

**TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA**

**Laboratorioalan koulutusohjelma**

**Tutkimuspainotteinen suuntautumisvaihtoehto**

**OPINNÄYTETYÖ**

**MYKOBAKTEERIEN LAJINMÄÄRITYKSEEN KÄYTETTÄVÄN KITIN VALIDOINTI**

**Työn tekijä: Sini Mutikainen  
Työn valvoja: Carita Sivelä  
Työn ohjaajat: Jaana Seppänen  
Eija Seuna**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2007**

**Carita Sivelä  
lehtori**



## **ALKULAUSE**

Tämä lopputyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Helsingin yksikölle. Haluan kiittää Eviran eläintautibakteriologian ryhmän henkilökuntaa ystävällisestä ja asiantuntevasta opastuksesta, erityiskiitos eläinlääkäri Jaana Seppäselle. Lisäksi haluan kiittää eläinlääkäri Eija Seunaa, lehtori Carita Sivelää ja muita työn aikana tukensa antaneita.

Helsingissä 27.11.2007

Sini Mutikainen

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Sini Mutikainen	
Työn nimi: Mykobakteerien lajinmäärittämiseen käytettävän kitin validointi	
Päivämäärä: 27.11.2007	Sivumäärä: 40 s. + 19 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioala	Suuntautumisvaihtoehto: Tutkimuspainotteinen
Työn valvoja: lehtori Carita Sivelä	
Työn ohjaajat: eläinlääkäri Jaana Seppänen ja eläinlääkäri Eija Seuna	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Helsingin yksikön eläintautibakteriologian ryhmälle. Työn tarkoituksena oli löytää ja ottaa käyttöön tämänhetkisen AccuProbe-menetelmän lisäksi monipuolisempi menetelmä mykobakteerien lajinmäärittämiseen. AccuProbe-testillä pystytään tunnistamaan suurin osa Eviraan tulleista näytteistä eristetyistä mykobakteereista, mutta muun muassa kalanäytteistä eristettyjen mykobakteerien tunnistamiseen ei ole ollut menetelmää. Työhön valittiin GenoType® Mycobacterium CM -kitti.</p> <p>Mykobakteerien lajinmäärittämiseen kehitetyn GenoType® Mycobacterium CM -kitin käyttöä opeteltiin aluksi <i>Mycobacterium avium</i> ATCC 25291 -kannalla. Tämän jälkeen kittiä kokeiltiin eläimistä eristetyillä sekä <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950- ja <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177 -kannoilla. Kyseessä on hybridisaatioon perustuva DNA-liuska-menetelmä, joka sisältää kolme päävaihetta: DNA:n eristäminen, monistaminen PCR:llä ja hybridisaatio. Työn aikana optimoitiin substraatin vaikutusaikoja, seurattiin hybrisaatiovaiheen lämpötiloja ja kehitettiin kitin valmistajan suosittamaa ravistelevaa lämpöhaudetta / inkubaattoria vastaavia laitteita.</p> <p>Työn tuloksena kitti on käyttövalmis, mutta menetelmän soveltuvuutta eläinkannoille täytyy testata lisää. Osassa tulosliuskoissa oli vääriä vaaleita viivoja ja osa oikeista vaaleista viivoista puuttui. Saadut tulokset antavat kuitenkin hyvän pohjan jatkaa kitin validointia.</p>	
Avainsanat: GenoType® Mycobacterium CM, <i>Mycobacterium</i> , liuskahybridisaatio	

## ABSTRACT

Name: Sini Mutikainen	
Title: Validation of Mycobacterial Species Identification Test	
Date: 27.11.2007	Number of pages: 44 + 19 appendices
Department: Laboratory	Study Programme: Research
Instructor: Carita Sivelä, lecturer	
Supervisors: Jaana Seppänen, veterinarian and Eija Seuna, veterinarian	
<p>This graduate study was done for the Finnish Food Safety Authority Evira, Helsinki, for the group of bacterial diseases of animals. The aim of this study was to introduce a versatile method for species identification of Mycobacteria that could be used alongside with AccuProbe-test which is used at the moment. Most of the Mycobacteria that have been isolated in Evira from the animal samples can be identified with AccuProbe-test, but for example there has been no method to identify the strains isolated from fish. GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -test was chosen for the study.</p> <p>At first the use of GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -kit, which has been developed for the identification of Mycobacteria, was studied with <i>Mycobacterium avium</i> ATCC 25291 -strain. After that the kit was tested with animal strains and <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950- and <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177 -strain. The GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM test is based on the DNA-strip-method, which includes three main steps: DNA isolation, amplification with PCR and hybridization. During the study the substrate incubation time was optimized, the hybridization temperature was followed and a shaking water bath / TwinCubator similar to the one recommended by the producer of the kit was developed.</p> <p>As the result of the study the kit is now ready for use, but its suitability for animal strains needs to be further tested. In some of the result strips there was wrong weak staining and some of the right weak staining was missing. The obtained results give a good basis to further validate the test.</p>	
Keywords: GenoType <sup>®</sup> Mycobacterium CM, <i>Mycobacterium</i> , strip hybridization	

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KIRJALLISUUSKATSAUS</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Yleistä</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i> -kompleksi</b>	<b>2</b>
2.2.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ihmisissä	3
2.2.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -kompleksin bakteerit eläimissä	4
<b>2.3</b>	<b>Ympäristömykobakteerit</b>	<b>5</b>
2.3.1	<i>Ympäristömykobakteerit</i> ihmisissä	5
2.3.2	<i>Ympäristömykobakteerit</i> eläimissä	6
<b>2.4</b>	<b>Mykobakteeridiagnostiikka</b>	<b>7</b>
2.4.1	<i>Näytteet</i>	8
2.4.2	<i>Värjäys</i>	8
2.4.3	<i>Viljely</i>	9
2.4.4	<i>Lajinmääritys</i>	9
<b>2.5</b>	<b>Liuskahybridisaatiotesti</b>	<b>11</b>
2.5.1	<i>Yleistä</i>	11
2.5.2	<i>GenoType® Mycobacterium CM (Hain Lifescience)</i>	14
2.5.3	<i>Värireaktio</i>	15
<b>3</b>	<b>KOKEELLINEN OSA</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Tausta ja tavoitteet</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Aineisto ja menetelmät</b>	<b>17</b>
3.2.1	<i>Kantojen viljely</i>	17
3.2.2	<i>DNA-eristys</i>	20
3.2.3	<i>PCR</i>	20
3.2.4	<i>Hybridisaatio</i>	21
3.2.5	<i>Laitetestaukset</i>	22
3.2.6	<i>Tulosten tulkinta</i>	22
<b>3.3</b>	<b>Kitin koeajo</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Eläin- ja ATCC-kantojen koeajot</b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Substraatin vaikutusaika</b>	<b>26</b>

<b>3.6</b>	<b>”Ravisteleva lämpöhaude” -laitteen valmistus</b>	<b>28</b>
3.6.1	<i>Ongelma</i>	28
3.6.2	<i>Vesiastian vaikutus lämpötilaan</i>	28
3.6.3	<i>Ravisteleva lava-lämpökaappi-styroksi -yhdistelmä</i>	29
3.6.4	<i>Ravisteleva lava-lämpöhaude -yhdistelmä ja kuljetusastia</i>	30
<b>3.7</b>	<b>Uuden laitteen koeajo</b>	<b>32</b>
3.7.1	<i>1. koeajo: laitteiden säätö</i>	32
3.7.2	<i>2. koeajo: eläinkannat</i>	33
3.7.3	<i>3. koeajo: substraatin vaikutusaika</i>	35
<b>4</b>	<b>POHDINTA</b>	<b>35</b>
4.1	<b>Kantojen tulokset</b>	<b>35</b>
4.2	<b>Valmistajan työohje</b>	<b>36</b>
4.3	<b>Jatkomahdollisuudet</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>YHTEENVETO</b>	<b>38</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>39</b>

## LIITTEET

<b>LIITE 1</b>	<b>Testin tulkintataulukko</b>
<b>LIITE 2</b>	<b>Arviointipaperi</b>
<b>LIITE 3</b>	<b>GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -työohje</b>
<b>LIITE 4</b>	<b>Liuskat</b>
<b>LIITE 5</b>	<b>Laiteyhdistelmän kokoamisohje</b>

## 1 JOHDANTO

Mykobakteerit ovat *Mycobacterium*-sukuun kuuluvia bakteereita, joista osa kuten muun muassa ihmistuberkuloosin aiheuttaja *Mycobacterium tuberculosis*, nautatuberkuloosin aiheuttaja *Mycobacterium bovis* ja paratuberkuloosin aiheuttaja *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ovat merkittäviä patogeenejä.

Suomessa eläinten mykobakteeridiagnostiikka suoritetaan Evirassa, jossa tehdään sekä seurantatutkimuksia mykobakteeritartuntojen esiintyvyydestä että tautidiagnostiikkaa sairaiden eläinten näytteistä. Näytteet ovat pääasiassa elimiä sekä paratuberkuloosin kohdalla uloste- ja verinäytteitä. Tutkimuksen kulku sisältää seuraavat vaiheet: näytteen otto, näytteen esikäsitteleminen, värjäys ja viljely sekä lajinmääritys. Hitaan kasvun takia mykobakteerien viljely ja lajinmääritys kestävät useita viikkoja tai jopa kuukausia.

Eviran eläintautibakteriologian ryhmässä mykobakteerien tunnistamiseen on käytetty DNA-hybridisaatioon perustuvaa AccuProbe-testiä (Gen-Probe), jolla voidaan tunnistaa muun muassa *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium* -kompleksi ja *Mycobacterium tuberculosis* -kompleksi. Testi on nopea ja helppo tehdä. Ongelmana on kuitenkin se, että kaikkia eläimistä eristettyjä mykobakteereita ei kyseisellä testillä pystytä tunnistamaan. Eviraan tulleista mykobakteeriposiitivisista näytteistä yli 95 prosentista löytyy *M. avium* -bakteeri. Osa näytteistä, varsinkin kalanäytteet, sisältävät kuitenkin myös muita mykobakteerilajeja.

Tämän työn tavoitteena oli testata mahdollista käyttöönottoa varten yhtä kaupallista kittiä, jolla voitaisiin tunnistaa enemmän eläintauteja aiheuttavia ympäristömykobakteereja kuin nykyisillä menetelmillä. Tarkoituksena oli löytää täydentävä menetelmä AccuProbe-testille. GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -kitti (Hain-Lifescience) vastasi parhaiten Eviran tarpeita, sillä se sisältää koettimet 13 merkittävimmän taudinaiheuttajamykobakteerin tunnistamiseen. Kyseessä on hybridisaatioon perustuva DNA-liuska-menetelmä, joka sisältää kolme päävaihetta: DNA:n eristäminen, monistaminen PCR:llä ja hybridisaatio. Toimivuutta käytännössä kokeiltiin aluksi *M. avium* ATCC 25291 -bakteerilla ja myöhemmin myös eläimistä eristetyistä kannoilla sekä *M. intracellulare* ATCC 13950- ja *M. tuberculosis* ATCC 25177 -kannoilla.

Työn edetessä kitin valmistajan antama työohje käännettiin ja kirjoitettiin Evi-ran laatujärjestelmän mukaiseksi.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Yleistä

Mykobakteerit ovat *Mycobacterium*-sukuun kuuluvia haponkestäviä bakteereita, joita tunnetaan yli 120 lajia [1, s. 5]. Niiden joukossa on sekä patogeenisiä eli tautia aiheuttavia bakteereja että apatogeenisiä eli tauteja aiheuttamattomia bakteereja. Osa näistä mykobakteereista on opportunistisia bakteereita eli bakteereja, jotka voivat aiheuttaa taudin isäntäelimistön puolustuskyvyttömyyden takia (muun muassa immuunikato). Mykobakteerit ovat heikosti gram-positiivisia, aerobeja, suorita tai lievästi kaareutuvia, itiöttömiä ja liikkumattomia sauvabakteereita. Ne voivat joskus haarautua ja muodostaa rihmoja, jotka voivat pilkkoutuessaan muodostua lyhyiksi sauvoiksi tai kokeiksi. Mykobakteerien taksonominen jaottelu perustui aikaisemmin lähinnä bakteerien erilaisiin ominaisuuksiin, kuten muun muassa patogeenisyyteen, kasvunopeuteen ja pigmentin tuottoon. Näiden apuna lajimäärityksessä käytetään nykyään molekyylibiologisia menetelmiä. [2, s. 438; 3; 4.]

