan analyysien perusteella tiedetään, että kitin reagenssit eristävät DNA:ta. Lyysauspuskuri 2:den laadunvalvonnassa taas todetaan, että se hajottaa taudinaiheuttajien soluja vaaditusti. Näiden seikkojen valossa on todettava, että toiminnallista testiä ei voida suorittaa standardimaidolla, mutta kitin toiminnallisuudesta voidaan olla tarpeeksi varmoja muiden analyysien vuoksi. Toiminnallinen testi jätetään pois uuden laadunvalvontaohjeen ehdotelmasta, joka on esitetty liitteessä yksi.

6.2 Puhtaustestin arvioiminen

6.3 Nykyinen menetelmä

Saatujen tulosten perusteella soluista ja DNA:sta aiheutuneet kontaminaatiot voidaan havaita kaikista reagensseista käytetyllä laadunvalvontamenetelmällä, paitsi lyysauspuskuri 1:stä. Myös proteinaasi K:n kohdalla saadut Cq-arvot olivat myöhäisempiä kuin muilla reagensseilla. Lyysauspuskuri 1:n huonompi tulos voi johtua siitä, että puhtaustestissä, jossa ei käytetä mukana maitonäytettä, ei muodostu näkyvää pellettiä, jonka päältä liuos imetään pois. Liuosta voi imeä putkesta liian paljon pois, jolloin mahdollinen DNA-pelletti saattaa myös imeytyä pois. Kontaminaatio lyysauspuskuri 1:ssä on siis mahdollista jäädä havaitsematta.

Tällä hetkellä käytössä oleva puhtaustesti vahvistettiin toimivaksi, mutta saadut Cq-arvot olivat vielä suhteellisen suuria. Kontaminaation lisäysmääräksi valikoitui määrä, jolla saadaan positiivinen Cq-arvo, joka on lähellä arvoa 37. PathoProof-ohjelmisto laskee kaikki Cq-arvot, jotka ovat suurempia kuin 37, negatiiviseksi tulokseksi ja *Staphylococcus* sekä blaZ-kohteilla tämä raja on vielä pienempi. Tätä ohjelmaa käytettäessä myös osa tämän laadunvalvontakokeen tuloksista jäisi negatiivisiksi. Mahdollinen kontaminaatio olisi luultavasti hyvin pieni, joten sen havainnointi kaikista reagensseista olisi vaikeaa. Etanolin kohdalla keskimääräinen Cq-arvo oli alhaisin. Etanoli saostaa DNA:n tehokkaasti, joten hävikki sen kohdalla on luultavasti ollut hyvin pientä.

Kontaminaatio myös löytyi jokaisesta vaiheesta, myös solujen hajotuksen jälkeisistä vaiheista. Soluja sisältävien kontaminaatioiden ei pitäisi antaa samanlaista signaalia loppuvaiheen kontaminaatiolisäyksissä. Ehjien solujen ei pitäisi kiinnittyä kolonniin, vaan mennä pesuliuosten mukana keräysastiaan. Tähän voi kuitenkin vaikuttaa se, että solut hajoavat helposti, kun ne siirretään reagensseihin. Lyysauspuskurit on tarkoitettu itsessään solujen hajottamiseen. Pesupuskureissa taas on hyvin paljon etanolia, joka hajottaa soluja. Lisäksi reagenssien pH ja suolakonsentraatiot eivät ole optimaalisia solujen elinvoiman ylläpitämiseen. Jos reagenssit ovat kontaminoituneet soluista, on hyvin mahdollista, että ne ovat ainakin osittain hajonneet ja niiden sisältämä DNA on reagensseissa vapaana, joka havaitaan analyysissä ilman solujen hajottamista.