Mykobakteerit jaetaan kahteen ryhmään: *Mycobacterium tuberculosis*-kompleksiin ja *M. tuberculosis*-kompleksiin kuulumattomiin mykobakteereihin, joista käytetään nimitystä nontuberkuloottinen (NTM)-, atyyppinen- tai ympäristömykobakteeri. Poikkeuksena on kuitenkin ihmisten lepraan aiheuttava *M. leprae*. *M. tuberculosis*-kompleksin bakteerit tarttuvat ihmisestä tai eläimestä toiseen, kun taas ympäristömykobakteeritartunta saadaan ympäristöstä. Mykobakteerien aiheuttamia tauteja sanotaan mykobakteeriooseiksi. [5, s. 2232; 6, s. 6.]

### 2.2 *Mycobacterium tuberculosis*-kompleksi

*Mycobacterium tuberculosis*-kompleksiin kuuluvia mykobakteereita ovat muun muassa *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* ja *M. microti*. Ihmisten tuberkuloosin aiheuttaja *M. tuberculosis* ja nautatuberkuloosin aiheuttaja *M. bovis* ovat eräitä tärkeimpiä ja tunnetuimpia taudinaiheuttajia. *M. bovis* voi tarttua myös ihmisiin. *M. tuberculosis*-kompleksiin kuuluvat bakteerit ovat hidaskasvuisia. [7, s. 196 - 199.]

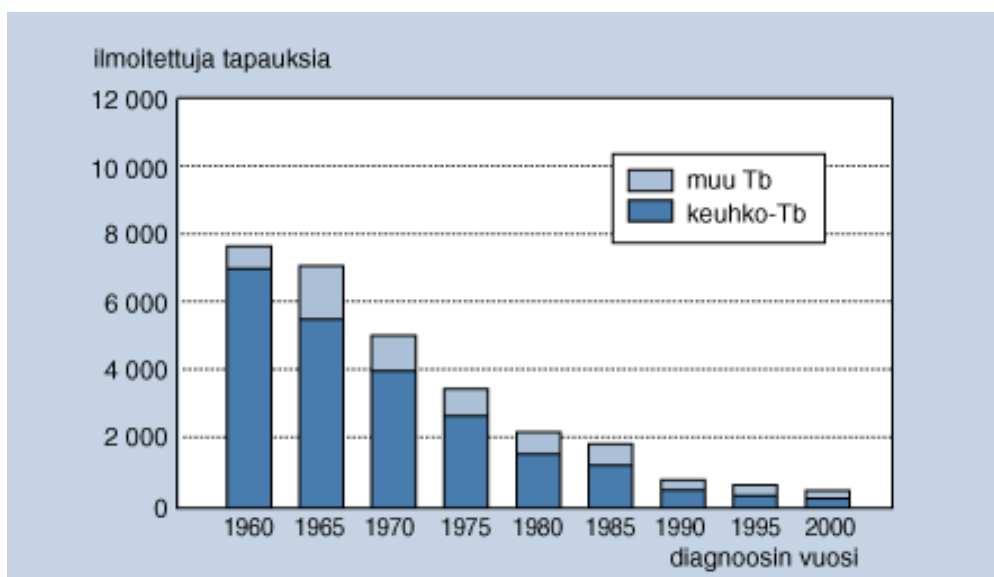


### 2.2.1 *Mycobacterium tuberculosis* ihmisissä

Suomessa tuberkuloosiin sairastumisen tärkeimpiä riskitekijöitä ovat korkea ikä, monet krooniset sairaudet, immunosuppressio eli immuunivasteen heikkeneminen ja maahanmuutto alueelta, jossa tuberkuloosia esiintyy paljon. Tautiin liittyy sekä yleis- että paikallisoireita, mutta sairaus saattaa olla myös lähes oireeton. Tärkeimpiä tuberkuloosin ehkäisykeinoja ovat rokotukset, riskiryhmiin kohdistetut seulontatutkimukset, tapausten varhainen toteaminen, tartuttavuuden katkaiseva tehokas lääkehoito, hoitotuloksen varmistaminen ja erityistilanteissa käytetty ehkäisevä hoito. Tuberkuloosin hoitona käytetään usean lääkkeen yhdistelmähoitoa. [7, s. 196 - 197; 8; 9.]

Tuberkuloosin tavallisin ja tartuntavaarallisin muoto on keuhkotuberkuloosi, mutta se voi ilmetä myös muissa elimissä. Tauti leviää varsinkin yskösvärjäyspositiivista keuhkotuberkuloositautia sairastavista henkilöistä ("avotuberkuloosi"), jolloin tartunta tapahtuu pisaratartuntana. Tavallisesti tuberkuloosi-infektion tarttumisen edellytys on läheinen ja pitkäaikainen yhdessäolo samassa taloudessa tai vastaavassa läheisessä kontaktissa tuberkuloosia sairastavan kanssa. Muissa elimissä kuin keuhkoissa esiintyvän tuberkuloosin tarttumisriski on hyvin pieni. Suurimmalla osalla tuberkuloositartunnan saaneista ei koskaan ilmene oireista tautia. Taudin kehittyessä ensioireet ilmaantuvat yleensä kahden vuoden kuluessa tartunnasta, mutta ne voivat ilmetä vasta kymmenien vuosien kuluttua vastustuskyvyn heikentyessä ikääntymisen, perussairauksien tai puolustuskykyä heikentävien lääkehoitojen vuoksi. [8; 9; 10.]

Suomessa tuberkuloosin ilmaantuvuus on pienentynyt tuberkuloositorjuntaohjelman ansiosta (kuva 1). Viimeisten Kansanterveyslaitoksen tietojen mukaan tuberkuloositapaukset laskivat vuonna 2006 ensimmäisen kerran alle 300 tapauksen. Maailmanlaajuisesti tilanne kuitenkin ei ole yhtä hyvä. Muun muassa Venäjällä ja Baltian maissa taudin esiintyvyys on pysynyt samana tai lisääntynyt. Matkailun lisääntyessä ja rajojemme vapautuessa tautitapaukset saattavat lisääntyä myös meillä. [5, s. 2232; 11.]



Kuva 1. Tuberkuloositapaukset Suomessa vuosina 1960 - 2000 [9]

### 2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis* -kompleksin bakteerit eläimissä

*M. tuberculosis* -bakteerin aiheuttaman avoimen tuberkuloosin voivat saada ihmisten lisäksi myös muun muassa kädelliset eläimet, norsut, marsut, kissat ja koirat. Naudoilla, hevosilla ja sialla infektiio pysähtyy yleensä muotoon, jossa on vain imusolmukemuutoksia. Naudoilla esiintyvän nautatuberkuloosin aiheuttajabakteeri on *M. tuberculosis* -kompleksin bakteeri *M. bovis*, joka aiheuttaa tavallisesti vaikean hitaasti etenevän sairauden. Myös muun muassa peurat, mäyrät, marsut, kanit, kissat ja koirat ovat herkkiä *M. bovis* -bakteerin aiheuttamalle tartunnalle. Suomessa nautatuberkuloositartunta on todettu viimeisen kerran vuonna 1982. Euroopan komissio on myöntänyt Suomelle virallisesti nautatuberkuloosivapaan maan aseman. Kyseistä bakteeria ei ole eristetty Suomessa muistakaan eläimistä vuoden 1982 jälkeen. [12, s. 80.]

Nautatuberkuloosia seurataan eläimille teurastuksen lihantarkastuksen yhteydessä tehtävässä ruhon ja elinten tarkastuksessa. Sitä tutkitaan myös keinosiemennyssonnien terveystarkastusohjelmassa ja eläinten tuontien sekä vientien yhteydessä. [12, s. 80.]

## 2.3 Ympäristömykobakteerit

Atyyppiset mykobakteerit ovat maaperässä, vesissä, ilmassa ja eläimissä esiintyviä mykobakteerilajeja, jotka voivat aiheuttaa muun muassa hengitystie-, imusolmuke-, iho- ja pehmytkudosinfektioita. Herkimpiä infektion saajia ovat ne eläimet ja ihmiset, joiden immuunipuolustus on heikentynyt. Atyyppiset mykobakteerit ovat rakenteeltaan ja värjäytyvyydeltään hyvin samankaltaisia kuin *M. tuberculosis*. Niitä on sekä hidas- että nopeakasvuisia. Suurin osa kuitenkin on nopeakasvuisia ja ne ovat yleensä vaarattomimpia. [7, s. 203 - 204; 13, s. 2240.]

Taudinaiheutuskyvyltään merkittävimmät atyyppiset mykobakteerit kuuluvat *M. avium* -kompleksiin, joka muodostuu *M. avium*- ja *M. intracellulare*-bakteereista. *M. avium* jakaantuu edelleen neljään alalajiin: *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium* ssp. *silvaticum* ja *M. avium* ssp. *hominisuis*. [1, s. 6.] *M. avium* -kompleksin bakteerit ovat yleisimpiä ihmisistä ja eläimistä Suomessa eristetyistä ympäristömykobakteerilajeista [12, s. 79]. Muita ihmiselle mahdollisesti tautia aiheuttavia mykobakteereita ovat myös muun muassa *M. malmoense*, *M. branderi*, *M. celatum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* ja *M. ulcerans* [7, s. 203].

Ympäristön mykobakteerien aiheuttamien infektioiden määrä on hieman kasvanut Suomessa. Tartuntojen lisääntymisen yhtenä syynä pidetään soiden ojittamista, jolloin vesistöjen mykobakteerimäärät ovat lisääntyneet. Mykobakteerit viihtyvät erityisesti happamissa luonnonympäristöissä. [12, s. 81.]

### 2.3.1 Ympäristömykobakteerit ihmisissä

Terveelle ihmiselle atyyppiset mykobakteerit pystyvät aiheuttamaan korkeintaan paikallisen infektion esimerkiksi ihoon tai imusolmukkeeseen, sillä normaali immuunivaste tuhoaa bakteerit tehokkaasti. Jos immuunipuolustus on puolestaan heikko, bakteerit tunkeutuvat suolen imusolmukkeisiin ja leviävät sieltä veren mukana eri puolille elimistöä. Eräs tärkeä riskitekijä on potilaan soluvälitteisen immunitetin vajaatoiminta, sillä se huolehtii atyyppisten mykobakteerien torjunnasta. Koska näiden bakteerien kanssa ollaan jatkuvasti kosketuksissa, immunitetti kehittyy ilman rokotuksiakin jo lapsuudesta lähtien. Atyyppisiä bakteereita on kuitenkin kaikkialla, joten infektiolta ei pysty

välttymään. Tartunnan voi saada jopa akvaariovedestä, minkä seurauksena on ihoinfektio. Atyypiset mykobakteerit ovat lääkeresistenssejä vaihtelevasti. Nopeakasvuiset mykobakteerit ovat melko herkkiä, kun taas hidaskasvuiset ja kliinisesti tärkeimmät lajit ovat usein täysin resistenssejä tuberkuloosilääkkeille ja lääkeyhdistelmille. [7, s. 204 - 205; 13, s. 2240.]

Atyypisen mykobakteerin aiheuttamaa infektiota potevan läheisillä ei ole suurentunutta infektoriskiä. Tartunta välittyy ympäristöstä hengitysteiden tai suoliston limakalvojen kautta tai ihonvaurion välityksellä. Tartuntalähdettä pystytään vain harvoin löytämään mykobakteerien hidaskasvuisuuden ja pitkän inkubaatioajan takia. [7, s. 204 - 205.]

### 2.3.2 Ympäristömykobakteerit eläimissä

Ympäristömykobakteereita on eristetty muun muassa sioista, koirista, kissoista, luonnonvaraisista linnuista, naudoista, akvaariokaloista ja hevosista. Kyseisistä eläimistä, paitsi akvaariokaloista, on yleisimmin eristetty *M. avium*-kompleksin bakteereita. [14, s. 9; 15, s. 235.]

Linnuille mykobakterioosia aiheuttavat sekä *M. avium* että *M. genevense*. Tauti on hitaasti kehittyvä, minkä seurauksena lintu laihtuu ja lopulta kuolee. [12, s. 82.]

Sioille mykobakterioosia aiheuttavat *M. avium*-kompleksin -infektiot pysähtyvät useimmiten imusolmukkeisiin. Yleistynyttä mykobakterioosia ei esiinny kuin harvoissa tapauksissa, jolloin tauti leviää imusolmukkeista muihin elimiin. Suomessa myös maksa- ja muita muutoksia on havaittu joistakin teurastamoihin tuoduista sioista. Mykobakteerien esiintymistä tutkitaan sioista lihantarkastuksen yhteydessä. Myös erilaisia infektiolähteitä on tutkittu, kuten muun muassa sioilla käytettäviä kuivikkeita. [16, s.159 - 160.]