6.4 Uusi menetelmä

Testattujen mahdollisten uusien menetelmien välillä oli paljon eroa. Menetelmät, joissa ei käytetty mitään pesuvaihetta, epäonnistuivat (Kuva 10). Epäonnistuneiden kokeiden kohdalla C_q-arvot ovat lähes 40 sykliä, eli niissä ei tapahdu DNA:n monistumista. Niiden tuloksista huomattiin myös, että primer mixin sisältämä sisäinen monistuskontrolli ei monistunut. Ilman pesuja näyte sisältää inhibiittoreita, jotka aiheuttavat PCR-reaktion epäonnistumisen. Proteiinikinaasi K:n ja lyysauspuskuri 2:den pois jättäminen johti samaan lopputulokseen, joten reaktion epäonnistuminen johtuu jommastakummasta reagenssista tai reagensseista. Pesujen tarkoitus on pestä näytteestä pois mahdollisia inhibiittoreita ja myös hajottamiseen tarvittavia menetelmän alkupäässä käytettäviä reagensseja. Soluseinien hajotus tapahtuu entsymaattisesti, joten nämä entsyymit voivat hajottaa myös DNA:ta ja DNA-polymeraasientsyymia häiriten näin reaaliaikaista PCR-reaktiota.

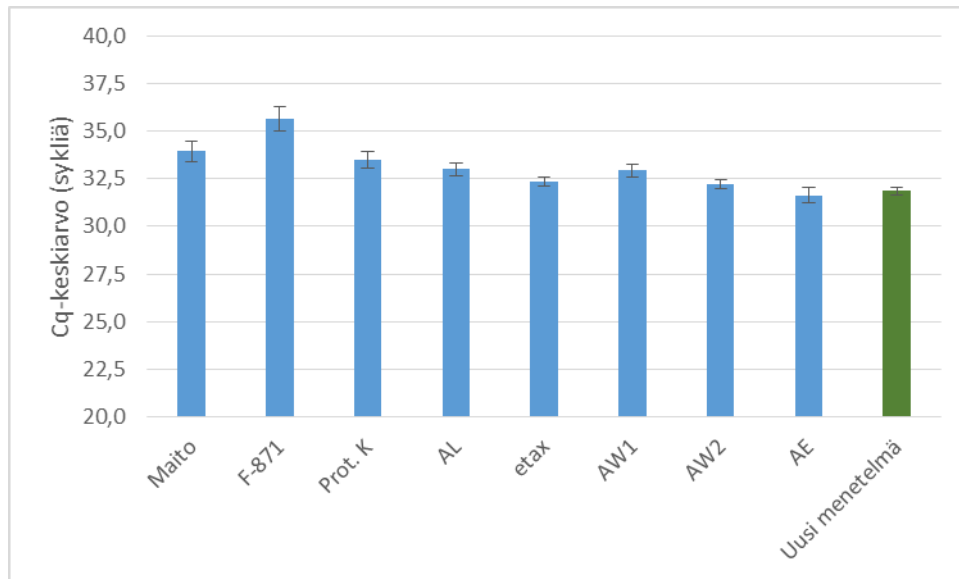
Onnistuneet kokeet jaettiin kolmeen eri ryhmään (Kuva 10). Kaikkien ryhmien C_q-keskiarvot erosivat toisistaan hieman. Kuitenkin erot olivat hyvin pieniä ja melkein kaikki havainnot ovat kahden syklin sisällä toisistaan. Eroihin vaikuttaa erot näytteenkäsittelyssä eristysvaiheessa ja reaaliaikaisen PCR:n tehokkuudessa.

Kaikki toimineet menetelmät antoivat pienemmän C_q-arvon kuin nykyisen menetelmän arvioinnissa maitonäytteen kohdalla, eli menetelmä havaitsee kontaminaation helpommin

pelkistä reagensseista kuin maitonäytteestä. Reagenssit ovat helpompi näytematriisi kuin maitonäytteet, ja siksi niissä vapaana oleva DNA on helpompi havaita, sillä niissä ei ole samanlaisia inhibiittoreita. Tuloksia voidaan myös verrata käytössä olevan menetelmän solukontaminaatiotuloksiin, koska kontaminaation lisäys on ollut sama jokaisessa reagenssissa. Kaikkien reagenssien yhdistetty Cq-keskiarvo on 33,2 sykliä. Tämä on myöhäisempi keskiarvo, kuin uusilla menetelmillä saadut.