Koirilla ja kissoilla *M. avium*-kompleksin aiheuttamat infektiot ovat yleensä paikallisia ihon mykobakteriooseja. Yleistynyt *M. avium*-infektio koirassa kehittyy kliiniseksi sairaudeksi hitaasti. Kliinisten oireiden ilmettyä tauti etenee kuitenkin nopeasti ja johtaa yleensä kuolemaan. Yleistyneet MAC-infektiot ovat kuitenkin harvinaisia, vaikka toisilla roduilla on huomattu olevan perinnöllistä taipumusta kyseisiin infektiioihin. Lisäksi sen on todettu olevan nuorten aikuisten koirien sairaus. MAC-infektion oireet ovat samankaltaisia sekä

ihmisillä että koirilla. Koirapotilas on useimmiten vaisu ja aneeminen, sillä on suurentuneet imusolmukkeet, perna ja maksa. [14, s. 9 - 12.]

*M. avium* ssp. *paratuberculosis* aiheuttaa pääasiassa märehitijöille paratuberkuloosin eli hitaasti kehittyvän suolistosairauden, jonka oireina ovat ripuli ja laihtuminen. Lopulta tauti johtaa eläimen kuolemaan. Herkimpiä taudille ovat nuoret eläimet, vaikka se esiintyy naudoilla vasta aikuisässä pitkän kehittymisajan takia. Tarttuminen tapahtuu muun muassa taudinkantajaeläinten ulosteista. Suomessa paratuberkuloosia on todettu vuosina 1992 - 2000 yhteensä viidessä lihanautakarjassa. [17, s. 16 - 18.] Paratuberkuloosibakteeria on eristetty myös muun muassa villikaneista ja ketuista [12, s. 81].

Sekä luonnon- että kasvatetuilla, makean- ja suolaveden kaloilla esiintyvä kalatuberkuloosi on tavallisimmin *M. marinum*-, *M. fortuitum*- tai *M. chelonae*-bakteerin aiheuttama. Tautia esiintyy eniten akvaariokaloilla, mutta myös ruokakaloiksi kasvatetuilla kaloilla. Akvaariokaloilla oireita ovat muun muassa voimakas anoreksia, evien rispaantuminen ja kalan värityksen muuttuminen. Tauti leviää parvissa sairaan yksilön erittämien bakteerien välityksellä, joten vähempiarvoiset akvaarioparvet tulisi hävittää eikä hoitaa. Tartunnan voi saada myös akvaarioita hoitava ihminen. Akvaariokalojen pienen koon vuoksi tuberkuloosidiagnoosi perustuu pääasiassa histopatologiaan, mutta isompia kaloja tutkittaessa myös ruumiinavauksessa voidaan todeta tyypillisiä vaaleita pesäkkeitä elimissä ja suorittaa bakteriologinen eristys. Akvaariokalojen tuonti Suomeen tapahtuu ilman valvontaa, minkä vuoksi infektoiduneiden kalojen ihmisiin tartuttamien tautitapauksien määrä saattaa kasvaa. Kuitenkin ihmisruumiin lämpötila on huomattavasti akvaariokalojen lämpötilaa korkeampi, joten bakteeri voi lisääntyä ihmisessä vain uloimmissa osissa (sormissa ja käsivarsissa). [15, s. 235 - 238.]

## 2.4 Mykobakteeridiagnostiikka

Perinteisiä mykobakteerioosien laboriodiagnostiikan menetelmiä ovat värjäys ja viljely. Näyte esikäsitellään muiden bakteerien tuhoamiseksi ennen viljelyä. Hitaan kasvun takia mykobakteerien viljely ja lajinmääritys kestävät useita viikkoja, mikä on laboriodiagnostiikan keskeisin ongelma. Värjäys on yksi nopeimpia menetelmiä, mutta sen puutteena on muun muassa huono herkkyys. Molekyylibiologiaan perustuvilla menetelmillä on kuitenkin pystytty nopeuttamaan mykobakteeridiagnostiikkaa. Lisäksi viljelyä on

pystytty nopeuttamaan nestemäisillä elatusaineilla ja kasvuautomaateilla. [2, s. 439; 5, s. 2233.]

#### 2.4.1 Näytteet

Eviraan tulleet näytteet ovat kokonaisia eläimiä, niiden elimiä tai eritteitä. Lisäksi paratuberkuloositutkimuksiin tulee veri- ja ulostenäytteitä. Teurastamoiden tarkastuseläinlääkärit, praktikko- ja patologi-eläinlääkärit lähettävät kudokset tai eritenäytteitä Eviraan epäillessään mykobakteeri-infektiota eläimessä. Tutkimuksissa pyritään ottamaan kudoksenäytteestä kohta, jossa on nähtävissä mahdollisia muutoksia. Näytteitä käsitellään aina varoen niiden mahdollisen patogeenisuuden varalta. [5, s. 2233.]

#### 2.4.2 Värjäys

Mykobakteeri-infektiota epäiltäessä tutkitaan, onko näytteessä haponkestäviä sauvabakteereita. Näytepreparaattiin laitetaan väriainetta, joka tunkeutuu kaikkiin bakteereihin. Useimmiten väriaineena käytetään karbolifuksiineja tai fluorokromeja. Tämän jälkeen näyte käsitellään hapon ja alkoholin seoksella, joka poistaa värin tavallisista bakteereista. Mykobakteerien soluseinän mykolihapot estävät väriaineen liukenemisen kyseisessä käsittelyssä, jolloin ainoastaan haponkestävät bakteerit säilyvät värjäytyneinä. [2, s. 439; 5, s. 2233 - 2234.]

Yksi käytetyin karbolifuksiinimenetelmä on Ziehl-Neelsen-värjäys, jossa happoalkoholihuuhtelun jälkeen tehdään vastavärjäys malakiittivärjäysliuoksella. Mikroskopoinnissa on tällöin käytettävä suurta suurennusta, joten yhden näytteen tutkiminen vie paljon aikaa. Käyttämällä fluoresoivia väriaineita (auramiini, akridiini), voidaan käyttää paljon pienempiä suurennuksia ja mikroskopoinnin vaatima aika on paljon lyhyempi kuin edellisessä menetelmässä. Tällöin preparaattia tarkastellaan fluoresenssimikroskoopilla. [2, s. 439; 5, s. 2233 - 2234.]

Mykobakteerien tunnistaminen pelkästään värjäyksellä on mahdotonta. Värjäyksen herkkyys on huono (noin  $10^4$  bakteeria millilitrassa näytettä) eikä sillä myöskään kyetä erottelemaan eri mykobakteerilajeja toisistaan. Solujen koon ja muodon perusteella voi tehdä vaan suuntaa-antavia johtopäätöksiä. Epäluotettavuutta saattavat aiheuttaa myös mikrobilääkkeet, jolloin haponkestävienkin bakteerien värjäytyvyys voi vaihdella. [2, s. 439.]

### 2.4.3 Viljely

Viljely on yksi tärkeimpiä menetelmiä mykobakteeridiagnostiikassa. Se on huomattavasti herkempi menetelmä kuin värjäys ja se mahdollistaa värjäyksessä todettujen haponkestävien sauvojen tunnistamisen, lääkeaineherkkyyksien määrittämisen sekä mykobakteerien epidemiologisen seurannan ja tartuntareittien selvittelyn. Näytetyypistä ja viljelymenetelmästä riippuen positiivisen tuloksen saamiseen riittää 10 - 100 bakteeria millilitraa kohden. [2, s. 439; 5, s. 2235.]

Hitaan kasvunopeuden vuoksi mykobakteerit peittyvät useimmiten normaaliflooran eli muiden tavallisten bakteerien alle. Tästä syystä mahdollisesti kontaminoituneet ja normaaliflooraa sisältävät näytteet (esimerkiksi yskös) käsitellään erilaisilla happo-, emäs- ja detergenttikäsittelyillä muiden bakteerien tuhoamiseksi eli näyte dekontaminoidaan. Näytteen mykobakteerien vahingoittamista pyritään välttämään, joten käsittelyajat säädetään tarkasti. [2, s. 439; 5, s. 2235.]

Elatusaineina käytetään sekä kiinteitä että nestemäisiä elatusaineita. Eräs mykobakteeriviljelyksissä käytetty kiinteä elatusaine on modifioitu Löwenstein-Jensen-elatusaine, joka on hyvä yleiselatusaine kaikille mykobakteereille. [5, s. 2235.] Kyseisiä elatusaineputkia on Eviralla käytössä kahdenlaisia, Oriolan Mycobacterium 1 (M<sub>1</sub>) ja Mycobacterium 2 (M<sub>2</sub>). Mycobacterium 1 elatusaineputki sisältää glyserolia kun taas Mycobacterium 2 sisältää palorypälehappoa.

Mykobakteereja kasvatetaan tavallisimmin +35 - 37 C°:ssa. Poikkeuksena kuitenkin vaihtolämpöisistä eläimistä kuten esimerkiksi kaloista eristetyt mykobakteerit, joita kasvatetaan +30 C°:ssa. Monien mykobakteerien kasvua voidaan nopeuttaa 5 - 10 prosentin hiilidioksidilisällä. Kasvatusta jatketaan kolmen kuukauden ajan, minkä aikana niitä tarkastellaan yleensä viikon välein. Jos kyseessä on kuitenkin voimakas epäily tai kalanäyte, kasvatetaan näytteitä mahdollisesti pidempään. [2, s. 439; 5, s. 2236.]

### 2.4.4 Lajinmääritys

Alustavaa tietoa mykobakteereista saadaan kasvunopeuden, kasvulämpötilojen, pesäkemorfologian ja värinmuodostuksen perusteella. Tarkempi lajinmääritys tapahtuu tavallisimmin nykyään molekyylibiologisilla menetelmillä, jotka ovat vähitellen syrjäyttäneet ennen käytetyt biokemialliset menetelmät.

Molekyylibiologisilla menetelmien avulla tunnistus on entistä nopeampaa ja helpompaa. [2, s. 439; 5, s. 2236.]

DNA-hybridisaatioon perustuvan AccuProbe-testin (Gen-Probe) avulla voidaan tunnistaa *M. avium*, *M. avium* -kompleksi, *M. tuberculosis* -kompleksi, *M. intracellulare*, *M. gordonae* ja *M. kansasii* [18]. Testi perustuu komplementaaristen nukleohappojuosteiden kykyyn yhdistyä ja muodostaa pysyvä kaksoisjuoste. Chemiluminescent-merkatut yksijuosteiset DNA-koettimet hybridisoituvat bakteereista vapautetun ribosomaalisen RNA:n kanssa ja muodostavat pysyvän DNA-RNA-hybridin. Merkatut DNA-RNA-hybridit mitataan Gen-Probe luminometrilaitteella. Testi on nopea ja helppo tehdä. Tämän testin heikkoutena on se, että kaikille kliinisesti merkittävälle mykobakteereille ei ole koettimia.

Kehittyneempi versio DNA-koettimista on liuskahybridisaatiotesti, jossa yhteen liuskaan on liitetty koettimet useamman mykobakteerilajin tunnistamiseen. Lajimääritys kitin avulla perustuu kolmeen päävaiheeseen. Ensimmäiseksi DNA eristetään kasvaneesta mykobakteerista. Tämän jälkeen tutkittavan mykobakteerin DNA monistetaan PCR-tekniikalla. Lopuksi hybridisaation avulla saadaan selville bakteerin laji antamalla tuotteen hybridisoitua testiliuskalla olevien koettimien kanssa, jolloin positiivinen tulos saadaan näkyviin värireaktion avulla. Testin suorittaminen vie enemmän aikaa ja sisältää enemmän työvaiheita kuin yksittäiset DNA-koettimet. Se on kuitenkin huomattavasti herkempi monistusvaiheen johdosta. Liuskahybridisaatiomenetelmään perustuvia testejä ovat muun muassa Hain Lifescience -yrityksen GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM (13 lajia) ja GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium AS (16 lajia) ja GenoType<sup>®</sup> MTBC (erottelee *M. tuberculosis* -kompleksin bakteerilajit) sekä Innogenetics-yrityksen Inno-Lipa Mycobacteria v2 (16 lajia) [20]. Lisäksi on olemassa GenoType<sup>®</sup> Mycobacteria Direct -testi (Hain Lifescience), jolla voidaan suoraan potilasnäytteestä tunnistaa 5 mykobakteerilajia [19].