Uudeksi menetelmäksi valittiin menetelmä seitsemän, jossa tehtiin kaikki DNA-eristysprotokollaan tehdyt pesut, mutta ei yhtään inkubointeja eikä lisätty lyysauspuskuri 2:ta tai proteiinikinaasi K:ta. Uusi laadunvalvontaohje on esitetty liitteessä 1. Tulokseen päädyttiin, koska onnistuneiden menetelmien välillä ei ollut isoja eroja. Inkubointeja tarvitaan vain, jos mukaan lisätään lyysauspuskuri 2:ta tai proteiinikinaasi K:ta. Nämä voidaan jättää pois, sillä reagensseissa mahdollisesti olevat solut eivät ole näiden tulosten mukaan ehjiä. Tästä syystä kontaminaatio voidaan havaita helposti myös lyhennetyllä menetelmällä. Samasta syystä menetelmä huomaa myös pesupuskureissa tai eluutiopuskurissa olevat kontaminaatiot. Menetelmän herkkyyden todettiin vastaavan aikaisempia määrittämiä. Uudella menetelmällä säästetään huomattavasti aikaa, sillä sen tekeminen L-kitillä vie puolet lyhentämättömän menetelmän suorittamiseen kuluva ajasta.

Uutta menetelmää verrattiin nykyisen menetelmän solukontaminaatioiden tuloksiin (Kuva 12). Kuvasta nähdään, että vain eluutioliuksella (AE) Cq-keskiarvo on alhaisempi kuin uudella menetelmällä. Tämä kertoo, että uusi menetelmä huomaa solukontaminaation yhtä hyvin kuin nyt käytössä oleva menetelmä.



Kuva 12. Uuden menetelmän Cq-keskiarvo verrattuna kaikkien reagenssien solukontaminaatiotuloksiin nykyisen laadunvalvontamenetelmän testauksessa.

Uudessa menetelmässä on otettava huomioon, että samalla on valvottu myös proteiinikinaasi K:n puhtautta. Proteiinikinaasi K:n kohdalla tulisikin siirtyä omaan laadunvalvontaan, koska sen kontaminaatiot eivät enää jäisi kiinni PathoProof-tuotteiden laadunvalvonnassa. Lyysauspuskuri 2:den kohdalla tehdään jo valmistusvaiheessa oma puhtaustesti, joten tämän reagenssin puhtaudesta voidaan olla varmoja ilman DNA-eristyskittien laadunvalvontaa.

Tuloksien varjolla olisi myös mahdollista siirtää L-kitin puhtaustesti S-kitillä tehtäväksi, sillä S-kittien ja L-kittien välillä ei ollut merkittävää eroa, paitsi menetelmien 5 ja 15 kesken. Kittien tulisikin toimia samalla tavalla, koska ne sisältävät samat reagenssit. Jos siirto tehtäisiin, olisi L-kittien kolonnilevy testattava erikseen. Tämä lisäisi testaukseen kuluvaan aikaa. L-kittien ympäristöstä tuleviin kontaminaatioihin ratkaisu on, että menetelmään vaihdetaan ohje sulkea kolonnilevy AirPore-teipillä myös toisen pesupuskurin jälkeen. Ohjeessa teippi on ohjeistettu jättämään pois, jotta etanoli haihtuisi mahdollisimman tehokkaasti. Teipin vaikutus haihtumiseen on kuitenkin niin pieni, että teipin voi lisätä levyn päälle ilman vaikutuksia DNA-näytteen laatuun. Teippi on huokoista materiaalia, joten se päästää alkoholin haihtumaan, vaikka teippi olisi kaivojen päällä.

7 Johtopäätökset

Standardimaito todettiin käyttötarkoitukseen soveltumattomaksi. Siitä saatiin eristettyä kaikkia siihen lisättyjä taudinaiheuttajia, mutta standardimaito on kuitenkin hyvin erilainen matriisi verrattuna mastiittimaitoon. Siitä voidaan saada selville vain se, että DNA-eristys onnistuu standardimaidosta, mutta ei välttämättä mastiittimaidosta. Mastiittimaidon inhibiittoreita ei voida järkevästi replikoida ja maitojen tilaus ulkopuolelta olisi liian vaikeaa. Eristyksessä käytetty lyysauspuskuri 2:n laatua valvotaan käyttäen mastiittimaitonäytteitä. Myös saapuvat DNA-eristyskitit laadunvalvontaan valmistajan puolesta, joten niiden tiedetään eristävän DNA:ta. Toiminnallisen testin suorittaminen saapuville kiteille toistaa testit kolmannen kerran. Tästä syystä toiminnallinen testi päätettiin jättää pois uudesta laadunvalvontaohjeesta.

On kuitenkin otettava huomioon se, että mastiittimaitonäytteet ovat loppumassa myös lyysauspuskuri 2:den laadunvalvonnasta. Myös tähän on kehitettävä uusia keinoja tulevaisuutta varten. Mahdollista olisi hyödyntää tätä työtä varten valmistettua standardimaitoa, jos voidaan ensin varmistua, etteivät mastiittimaidon inhibiittorit vaikuta myös lyysauspuskuri 2:den toimintaan.

Puhtaustesti on hyvin tärkeä kitin laadunvalvonnassa, joten sen muuttaminen voidaan tehdä vain, jos vaihtoehto todetaan yhtä hyvin toimivaksi kuin vanha menetelmä. Kittien puhtautta valvotaan myös niiden valmistajan puolesta, mutta kaupallisten kittien on todettu sisältävän DNA-kontaminaatioita (13). Niistä ei voida testata kaikkia mahdollisia taudinaiheuttajia, joten spesifiin analyysiin käytetyt DNA-eristyskitit on tarpeen testata niiden kohdepatogeenien DNA:n varalta. Eristyskittien kontaminaatio ei välttämättä ole peräisin kohdepatogeenista. On mahdollista, että kitteihin pääsee valmistusvaiheessa jotakin vierasta ainetta, joka monistuu PCR-reaktiossa. Tuotteet on suunniteltu spesifeiksi kohdepatogeenia vastaan, mutta monistuminen on silti mahdollista.

Puhtaustestin osalta päädyttiin uuteen menetelmään, jossa lyysauspuskuri 1, AL-puskuri ja etanoli yhdistetään samaksi liuokseksi ja sentrifugoidaan kolonnin läpi. Tämän jälkeen kolonnia pestään AW1- ja AW2-pesuliuksilla ja lopuksi näyte eluoidaan AE-puskurilla. Menetelmä siis jättää pois inkuboinnit ja lyysauspuskuri 2:den ja proteiinikinaasi K:n.

Näin saadaan lyhettyä laadunvalvontaan kuluvaan aikaan puolella. Uusi menetelmä huomaa kontaminaatiot yhtä hyvin kuin vanha menetelmä (Kuva 12). Inkubaatioiden ja lyysausentsyymien poisjättäminen on perusteltua, sillä solujen yhtenäisenä pysyminen reagensseissa on epätodennäköistä niiden alkoholi- tai entsyymisisällön takia. Menetelmän herkkyuden todettiin myös olevan yhteneväinen verrattuna nykyiseen laadunvalvontamenetelmään aikaisempien tulosten perusteella.

KingFisher-kitin kohdalla laadunvalvontaohjetta ei päädytty muuttamaan, sillä automaattinen eristysmenetelmä vie jo ennestään vähemmän aikaa verrattuna S- ja L-kittien DNA-eristysohjeeseen. Jos KingFisher-kitin laadunvalvonnassa siirryttäisiin myös lyhennettyyn menetelmään, tulisi sitä testata lisää. Kitissä on osittain eri reagensseja kuin S- ja L-kiteissä, joten niiden toimivuudesta uudessa menetelmässä ei voida olla varmoja. Etenkin magneettihiukkasia sisältävää reagenssia olisi haastavaa laadunvalvoa lyhennetyllä menetelmällä.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli vähentää laadunvalvontaan kuluvaan aikaan ja suoraviivaistaa työvaiheita sekä ratkaista mastiittimaitonäytteiden loppumisesta aiheutuneet ongelmat. Laadunvalvontaprosessista päätettiin jättää pois toiminnallinen testi, joten mastiittimaitoja ei ole tarpeen korvata. Puhtaustestin osalta valittiin menetelmä, jossa työvaiheiden määrä puolittui. Lisäksi laadunvalvontaan kuluva aika väheni puolella puhtaustestin osalta. Kun otetaan huomioon toiminnallisen testin poisjättäminen, on ajansäästö 75 % S- ja L-kiteillä verrattuna nykyiseen laadunvalvontaohjeeseen. Uuteen laadunvalvontaohjeeseen kirjoitettiin myös tarkat ohjeet puhtaustestin hyväksymisestä. Ennen ohje oli epämääräinen sallituista tuloksista ja se ei ollut yhtenevä muiden tuoteperheen tuotteiden laadunvalvontakriteereihin nähden. Nämä kaikki muutokset parantavat huomattavasti laadunvalvontaprosessia.