Lajinmääritys voidaan suorittaa myös sekvensoinnin avulla. Tällöin selvitetään mykobakteerin 16S rRNA:ta koodaavan geenin emäsjärjestys. Tällä alueella ovat jokaisella mykobakteerilajilla toisistaan eroavat DNA-sekvenssit. Tutkittavasta kohteesta eristetty DNA monistetaan ensin PCR:llä, jonka jälkeen tuotteen emäsjärjestys selvitetään sekvensoimalla. Tämän jälkeen saatua geenisekvenssiä verrataan tietokannassa oleviin tun-



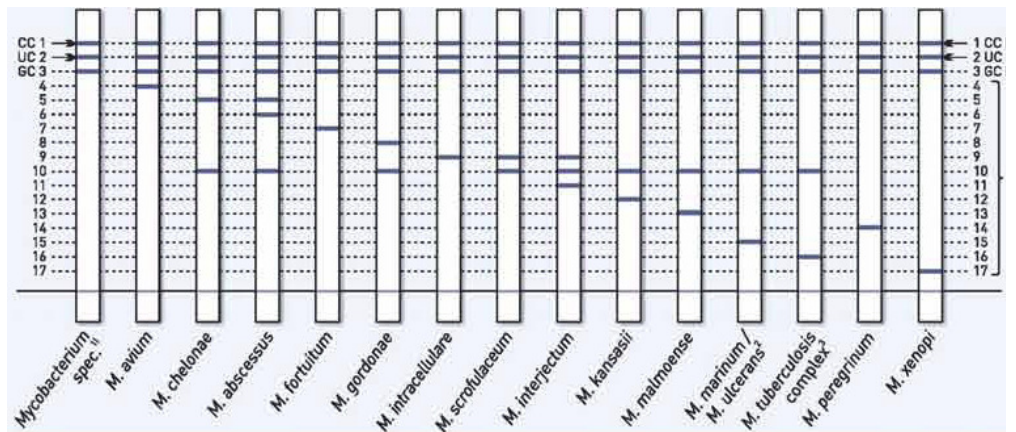
nettujen mykobakteerilajien sekvensseihin. Sekvensointi vaatii kalliit laitteistot ja osaavat ihmiset. Sen avulla pystytään tutkimaan myös tavallisissa elatusaineissa kasvamattomia mykobakteereja. Mykobakteerien diagnostiikkaan on kehitetty myös DNA-mikrosiru, jolla saadaan tunnistettua kaikki tunnetut mykobakteerilajit ja tärkeimmät lääkeresistenssiä aiheuttavat mutaatiot. Toistaiseksi näitä tosin käytetään vain tutkimustarkoituksiin. [5, s. 2237.]

## 2.5 Liuskahybridisaatiotesti

### 2.5.1 Yleistä

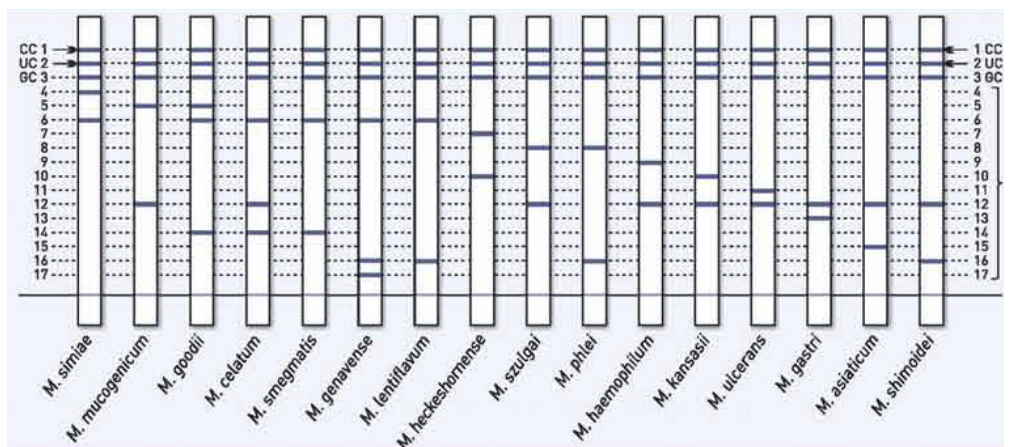
Hain Lifescience -yritykseltä on saatavissa neljänlaisia liuskahybridisaatiomenetelmään perustuvia mykobakteereja tunnistavia kittejä: GenoType<sup>®</sup> Mycobacteria Direct, GenoType<sup>®</sup> MTBC (*Mycobacterium tuberculosis* Complex), GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium AS (Additional Species) ja työssä käytetty GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM (Common Mycobacteria). GenoType<sup>®</sup> Mycobacteria Direct -kitillä voidaan tunnistaa suoraan potilaan näytteestä viisi merkittävintä mykobakteerilajia, jotka ovat *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense* ja *M. tuberculosis* -kompleksi. GenoType<sup>®</sup> MTBC -testillä puolestaan voidaan tunnistaa *M. tuberculosis* -kompleksin bakteerit viljelystä materiaalista. [20.]

GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium AS ja GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM ovat toisiinsa täydentäviä menetelmiä, joissa molemmissa on koettimet eri lajien tunnistamiseen. Molemmat menetelmät sisältävät kuitenkin samat vaiheet. GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -testin liuskoihin on liitetty koettimet seuraavien mykobakteerilajien tunnistamiseen: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* -kompleksi ja *M. xenopi* (kuva 2). Kyseiset lajit ovat kliinisesti merkittäviä. [19.]



Kuva 2. GenoType® Mycobacterium CM -kitillä tunnistettavat mykobakteerilajit [21]

GenoType® Mycobacterium AS -kitillä pystytään tunnistamaan 16 ei-tuberkuloosi-mykobakteerilajia, joita ovat *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai* / *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* ja *M. shimoidei* (kuva 3). [21; 22.]



Kuva 3. GenoType® Mycobacterium AS -kitillä tunnistettavat mykobakteerilajit [21]

Mykobakteerien tunnistamiseen on saatavilla myös Inno-Lipa Mycobacteria v2 -testi (Innogenetics). Kyseisellä kitillä voidaan tunnistaa 16 mykobakteerilajia: *M. tuberculosis* -kompleksi, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. goodii*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* ja *M. ulcerans*, *M. celatum*, *MAIS*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae* -kompleksi, *M. fortuitum* -kompleksi ja *M. smegmatis*. [22.]

Inno-Lipa- ja GenoType Mycobacterium -menetelmiä arvioitiin Mäkisen ym. tutkimuksessa, jossa tutkimuskohteena toimivat 81 suomalaispotilaasta eris-

tettyä mykobakteerikantaa. Inno-Lipa tunnisti oikein 89,4 % 66 eristetyistä kannasta, kun taas GenoType tunnisti oikein 95,1 % 81 kannasta. Tutkimuksessa vertailtiin näiden kahden testin taloudellista kannattavuutta, helppokäyttöisyyttä ja tulosten tulkitsemista. PCR-monistuksessa Inno-Lipa-menetelmällä oli ongelmia kolmen *M. chelonae* -kannan kanssa ja GenoType-menetelmällä *M.intracellulare* -kannan kanssa. Molemmat antoivat kielteisen tuloksen, vaikka eri menetelmät ja toinen testeistä tunnisti kannat oikein. Inno-Lipa epäonnistui lisäksi kahden *M.intracellulare*- ja kahden *M.scrofulaceum* -kannan tunnistuksessa. Myöskään GenoType-menetelmällä ei kyseisten *M. intracellulare* -kantojen tunnistamisessa onnistuttu. Mukaan luettuna PCR-negatiivinen kanta GenoType-menetelmällä epäonnistuttiin kolmen *M. intracellulare* -kannan ja yhden *M. avium* -kannan tunnistamisessa. [23, s. 3478 - 3479.]

Inno-Lipa-testissä on muiden kontrollien lisäksi hybridisaatiolämpötilakontrolli, jonka mukaan lämpötila oli yleensä liian alhainen. Tämä ei kuitenkaan johtanut vääriin tunnistuksiin. Tulosten perusteella molemmat menetelmät ovat nopeita, luotettavia ja helppoja suorittaa. Inno-Lipa-menetelmällä on kuitenkin tiukemmat olosuhdevaatimukset. Tämä tulee ongelmaksi varsinkin useita näytteitä tehdessä. Lämpötila ei pysy optimaalisena, sillä menetelmässä on paljon pipetoimisvaiheita. Huolimatta siitä, että GenoType-menetelmän liuskoissa ei ole hybridisaatiolämpötilakontrollia, myös kyseisen menetelmän liuskoihin voi muodostua useita vääriä viivoja hybridisaatiolämpötilan ollessa liian alhainen. Tutkimuksen mukaan GenoType-menetelmä on sopivampi menetelmä mykobakteerien tunnistamiseen Suomessa laajemman lajivalikoiman, pienempien reaktio-olosuhdevaatimusten, taloudellisen kannattavuuden ja paremman suorituskyvyn takia. [23, s. 3479 - 3481.]

Myöhemmin tehtiin samankaltainen Sarkolan ym. tutkimus, jossa kerättiin mykobakteerieristystä kuuden kuukauden ajalta. GenoType toimi osana rutiinidiagnostiikkaa, jossa aluksi eristykset tunnistettiin AccuProbe-menetelmällä ja negatiiviset tunnistettiin sekvensoinnilla. GenoType tunnisti 178 tapauksesta 150 oikein eli 89,3 %. Tämä oli hieman vähemmän kuin edellisessä tutkimuksessa (noin 95 %). Väärän tuloksen antoivat 19 tapaus-ta. Näistä yhdeksää testi ei tunnistanut muuta kuin mykobakteerisukutasolla (yksi *M. gordonae*, neljä *M. intracellulare* ja neljä *M. fortuitum* eristystä). Kaksi eristystä reagoi sekä *M. avium*- että *M. intracellulare* -spesifisten koet-

timien kanssa. Yksi *M. palustre* -kanta ja kolme *M. lentiflavum* -kanta pysyivät negatiivisina. Tutkimuksen mukaan lajinsisäiset vaihtelut geeneissä ovat mahdollisia, mikä saattaa johtaa vääriin tuloksiin. *M. scrofulaceum* -koettimen epäspesifisyydestä johtuen kaksi *M. interjectum* -kanta ristireagoivat kyseisen koettimen kanssa. Ristireaktion antoi myös yksi sellainen kanta, jota kyseisellä kitillä ei pysty tunnistamaan. Lisäksi *M. mycogenicum* -kanta antoi positiivisen hybridisaatiotuloksen *M. fortuitum* -koettimen kanssa. Tämä saattoi johtua siitä, että *M. mycogenicum* ja *M. fortuitum* kuuluvat samaan kompleksiin ja näin ollen niillä saattaa olla samanlainen nukleotidisekvenssi kyseisellä tunnistuskohdalla. [24, s. 642 - 644.]

Eräs kiinnostava asia tutkimuksessa havaittiin *M. tuberculosis* -kompleksin kohdalla. GenoType havaitsi 12 kantaa *M. tuberculosis* -kompleksiksi, vaikka AccuProbe antoi kielteisen tuloksen. Sekvensoinnin avulla kyseiset eristykset varmistettiin. Kun viisi päivää myöhemmin eristystä tunnistettiin uudelleen AccuProbe-testillä, se tunnisti ne oikein. Näin ollen GenoType-testin todettiin olevan herkempi kuin AccuProbe, kun kyseessä on *M. tuberculosis* -kompleksi. Myös kyseisen tutkimuksen perusteella GenoType on nopea ja luotettava menetelmä tunnistettaessa mykobakteerieristystä potilaista. Testi soveltuu myös hyvin käytettäväksi ruutinilaboratorioon. Tutkimuksen tehnyt Suomen mykobakteerireferenssilaboratio otti GenoType-menetelmän osaksi rutiinidiagnostiikkaa. Sekvensoinnin avulla kuitenkin tutkitaan jatkossakin ne eristykset, jotka antoivat negatiivisen tai epäselvän tuloksen GenoType-menetelmällä. [24, s. 642 - 644.]