Lähdeluettelo

- 1 Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O. & Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Q.* Vol. 29, s. 18-31.
- 2 Hiitiö, H., Vakkamäki, J., Simojoki, H., Autio, T., Junnila, J. & Pelkonen, S. 2017. Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Veterinaria Scandinavica.* Vol. 59, s. 1-14.
- 3 Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K. & Kennedy, R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* Vol. 27, s. 486-493.
- 4 Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. 1993. *Utareen sairaudet. 2. painos.* Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- 5 Heikkilä, A., Nousiainen, J. & Pyörälä, S. 2010. Kallis utaretulehdus. <
<https://www.yumpu.com/fi/document/view/26352989/kallis-utaretulehdus-anna-maija-heikkila-jouni-nousiainen-ja-satu->>. Luettu 07.17. 2017.
- 6 Blowey, R. & Edmonson, P. 2010. Mastitis control in dairy herds. 2. painos. CABI; s. 1-5.
- 7 Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V. & Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science.* Vol. 87, s. 2433-2441.
- 8 Tan, S. C. & Yiap, B. C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Vol. 2009, s.1-10.
- 9 Metzenberg, S. 2007. *Working with DNA.* 1. painos. Taylor & Francis.

- 10 Opel, K. L., Chung, D. & McCord, B. R. 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *J Forensic Science*. Vol. 55, s. 25-33.
- 11 Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C. & Moroni, P. 2006. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *Journal of Dairy Science*. Vol. 89, s. 163-169.
- 12 Stephen, A. B. 2004. *A-Z of Quantitative PCR*. 1. painos. USA: International University Line.
- 13 Salter, S., Cox, M., Turek, E., Calus, S., Cookson, W., Moffatt, M., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. & Walker, A. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*. Vol. 12, s. 1-12.

Ehdotus uudeksi laadunvalvontaohjeeksi

Liite on ehdotus uudeksi laadunvalvontamenetelmäksi.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

Sivu 1(5)

MBD Finland	PathoProof_LAADUNVALVONTAOHJE
Dokumentin tallennusnimi: <small>[code_rev_name.*] [ei pilkkuja]</small>	PathoProof_Laadunvalvontaohje
Laatija: <small>[nimi ja päivämäärä]</small>	Susanna Ahola 19.9.2017
Tarkastaja: <small>[nimi ja päivämäärä]</small>	
Hyväksyjä: <small>[nimi ja päivämäärä]</small>	
Tarkastus ja hyväksyntä AGILE:ssa	
Versio	Muutokset:
01	
02	
03	
04	
05	
06	Puhtaustestin osalta menetelmää on muutettu S- ja L-kiitin kohdalla. Funktionaalinen testi jätetty pois. Muutettu hyväksyntäkriteerejä.

Tässä dokumentissa kuvataan DNA-eristyskittien laadunvalvonta ("incoming QC"), joka suoritetaan jokaiselle uudelle tuotantoerälle.

1. LYHYT KUVAUS LAADUNVALVONTAOHJEESTA

Ohjeessa kuvataan laadunvalvonta PathoProof™ tuoteperheen DNA-eristyskiteille:

- S-kitti
- L-kitti
- KingFisher-kitti

Incoming QC-protokollan avulla selvitetään uusien eristyskitti-lottien komponenttien ja reagenssien puhtaus. Vertailussa käytetään PathoProof Complete-16 tuotetta.

2. LAADUNVALVONTAOHJE

2.1 Eristysnollat

Eristysnollia eristetään 12 rinnakkaista. Eristysnollilla kontrolloidaan eristysreagenssien puhtautta. Eristykseen käytetään S- ja L-kitillä nopeutettua menetelmää, joka on muokattu DNA-eristyskittien menetelmäohjeesta. KingFisher-kiteillä noudatetaan menetelmäohjetta.

2.2 PCR-nollat

PCR-nollia ajetaan ainakin kaksi rinnakkaista laadunvalvonta-ajon yhteydessä. PCR-nollilla kontrolloidaan qPCR-reagenssien puhtautta laadunvalvonnassa.

3. LAADUNVALVONNAN KULKU

3.1 S-kitti

1. Valmista laadunvalvottavista reagensseista mix allaolevan taulukon mukaisesti.

Reagenssi	1 x reaktio V (µl)	14 x reaktiota V (µl)
F-871	350	4900
AL-puskuri	200	2800
EtaxA	200	2800
Tilavuus yhteensä	750	10500

2. Pipetoi näytteitä 750 µl kolonneihin varoen reagenssien vaahtoamista.
3. Sentrifugoi 14 000 rpm 1 min.
4. Aseta kolonni puhtaaseen keräysputkeen ja lisää 500 µl AW1. Sentrifugoi 14 000 rpm 1 min.
5. Aseta kolonni puhtaaseen keräysputkeen ja lisää 500 µl AW2. Sentrifugoi 14 000 rpm 3 min.
6. Aseta kolonni puhtaaseen Eppendorf-putkeen ja lisää 100 µl AE. Inkuboi huoneenlämmössä 1 min. Sentrifugoi 14 000 rpm 3 min. Sentrifugoinnin jälkeen heitä käytetty kolonni pois ja sulje Eppendorf-putken korkki.

3.2 L-kitti

1. Valmista laadunvalvottavista reagensseista mix allaolevan taulukon mukaisesti.

Reagenssi	1 x reaktio V (µl)	14 x reaktiota V (µl)
F-871	350	4900
AL-puskuri	200	2800
EtaxA	200	2800
Tilavuus yhteensä	750	10500

2. Aseta 96 plate S-blokin päälle. Jaa seos 12:sta kaivoon (750 µl) ja sulje AirPore-teipillä. Valmista tarvittaessa vastapaino pipetoimalla tyhjäan S-blokkiin vettä (750 µl/kaivo) ja aseta toisen S-blokin päälle vastapaino-plate.
3. Sentrifugoi 6000 rpm 4 min, Thermo Heraeus Multifuge X3.
4. Aseta 96 plate uuden S-blokin päälle ja poista teippi. Poista mahdollinen neste kaivoista pipetoimalla ja lisää 500 µl AW1. Sulje AirPore-teipillä. Valmista tarvittaessa vastapaino pipetoimalla tyhjäan S-blokkiin vettä (500 µl/kaivo) ja aseta S-blokin päälle vastapaino-plate.
5. Sentrifugoi 6000 rpm 4 min, Thermo Heraeus Multifuge X3.
6. Aseta 96 plate uuden S-blokin päälle ja poista teippi. Poista mahdollinen neste kaivoista pipetoimalla ja lisää 500 µl AW2. Käytä tarvittaessa edellämäinnittua vastapaino-platea.
7. Sentrifugoi 6000 rpm 15 min, Thermo Heraeus Multifuge X3.
8. Aseta 96 plate Elution Microtubes –putkien päälle ja lisää 100 µl AE. Sulje AirPore-teipillä. Merkitse putket selventävillä merkinnöillä.
9. Sentrifugoi 6000 rpm 4 min, Thermo Heraeus Multifuge X3.
10. Sulje putket korkeilla (caps for Elution Microtubes).

3.3 DNA-eristys KingFisher Flex –kitillä

1. Valmistele kuusi 96 DeepWell kuoppalevyä alla olevan taulukon mukaan. Aseta magneettisauvojen suoja tyhjälle 96 DeepWell kuoppalevyille. 96 DeepWell kuoppalevyt laitetaan KingFisher Flex -laitteeseen kohdassa 9.

Levyn nimi	Reagenssi	Tilavuus per kaivo
Pesu 1	Buffer AW1	800 µl
Pesu 2	Buffer AW1	500 µl
Pesu 3	Buffer AW2	500 µl
Pesu 4	Buffer AW2	500 µl
Pesu 5	dH ₂ O, 0,02 % Tween 20	600 µl
Eluutio	Buffer AE	150 µl