### 2.5.2 GenoType® Mycobacterium CM (Hain Lifescience)

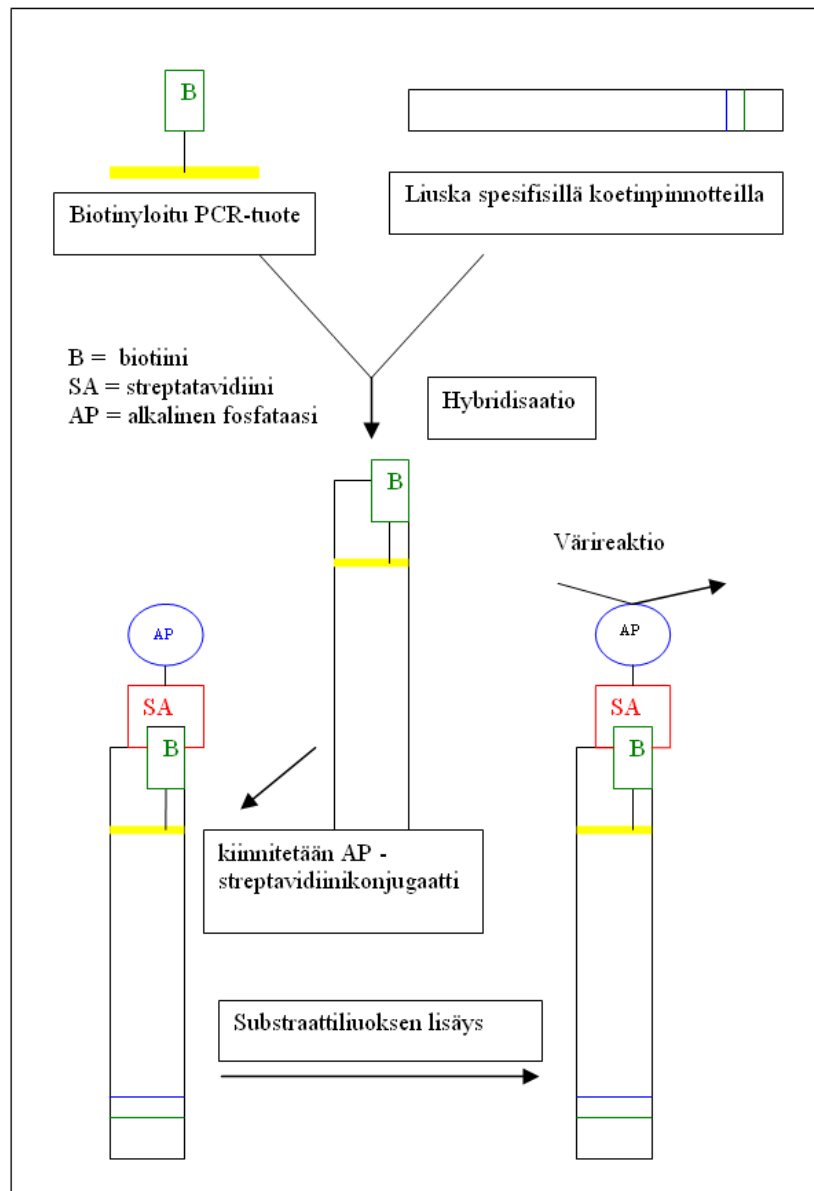
GenoType® Mycobacterium CM -kitin avulla lajinmääritys perustuu kolmeen päävaiheeseen. Ensimmäiseksi DNA eristetään viljellystä materiaalista. Tämän jälkeen DNA monistetaan PCR:llä, jossa käytetään biotinyloitua alukkeita. Lopuksi käänteisen hybridisaation avulla saadaan selville bakteerin laji. Hybridisaatio sisältää seuraavat vaiheet: monistetun tuotteen kemiallinen denaturaatio, monistetun yksijuosteisen biotiinileimatun tuotteen hybridisaatio membraaniin sidottuihin koettimiin, stringent-pesu, streptavidini/alkalinen fosfataasi (AP) -konjugaatin lisäys ja AP:n välittämä värireaktio. Templaatin avulla luetaan ja tulkitaan saatu viivakuvio. [5; 25, s. 16.]

Tulosten tulkinta perustuu värireaktioihin. Liuskaan mahdollisesti muodostuvat kolme ensimmäistä viivaa ovat kontrolliviivoja. Ensimmäinen viiva on

konjugaattikontrolli (CC), joka kertoo konjugaatin sitoutumisen tehokkuudesta ja substraattireaktiosta. Tämän viivan tulee olla jokaisessa liuskassa, vaikka kyseessä ei olisikaan mykobakteeri. Vyöhykkeen kaksi yleinen kontrolli (UC) havaitsee kaikki tunnetut mykobakteerit ja gram-positiiviset bakteerit, joilla on korkea G + C pitoisuus. Jos liuskaan muodostuu sekä yleisen kontrollin että konjugaattikontrollin viiva muiden viivojen täsmäämättä kuitenkaan tulkintataulukon viivayhdistelmiin, pitää kyseinen bakteerilaji selvittää muilla menetelmillä. Ainoastaan ne viivat, jotka ovat suunnilleen yhtä vahvoja tai vahvempia kuin UC-viiva, tulee ottaa huomioon. Kohdalle kolme muodostuva sukukontrolli (GC) -viiva kertoo mykobakteerisuvun jäsenen läsnäolon. Viivan intensiteetti riippuu mykobakteerilajista. Sukukontrolliviiva voi jäädä pois huolimatta mykobakteerin DNA:n läsnäolosta. Jos kuitenkin lajispesifisten vyöhykkeiden viivoja ilmaantuu, monistumisreaktio on edennyt kunnolla ja testin tulokset ovat voimassa. Muut vyöhykkeet ovat spesifisiä koettimia, joiden avulla tunnistetaan mykobakteerilaji. Viivayhdistelmien tulkintataulukko on liitteenä 1 [25]. Kitin mukana tulee erityinen arviointipaperi (liite 2), jonka merkatut CC ja UC kohdat kohdistetaan kehittyneen liuskan vastaaville kohdille. Värireaktiot kirjataan ylös ja niiden perusteella tiedetään mykobakteerilaji. Jokaisella liuskalla on yhteensä 17 reaktioaluetta. [25, s. 22 - 23.]

### 2.5.3 Värireaktio

GenoType-menetelmässä mykobakteerien tunnistaminen tapahtuu värireaktion avulla (kuva 4). Monistettu tuote on leimattu biotiinilla, johon sitoutuu spesifisesti ja tiukasti streptavidini-proteiini. Streptavidiniin on liitetty eli konjugoitu entsyymi, alkalinen fosfataasi (AP). Liuskaa uitetaan streptavidini-AP-konjugaattia sisältävässä liuoksessa, jolloin fosfataasi sitoutuu streptavidiniin välityksellä tiukasti tuotteessa olevaan biotiiniin. Havaitsemisreaktio tapahtuu lisäämällä liuokseen AP-entsyymien substraattia, jolloin tapahtuu värireaktio. [26.]



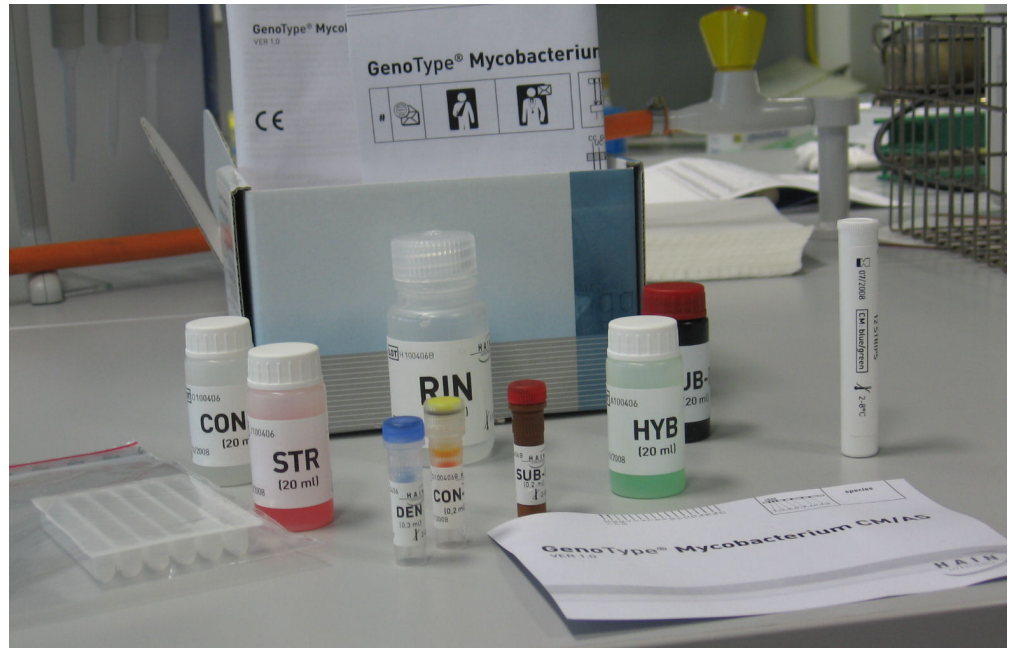
Kuva 4. Streptavidini / alkalinen fosfataasi -värireaktio [26]

### 3 KOKEELLINEN OSA

#### 3.1 Tausta ja tavoitteet

Eviraan tulleista normaalidiagnostiikan mykobakteeriposiivisista näytteistä yli 95 prosentista löytyy *M. avium* -bakteeri, jonka tunnistamiseen käytetään AccuProbe-kittiä. Osa näytteistä, varsinkin kalanäytteet, sisältävät kuitenkin myös muita mykobakteerilajeja. Tavoitteena oli löytää AccuProbe-testiä täydentävä menetelmä, jolla saataisiin nimi useammalle mykobakteerilajille. Työhön valittiin lajirunsauden ja kliinisesti merkittävien lajien tunnistamiskyvyn perusteella Hain Lifescience GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -kitti. Tavoitteena oli ensiksi saada kaupallinen Mycobacterium CM -kitti (kuva 5)

toimimaan *M. avium* ATCC 25291 -bakteerilla. Tämän jälkeen kokeiltiin toimivuutta eläimistä eristetyillä 16 näytekannalla sekä *M. intracellulare* ATCC 13950- ja *M. tuberculosis* ATCC 25177 -kannoilla. Näin saatiin tietoa kitin toimivuudesta käytännössä.



Kuva 5. Hain Lifescience GenoType® Mycobacterium CM -kitti

Työvaiheet suoritettiin GenoType® Mycobacterium CM -kitin ohjeen mukaisesti, jota tarkennettiin myös työn edetessä (liite 3).

## 3.2 Aineisto ja menetelmät

### 3.2.1 Kantojen viljely

Työssä käytettiin sekä ATCC-kantakokoelman että eläinnäytteistä eristettyjä kantoja, joista muut kuin *M. avium* ssp. -kannat oli tunnistettu Kuopion kansanterveyslaitoksella ja Kuopion yliopistollisen sairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. *M. avium* ssp. -kannat oli puolestaan tunnistettu Evirasassa AccuProbe-testillä. Kaikkia kantoja säilytetään -70 °C:n pakastimissa glyseroliseerumilihalientä sisältävissä putkissa. ATCC-kantoja käytetään myös muissa töissä, jonka vuoksi ne oli viljelty jo valmiiksi kasvatusputkiin ja niitä pidettiin +37 °C:n lämpökaapissa. Työssä käytettiin *M. avium* ATCC 25291-, *M. intracellulare* ATCC 13950- ja *M. tuberculosis* ATCC 25177 -kantoja. *M. tuberculosis* ATCC -kanta oli avirulentti eli tautia aiheuttamaton.

Eviran mykobakteerikantakokoelmasta etsittiin työhön sopivia eläinkantoja. Työhön pyrittiin ottamaan mukaan kaksi kantaa jokaista kitille sopivaa bakteeria, mutta osasta löytyi vain yksi. Lisäksi mukaan otettiin interkalibrointi-näyte, joka tuli Eviraan työn aikana (taulukko 1). Näin saatiin tutkittavaksi aito tilanne, jossa ei tiedetty bakteerin nimeä etukäteen.

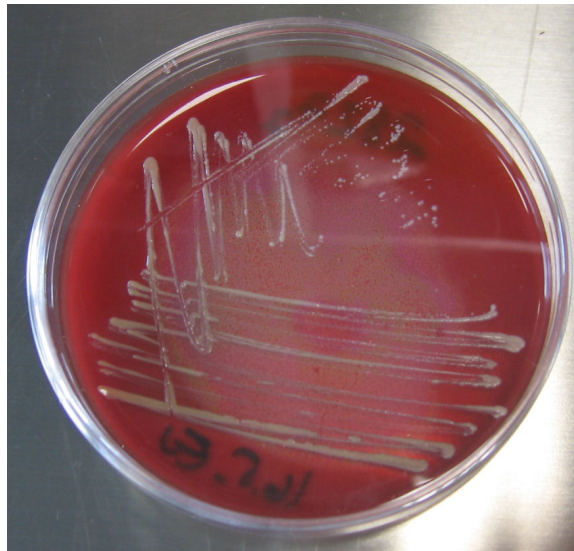
Taulukko 1. Työssä käytetyt eläin- ja ATCC-kannat

Nro työssä	Pakastus nro	Bakteeri nro	Bakteeri	Eläinlaji
1	1089	4186 <sub>2</sub> /00	<i>M. fortuitum</i>	Nauta
2	1385	3131 <sub>2</sub> /01	<i>M. fortuitum</i>	Nauta
3	1289	563 <sub>1</sub> /01	<i>M. scrofulaceum</i>	Kiekkokala
4	1711	1843 <sub>6</sub> /03	<i>M. scrofulaceum</i>	Nauta
5	1850	515 <sub>1</sub> /05	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	Sika
6	1852	5835 <sub>1</sub> /04	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	Sika
7	1474	2628 <sub>1</sub> /02	<i>M. interjectum</i>	Nauta
8	1423	1637 <sub>1A</sub> /02	<i>M. marinum</i>	Seeprakala
9	1748	3551 <sub>2</sub> /03	<i>M. marinum</i>	Kala
10	1439	3112 <sub>6</sub> /01	<i>M. xenopi</i>	Nauta
11	53	3585/92	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. triviale</i>	Kala
12	609	4085 <sub>1</sub> /99	<i>M. chelonae</i>	Sinirihmakala
13	1676	6077 <sub>1</sub> /02	<i>M. malmoense</i>	Nauta
14	1732	1848 <sub>2</sub> /03	<i>M. malmoense</i>	Nauta
15	1434	3120 <sub>2</sub> /01	<i>M. fortuitum</i>	Nauta
16	1597	4937 <sub>1</sub> /02	<i>M. gordonae</i>	Nauta
17		ATCC 13950	<i>M. intracellulare</i>	
18		ATCC 25177	<i>M. tuberculosis</i> , avirulentti	
19		2827 <sub>7</sub> /07	Defra* interkalibrointi-näyte	
		ATCC 25291	<i>M. avium</i>	

\*Department for Environment Food and Rural Affairs

Viljelyt tehtiin laminaarikaapissa suojakäsineet kädessä. Jäähymää viljeltiin noin 10 µl:n silmukallinen sekä M<sub>1</sub>- että M<sub>2</sub>-vinopinnoille. Kalakannoista viljeltiin kahdet M<sub>1</sub>- ja M<sub>2</sub>-putket, jotta ne voitiin laittaa kahteen eri lämpötilaan. Kalakannat kasvavat useimmiten paremmin alhaisemmassa lämpötilassa kuin muut mykobakteerit, mutta kahdella eri lämpötilalla varmistettiin hyvä kasvu ainakin toisessa lämpötilassa. Kaikki muut kuin kalakannat laitettiin +37 °C:n lämpökaappiin. Kalakannoista toinen putki laitettiin +37 °C:n ja toinen +30 °C:n lämpökaappiin. Interkalibrointinäyte kasvoi valmiiksi verimaljalla, joten sitä ei tarvinnut viljellä (kuva 6).





Kuva 6. Interkalibrointinäyte verimaljalla

Mykobakteerien pitkän kasvuajan vuoksi kantoja tarkasteltiin useaan otteeseen. Kun viljelystä oli kulunut noin viisi viikkoa, katsottiin bakteerimassaa olevan riittävästi työtä varten. Putkia tarkasteltiin ja kirjattiin ylös bakteeripesäkkeiden ulkonäkö (koko, pigmentti), kasvutapa ja määrä (kuva 7). M<sub>1</sub>- ja M<sub>2</sub>-putkista valittiin vain paremmin kasvanut putki työtä varten. Päädyttiin valitsemaan yhtenäisesti kaikista M<sub>1</sub>-putki. Kahdessa eri lämpötilassa kasvanneista kalaputkista valittiin paremmin kasvanut. Taulukon 1 kannoista nro 3, 8 ja 9 valittiin +30 °C:n lämpötilassa kasvaneet M<sub>1</sub>-putket. Kannoista nro 11 ja 12 valittiin puolestaan +37 °C:n lämpötilassa kasvaneet M<sub>1</sub>-putket.



Kuva 7. Putkissa viljeltyjä mykobakteerikantoja

### 3.2.2 DNA-eristys

*M. avium* ATCC 25291- ja *E. coli* -bakteerien DNA-eristyksen aikana käytettiin suojavarusteina ainoastaan kertakäyttöhihasuojia ja -käsineitä. Eläinkantoja ja muita ATCC-kantoja eristettäessä puolestaan käytettiin edellisten lisäksi myös hengityssuojainta. Kaikkien kantojen aikana työskenneltiin laminaarikaapissa. Näin välttyttiin riskiltä kontaminoida näytteitä ja saamasta itse tartuntaa. DNA-eristys suoritettiin aluksi vain *M. avium*- ja *E. coli* -bakteereille alkutestauksia varten. Tällöin suoritettiin PCR myös samana päivänä. Eläinkantoja tehdessä kaikki vaiheet suoritettiin eri päivinä.

DNA-eristys perustui kolmeen vaiheeseen. PCR-veteen suspensoitua bakteerimassaa sisältäviä eppendorf-putkia inkuboitiin +95 °C:n lämpöblokkissa, jolloin bakteerit tapettiin ja solujen hajoitus aloitettiin. Tämän jälkeen putket siirrettiin ultraäänihauteeseen, jossa bakteerien vahvaa seinämärakennetta hajoitettiin lisää. Lopuksi kaikki ylimääräinen sentrifugoitiin putkien pohjalle, jolloin saatiin DNA supernatanttiin. Koska DNA-liuokset haluttiin säästää myöhempää käyttöä varten, ne siirrettiin aina uuteen eppendorf-putkeen ja pakastettiin -20 °C:ssa.

### 3.2.3 PCR

PCR suoritettiin Eviran työmenetelmien mukaisesti. Mastermix-liuos tehtiin erillisessä laboratorioissa laminaarikaapissa, jossa käytettiin kontaminaatioiden estämiseksi kertakäyttökäsineitä ja -hihasuojia. Näytteenlisäys tapahtui toisessa laboratorioissa erillisessä näytteenlisäyslaminarissa.

PCR-vaihetta varten kitin mukana tuli aluke (biotinyloitu) / nukleotidiseos (PNM-liuos). Puskurina käytettiin Finnzymesin MgCl<sub>2</sub> sisältävää 10 x puskuria DyNAzyme DNA-polymerasille ja entsyyminä DyNAzyme DNA-polymeraasia (2U/μl). PNM-liuos, puskurin, entsyymin ja PCR-vesi pipetoitiin eppendorf-putkeen, josta tätä Mastermixiä jaettiin yhtä moneen putkeen kuin oli näytteitä. Lopuksi lisättiin näyte. Näytteet sentrifugoitiin putken pohjalle ja siirrettiin PCR-laitteeseen. Saadut PCR-tuotteet siirrettiin -20 °C:n pakastimeen ohjelman loputtua.

### 3.2.4 Hybridisaatio

Hybridisaatiovaihetta varten kitti sisälsi muoviset kaivot ja 12 kalvoliuskaa, joissa oli spesifiset koetinpinnoitteet. Lisäksi mukana olivat seuraavat reagenssit: denaturaatioliuos (DEN), hybridisaatioliuos (HYB), Stringent-pesuliuos (STR), Rinse-pesuliuos (RIN), konjugaattikonsentraatti (CON-C), konjugaattipuskuri (CON-D), substraattikonsentraatti (SUB-C) ja substraattipuskuri (SUB-D). Hybridisaatiovaihe tehtiin laminaarikaapissa käyttäen kertakäyttökäsineitä ja -hihasuojia.

Kaivoihin lisättiin aluksi näyte ja denaturaatioliuosta (DEN), jolla denaturoitiin monistettu DNA kemiallisesti huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen joukkoon lisättiin esilämmitettyä hybridisaatiopuskuria (HYB) ja merkatut liuskat. Kaivot siirrettiin +45 °C:n sekoittavaan lämpöhauteeseen, jolloin tapahtui monistettujen yksijuosteisten biotiinileimattujen tuotteiden hybridisaatio membraaneihin sidottuihin koettimiin. Edelliset liuokset poistettiin ja liuskat pestiin esilämmitetyllä Stringent-pesuliuksella (STR) +45 °C:n lämpötilassa sekoittavassa lämpöhauteessa. Tästä eteenpäin kaikki vaiheet suoritettiin huoneenlämpötilassa ja aineiden vaikutusajan kaivoja sekoitettiin sekoittavalla lavalalla. Liuskat pestiin vielä Rinse-liuoksella (RIN), jonka jälkeen lisättiin streptavidini/alkalinen fosfataasi -konjugaattia (KON-C/KON-D). Konjugaatti pestiin pois huuhtomalla kahteen kertaan Rinse-liuoksella ja kerran tislattulla vedellä. Lopuksi kaivoihin lisättiin substraattia, jolloin tapahtui streptavidini / alkalinen fosfataasi -konjugaatin välittämä värireaktio. Substraattiliuos on herkkä valolle, joten laminaarikaapista sammutettiin reaktion ajaksi valot ja kaivot suojattiin foliolla. Värireaktio keskeytettiin halutulla kohdalla huuhtomalla liuskat pariin kertaan vedellä.

Hybridisaatiovaihe vaati eniten työn aikana säätämistä. Oikeanlaisten olosuhteiden aikaansaamiseksi ilman kitin valmistajan ravistelevaa lämpöhaudetta tehtiin erilaisia kokeiluja. Lisäksi substraatin vaikutusajan vaikutusta seurattiin. Ensimmäisissä kitin koeajoissa sekä ATCC- että eläinkannoilla substraatin vaikutusaika vaihteli silmämääräisten havaintojen perusteella. Reaktio keskeytettiin, kun katsottiin viivojen olevan silmämääräisesti hyviä eikä tausta ollut kovin tummunut. Substraatin vaikutusaikaa alettiin kuitenkin seurata, kun huomattiin viivoja puuttuvan, niitä oli liikaa tai tausta oli tumma. Tämän jälkeen tehtiin testi, jossa kokeiltiin eri aikoja.

### 3.2.5 Laitetestaukset

Työhön tarvittiin joko kitin valmistajan inkubaattori tai ravisteleva lämpöhau-  
de eikä eläintautibakteriologian ryhmällä ollut kumpaakaan käytettävissä.  
Heti työn alettua kehitettiin laiteyhdistelmä, jossa oli ravisteleva lava ja ve-  
siastia lämpökaapissa. Näytteet laitettiin vesiastiaan, jotta saatiin tasainen ja  
tehokas lämmönsiirto näytekaivoihin. Työn aikana kuitenkin huomattiin läm-  
pötilan heittelevän liian paljon raja-arvoista.

Pyrittiin kehittämään sellainen laiteyhdistelmä, että lämmönsiirto oli mahdol-  
lisimman tehokasta ja laitteen käyttö ei olisi liian monimutkaista. Ensiksi teh-  
tiin erilaisia yhdistelmiä lämpökaappiin, kunnes huomattiin lämpötilan pysy-  
minen raja-arvoissa mahdolliseksi. Oven aukominen ja laitehuoneen hyvä  
tuuletusjärjestelmä johti kaivojen liialliseen jäähtymiseen. Lisäksi ravistele-  
van lavan lämmönkestävyys tuli esteeksi. Tämän jälkeen päädyttiin laiteyh-  
distelmään, joka oli huoneenlämpötilassa. Ravistelevan lavan päälle laitettiin  
lämpöblokki, johon tehtiin foliosta näytekaivojen mukaiset foliokaivot.