2. Lisää reaktioputkiin 400 µl F-871 (Lysis soluiton 1)

3. Sentrifugoi 1500 g 3 min.
4. Poista supermatantti (nestekerros) pipetoimalla.
5. Lisää 40 µl proteinaasi K:ta tyhjän DeepWell –kuoppalevyn kaivoihin. Täytä kaivoja näytemääräsi mukaisesti.
6. Lisää putkiin 100 µl F-872 (Lysis Solution 2) ja siirrä näyte tyhjän DeepWell kuoppalevyn kaivoon pipetillä.
7. Kytke KingFisher Flex-laite päälle. Käyttäessäsi KingFisher Flex:ä tietokoneen kautta, käynnistä BindIt ohjelmisto tietokoneelta, joka on yhdistetty KingFisher Flex –laitteeseen.
8. Valitse "PathoProof" –protokolla DNA/RNA –valikosta. Paina "Start" aloittaaksesi protokollan.
9. Avaa instrumentin suojakuori ja aseta kuoppalevyt laitteeseen näytön ohjeiden mukaisesti. Jokaisen levyn jälkeen paina "Start" ja kun laitteen työpöytä on pyörähtänyt, laita laitteeseen seuraava levy. Viimeisen levyn jälkeen sulje suojakuori ja paina "Start" aloittaaksesi eristyksen.
10. Jos Buffer RLT/etanoli/MagAttract Suspension G –seosta ei ole valmistettu etukäteen, valmista seos, jossa on seuraavat tilavuudet jokaista näytettä kohti: 200 µl Buffer RLT, 200 µl etanolia (96–100 %) ja 40 µl MagAttract Suspension G. Jos käytät monikanavapipettiä, tee seosta hieman ylimäärin (esimerkiksi 20 näytteelle valmista 4 ylimääräistä reaktiota ja 96 näytteelle valmista 10 ylimääräistä reaktiota) pipetointivaraksi. Vorteksoi MagAttract Suspension G:tä 3 min ennen ensimmäistä käyttökertaa ja 1 min ennen seuraavia käyttökertoja. (Valmistaessasi seoksen yhdestä 35 ml RTL-buffer pullosta, ovat tilavuudet 35 ml RLT Buffer, 35 ml etanoli (96–100 %) ja 7 ml MagAttract Suspension G.)
11. Kun eristysprotokolla pysähtyy, sekoita Buffer RLT/etanoli/MagAttract Suspension G –seos hyvin ja lisää 440 µl jokaiseen näytekaivoon elektronisella monikanavapipetillä. Varo koskemasta kärjillä kaivojen reunoja tai nestepintaa. Laita levy takaisin laitteeseen kun laite pyytää asettamaan näytelevyn. Paina "Start" jatkaaksesi ajoa. Protokolla jatkuu itsenäisesti loppuun asti.
12. Kun eristys on valmis poista levyt laitteen näytön ohjeiden mukaisesti. Paina "Start" poistettuasi levyn, jolloin laitteen työpöytä pyörähtää ja voit poistaa seuraavan levyn. Sulje eluutirolevyn kaivot Cap Mat- tai Adhesive Plate Seal -sulkijalla säilytystä varten.

4. qPCR-REAKTIOT

Eristysnollista tehdään jokaisesta neljä qPCR-multiplex-reaktiota käyttäen PathoProof Mastitis Complete-16 tuotteen Primer Mixejä 1-4 (tarvittaessa kts. kitin manuaali).

Jokaisesta primer-mixistä (Mixit 1-4) valmistetaan eristysnollia varten qPCR-premix 16 reaktiolle seuraavasti:

285 µl F-882 (10 µl per reaktio)

95 µl F-961/F-962/F-963/F-964 Primer Mix (5 µl per reaktio)

Premix (15 µl) ja näytteet (5 µl) jaetaan qPCR-levylle esimerkiksi seuraavan plate-upin mukaisesti.. PCR-nollia varten pipetoi kaivoihin 5 µl MQ-vettä.

3) Laadunvalvonta-ajon plate setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eristysnolla 1				Eristysnolla 9							
B	Eristysnolla 2				Eristysnolla 10							
C	Eristysnolla 3				Eristysnolla 11							
D	Eristysnolla 4				Eristysnolla 12							
E	Eristysnolla 5				PCR-nolla							
F	Eristysnolla 6				PCR-nolla							
G	Eristysnolla 7				PCR-nolla							
H	Eristysnolla 8				PCR-nolla							
	Primermix 1	Primermix 2	Primermix 3	Primermix 4	Primermix 1	Primermix 2	Primermix 3	Primermix 4				

Laadunvalvonnan eristysnollat sekä PCR-nollat ajetaan Stratagene Mx3005P qPCR-laitteella käyttäen valmista ajotemplaattia Complete-16 tuotteelle.

5. TULOKSET

Tulokset analysoidaan MxPro-ohjelmalla käyttäen analysointihetkellä voimassa olevia hyväksymiskriteerejä.