### 3.2.6 Tulosten tulkinta

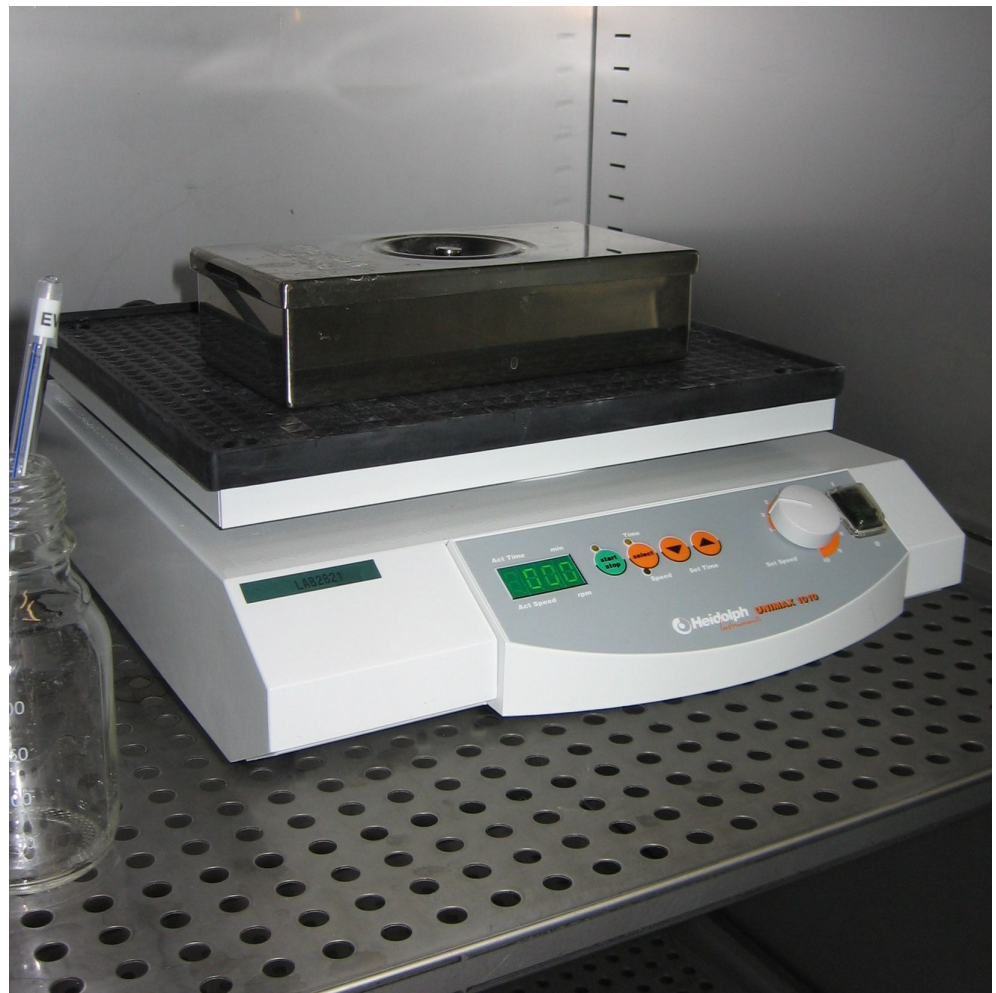
Tulosten arvioinnissa käytettiin kitin mukana tullutta arviointipaperia (liite 2)  
ja taulukkoa (liite 1), josta selvisivät viivojen merkitykset. Viimeisten sub-  
straattireaktion keskeyttävien vesihuuhtelujen jälkeen liuskat siirrettiin imu-  
paperien väliin ja tämän päälle folio, jotta valo ei päässyt vaikuttamaan lius-  
koihin. Liuskojen annettiin kuivua vähän aikaa, jonka jälkeen ne siirrettiin yk-  
sitellen arviointipaperin viereen. Liuska laitettiin arviointipaperin viereen si-  
ten, että kolme ensimmäistä arviointiviivaa meni kohdakkain liuskan kolmen  
ensimmäisen viivan kanssa. Liuskaa siirrettiin alareunassa olevalta kahdella  
viivalla eristetyltä alueelta. Kun viivat olivat kohdakkain, katsottiin arviointi-  
paperista liuskan muiden viivojen kohdat ja näiden kohtien numerot. Taulu-  
kosta nähtiin mitä bakteeria vastasi kukin viivayhdistelmä, joka oli jokaiselle  
bakteerilajille yksilöllinen.

## 3.3 Kitin koeajo

Työ suoritettiin aluksi ainoastaan *M. avium* ATCC 25291 -kannalla, jotta näh-  
tiin testin toimivuus käytettävissä olevilla laitteilla ja olosuhteilla. Lisäksi ko-  
keiltiin, millaisen tuloksen kitti antaa jollekin muulle bakteerille kuin mykobak-  
teereille. Tähän tarkoitukseen valittiin *Eschericia coli*. Työ suoritettiin täysin  
samalla tavoin kahteen kertaan. Tällä tavoin saatiin kokemusta kitin käytös-

tä. Ainoastaan DNA:n eristämistä ei toistettu, vaan DNA:t otettiin pakkasesta ja muuten vaiheet suoritettiin työohjeen mukaisesti (liite 3). Hybridisaatiovaiheessa substraattiliuoksen annettiin vaikuttaa noin 5 - 10 minuuttia.

Suurin eroavaisuus kitin ohjeisiin verrattuna oli käytettävissä olevat laitteet. Kitin mukaan työn hybridisaatio- ja pesuvaiheeseen tarvittiin ravisteleva vesihaude tai kitin valmistajalta saatava inkubaattori. Tämän laitteen tilalla työssä käytettiin +45 °C lämpökaapin sisällä olevaa ravistelevaa lavaa, jossa oli vedellä täytetty metallinen astia päällä (kuva 8). Kaivot laitettiin hybridisaation ja pesun ajaksi veteen. Näin pyrittiin saamaan tasainen lämmönkulku jokaiseen kaivoon.



Kuva 8. Ravisteleva lava ja vesiaastia lämpökaapissa

### Tulokset

*M. avium* ATCC 25291 -bakteerin liuskat vastasivat toisiaan (taulukko 2). Molempiin muodostui neljä selvää tummaa viivaa, mutta ei vaaleata fakultatiivista viivaa kohtaan 6. Taustat olivat puhtaita. Myös *E. coli* -bakteerin liuskat vastasivat toisiaan. Liuskoihin muodostui ainoastaan yksi tumma viiva vyöhykkeelle 1 (konjugaattikontrolli). Taustat olivat puhtaita. (Liite 4, 8.5 ja 16.5.)

Töistä saatujen tulosten perusteella arvioitiin testin toimivan, vaikka kaikkia fakultatiivisia vaaleita viivoja ei muodostunutkaan. Tummat viivat olivat kuitenkin selkeät ja oikeilla kohdilla. *E. coli* -bakteerille testi antoi vain yhden viivan kuten pitkin.

### 3.4 Eläin- ja ATCC-kantojen koeajot

Työ suoritettiin kaikilla valituilla eläin- ja ATCC-kannoilla (*M. intracellulare* ATCC 13950, *M. tuberculosis* ATCC 25177), jotta saatiin tietää kitin toimivuus käytännössä. Eläin- ja ATCC -kantojen DNA:t eristettiin ja tehtiin PCR. Hybridisaatiovaihe tehtiin pienemmissä erissä (6 -7 kantaa/kerta). Näin välttyttiin näytteiden välisten suurten aikaerojen mahdollisesti tuomilta virheiltiltä. Substraatin vaikutusajat vaihtelivat 15 - 20 minuuttiin.

### Tulokset

Täysin oikean tuloksen 19 kannasta (mukaan luettuna ensimmäisen koeajon *M. avium* ATCC 25291 -kanta) antoi ainoastaan *M. tuberculosis* ATCC 25177 -kanta (nro työssä 18), jossa sekä tummat että vaaleat viivat täsmäsivät eikä vääriä viivoja ollut lainkaan (taulukko 2). *M. intracellulare* ATCC 13950 (nro työssä 17) -kannalla tummat viivat olivat selkeitä ja oikeilla kohdilla. Myös oikea vaalea viiva vyöhykkeellä 6 oli selvästi nähtävissä, mutta haamuviivoja oli vyöhykkeillä 7, 8 ja 10. (Liite 4, 25.5, 28.5 ja 29.5.)

Eläimistä eristetyistä kannoista tummat viivat olivat kaikilla muilla kannoilla oikein paitsi kannoilla 3 (*M. scrofulaceum*) ja 12 (*M. chelonae*). Kannalta 3 puuttui tumma viiva vyöhykkeeltä 9, jotta se olisi *M. scrofulaceum*. Kyseiselle viivayhdistelmälle ei taulukosta (liite 1) vastausta löytynyt. Toiselle *M. scrofulaceum* -kannalle (kanta nro 4) testi kuitenkin antoi tummat viivat täysin oikein, mutta fakultatiivinen vaalea viiva puuttui kohdalta 6. Lisäksi taustalla oli nähtävissä jokaisen vyöhykkeen kohdalla todella vaaleita haa-

muviivoja. Kannan 12 tummat viivat olivat väärillä kohdilla. Tummiin viivojen perusteella kyseessä oli *M. fortuitum* -kanta, tosin vyöhykkeellä 7 oleva tummempi viiva oli muita tummia viivoja paljon vaaleampi, kyseessä voi olla myös selvä vaalea viiva. Myös tumma viiva vyöhykkeellä 14 oli vaaleampi kuin vyöhykkeen 2 yleinen kontrolli, joten sen tulkitsemista viivaksi tuli harkita. Lisäksi vyöhykkeillä 6 ja 8 oli selvät vaaleat viivat ja vyöhykkeellä 10 haamuviiva. Näin ollen selvää vastausta kannalle 12 ei voitu antaa. (Liite 4, 25.5, 28.5 ja 29.5.)

Oikeat fakultatiiviset vaaleat viivat olivat nähtävissä tarkkaan tarkasteltuna kannoilla 5, 6, 7, 8, 17 ja 18. Ainoastaan kannoilla 17 ja 18 ne olivat selvästi nähtävissä. Mitkään vaaleista viivoista eivät olleet kuitenkaan yhtä tummia kuin yleinen kontrolli. Vääriä vaaleita ja haamuviivoja oli kaikissa muissa liuskoissa paitsi kannalla 18 eli *M. tuberculosis* -bakteerilla. Lisäksi joissakin liuskoissa oli nähtävissä selvää värin leviämistä tummemmista viivoista. Kannan 10 kaivon joutui vettä hybridisaation aikana, jonka vuoksi viivat eivät olleet täysin onnistuneita. (Liite 4, 25.5, 28.5 ja 29.5.)

Osassa liuskoista oli nähtävissä sekä taustan sotkuisuutta että vääriä vaaleita viivoja tai vaaleat viivat puuttuivat. Kaikkien liuskojen kohdalla huomattiin, että tulkinnalla oli suuri vaikutus. Tummiin viivojen huomattiin kuitenkin täsmällään todella hyvin melkein kaikissa kannoissa. (Liite 4, 25.5, 28.5 ja 29.5.)

Interkalibrointinäytteessä nro 19 kaikki kolme kontrolliviivaa olivat selviä, joten kyseessä oli selvästi mykobakteeri. Kuitenkin vyöhykkeen 7 tumma (*M. fortuitum*) viiva oli selvästi muita tummia viivoja vaaleampi. Selvää vastausta kyseisellä bakteerille ei pystytty antamaan. Myöhemmin saadun tiedon mukaan kyseessä oli *M. smegmatis*, jota ei kyseisellä testillä pystytä tunnistamaan. (Liite 4, 25.5.)

Sukutasolla testi tunnisti kaikki eläin- ja ATCC-kannat oikein. Lajitasolla puolestaan kitti tunnisti oikein tummiin viivojen kohdalla 89,5 prosenttia kaikista kannoista, kun taas ainoastaan eläinkannoista 87,5 prosentista saatiin oikea tulos. Laskuihin ei ole otettu mukaan interkalibrointinäytettä. (Liite 4, 8.5 ja 16.5, 25.5, 28.5 ja 29.5.)

Taulukko 2. ATCC- ja eläinkantojen tulokset tummien, UC ja GC -viivojen osalta

Nro työssä	Bakteeri	UC/GC	Tummat viivat	Poikkeaman kuvaus
	<i>M. avium</i> ATCC 25291	ok	ok	
5	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	ok	ok	
6	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	ok	ok	
12	<i>M. chelonae</i>	ok	-	viivat väärillä kohdilla, vastaavat <i>M. fortuitum</i> -bakteerin viivoja, mutta ovat vaaleampia kuin UC
11	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. triviale</i>	ok	ok	tummiin viivojen perusteella <i>M. fortuitum</i>
1	<i>M. fortuitum</i>	ok	ok	
2	<i>M. fortuitum</i>	ok	ok	
15	<i>M. fortuitum</i>	ok	ok	
16	<i>M. gordonae</i>	ok	ok	
7	<i>M. interjectum</i>	ok	ok	
17	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	ok	ok	
13	<i>M. malmoense</i>	ok	ok	
14	<i>M. malmoense</i>	ok	ok	
8	<i>M. marinum</i>	ok	ok	
9	<i>M. marinum</i>	ok	ok	
18	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	ok	ok	
10	<i>M. xenopi</i>	ok	ok	
3	<i>M. scrofulaceum</i>	ok	-	puuttuu tumma viiva vyöhykkeeltä 9
4	<i>M. scrofulaceum</i>	ok	ok	
19	Defra interkalibrointinäyte	ok	-	ei muodostunut selviä tummia viivoja

### 3.5 Substraatin vaikutusaika

Työn aikana huomattiin substraatin vaikutusajalla olevan suuri merkitys tuloksille, joten päätettiin optimoida substraatin vaikutusaikaa kolmen ATCC-kannan avulla. Näytteinä toimivat *M. avium*, *M. tuberculosis* ja *M. intracellulare*. Jokaisesta kannasta monistettiin riittävästi PCR-tuotetta hybridisaatioita varten samanaikaisesti, jotta olosuhteet olivat kaikilla samat PCR:ssä.

Hybridisaatio suoritettiin ensimmäiseksi *M. avium* -bakteerille työohjeen (liite 3) mukaisesti. Samaa kantaa pipetoitiin kuitenkin yhden kaivon sijasta neljään, jotta pystyttiin kokeilemaan neljää erilaista substraatin vaikutusaikaa. Ajat olivat 5, 10, 15 ja 20 minuuttia. Kaivojen annettiin olla kiinni toisissaan viimeiseen pesuun asti, jotta kaikkien kaivojen olosuhteet olisivat mahdollisesti



simman samat loppuun asti. Ajanotto aloitettiin pipetoimisen alettua, joten ajat eivät olleet tarkkoja. Jokainen kaivo peitettiin erikseen foliopaperilla, jotta jokaisen kaivon substraatti sai rauhassa vaikuttaa kyseisen kaivon ajan loppuun asti. Substraattiliuos poistettiin jokaisesta kaivosta erikseen jokaisen viiden minuutin kohdalla. Kun 20 minuuttia oli kulunut, kaikille kaivoille oli suoritettu pesu ja liuskat oli valmiita tarkasteltavaksi. Sama suoritettiin seuraavien päivien aikana sekä *M. tuberculosis*- että *M. intracellulare*-bakteereille.

### *Tulokset*

Selvästi parhaimman tuloksen antoi yhä *M. tuberculosis*, jossa oikea vaalea viiva oli koko ajan selvästi nähtävissä eikä vääriä vaaleita viivoja ollut havaittavissa ellei todella tarkkaan katsonut. Viiden minuutin kohdalla kaikkien kolmen bakteerin tummat viivat olivat selkeitä ja melko vaaleita (harmaita) verrattuna pidemmän vaikutusajan liuskoihin. Oikeat fakultatiiviset vaaleat viivat olivat lähes olemattomia. *M. tuberculosis* -kannalla kuitenkin oikea vaalea viiva oli jo selvästi nähtävissä vyöhykkeellä 6. Kaikissa liuskoissa oli tausta valkea eikä haamuviivoja ollut havaittavissa. (Liite 4, 6.6 - 8.6.)

Kymmenen minuutin kohdalla tummat viivat olivat selvästi tummempia kuin viiden minuutin kohdalla. Tummiin viivojen välissä oli nähtävissä levinnyttä väriä. Oikeat vaaleat viivat oli myös *M. avium*- ja *M. intracellulare* -kannoilla havaittavissa vyöhykkeellä 6. *M. tuberculosis* -kannan vaalea viiva oli jo todella selkeä. *M. intracellulare* -kannalla oli nähtävissä myös väärä vaalea viiva vyöhykkeellä 10, joka oli yhtä tumma kuin oikea vaalea viiva. *M. avium* -kannan liuskassa oli useita haamuviivoja. *M. tuberculosis* -kannan vyöhykkeen 10 tummasta viivasta oli selvästi levinnyt väriä vyöhykkeelle 9. Vyöhykkeellä 11 oli havaittavissa haamuviiva, jos todella tarkkaan katsoi. Lisäksi kaikkien liuskojen tausta alkoi tummua. (Liite 4, 6.6 - 8.6.)

Sama jatkui 15 ja 20 minuutin kohdalla. *M. avium* -kannan liuskoissa haamuviivat ja oikea vaalea viiva selkenivät ajan pidentyessä. *M. intracellulare* ja *M. tuberculosis* -kannoilla kaikki viivat selkenivät, myös väärä vaalea viiva. Kaikkien kantojen kohdalla taustat jatkoivat tummumistaan ajan pidentyessä. (Liite 4, 6.6 - 8.6.)

Ajan vaikutus oli selvästi nähtävissä liuskoissa jokaisen bakteerin kohdalla. Huomattiin mitä pidempään substraatin annettiin vaikuttaa, sitä enemmän

alkoi muodostua sekä oikeita että vääriä vaaleita viivoja ja alkoi esiintyä taustan tummumista. Näiden tulosten perusteella todettiin, että paras tulos saatiin luultavammin 10 - 15 minuutin kohdalla. (Liite 4, 6.6 - 8.6.)

### 3.6 ”Ravisteleva lämpöhaude” -laitteen valmistus

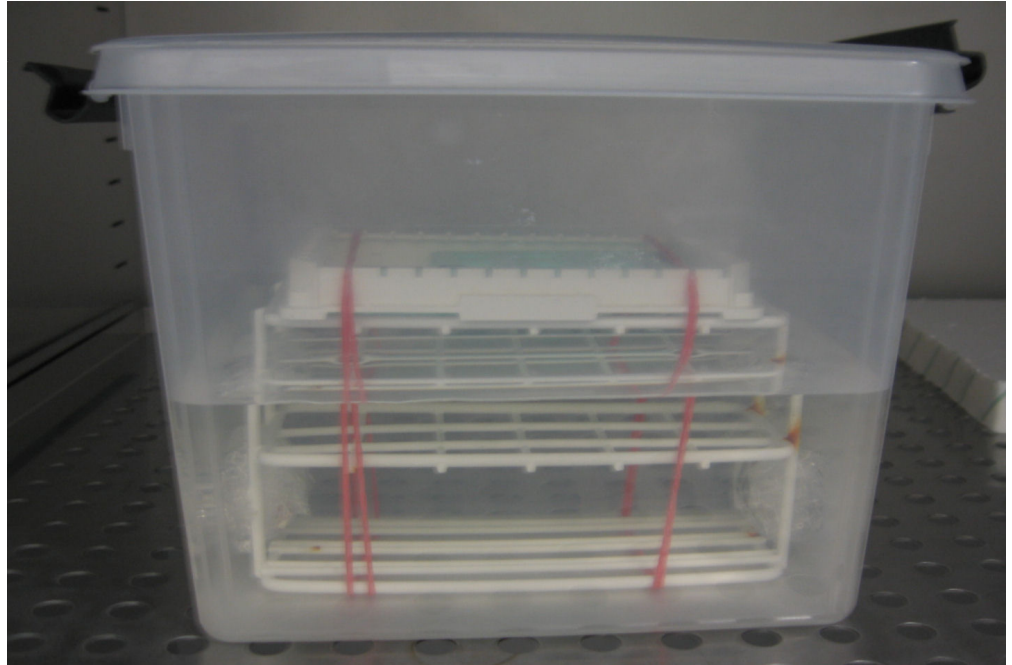
#### 3.6.1 Ongelma

Substraatin vaikutusajan seurannan yhteydessä huomattiin ongelmia hybridisaatiovaiheessa käytettävässä lämpökaappi-ravistelijayhdistelmässä. Lämpötila ei pysynyt työn vaatimissa raja-arvoissa, mikä saattoi olla syynä tuloksien osittaiseen virheellisyyteen. Ongelma havaittiin ennen substraatin vaikutusajan testauksien aloittamista *M. tuberculosis* -bakteerilla. Lämpötilaa seurattiin aina ennen hybridisaation aloittamista mittaamalla veden lämpötilaa. Veden lämpötila oli noussut ennen *M. tuberculosis* -bakteerin analyysin aloittamista +47 °C:seen eli asteen liian korkeaksi (+45 °C ± 1 °C) annetuista rajoista. Kun kaappia pidettiin vain vähän aikaa auki, lämpötila puolestaan laski +40 °C:seen. Myös lämpötilan nousu takaisin annettuihin rajoihin kesti kauan (noin tunnin). *M. tuberculosis* -kannan testaus tehtiin kuitenkin loppuun lämpötilan noustua annettuihin rajoihin, jotta se oli vertailukelpoinen aikaisempiin samalla laiteyhdistelmällä tehtyihin tuloksiin. Lämpötilaa päätettiin seurata digitaalimittarilla oikeata tilannetta vastaavissa tilanteissa. Veden lämpötila nousi joka kerta liian korkeaksi ennen näytteen lisäystä ja pysyi korkeana myös näytteen lisäyksen jälkeen.

#### 3.6.2 Vesiastian vaikutus lämpötilaan

Lämpötilan nopean vaihtelun vuoksi kokeiltiin, miten isompaan vesiastiaan (noin 2 litraa) vaihtaminen vaikuttaa lämpötilaan. Astiaan rakennettiin taso sopivalle korkeudelle näytekaivoja varten (kuva 9). Muuttamalla astian ja ravistelijan sijaintia lämpökaapissa seurattiin paikan vaikutusta veden lämpötilaan. Lämpötilaa mitattiin vedestä sekä digitaalisella että elohopeamittarilla ja kaapin lämpötilaa sekä kaapin omalla mittarilla että glyserolissa olevalla elohopeamittarilla usean päivän ajan. Lämpötila oli aamulla järjestelmällisesti aina liian alhainen (noin +41 - 42 °C) ja päivän edetessä nousi (noin +45 - 46 °C) huomattavasti korkeammaksi. Usean päivän seuraamisen ja mittareiden lisäyksien jälkeen alettiin epäillä, että ravistelijä lämmittää vettä päivän aikana ja tämän takia veden lämpötilan nousee aina iltaa kohti. Tämä johtui siitä, että laite aina sammutettiin yöksi ja laitettiin aamulla taas päälle. Ravis-

telijan ja vesiastian väliin laitettiin styroksilevy eristämään lämmön siirtymistä laitteesta veteen. Tämän seurauksena veden lämpötila ei noussut enää yli +40 °C:n, vaikka laite oli koko yön päällä. Todettiin, että tällä yhdistelmällä ei pystytä saamaan aikaan sekä tasaista että oikeata lämpötilaa.



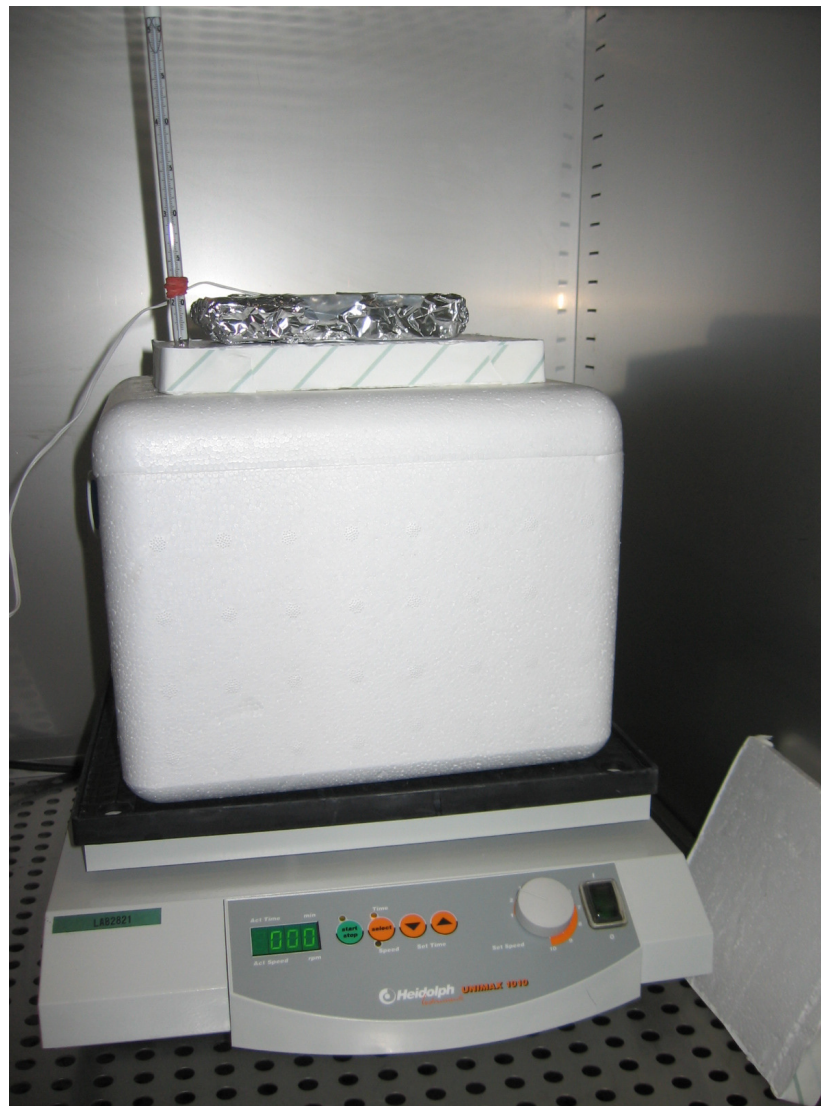
*Kuva 9. Laitetestauksessa käytetty kahden litran vesiastia*

Edellisten tulosten perusteella mietittiin lämpökaapin lämpötilan nostoa. Näin saataisiin isompi vesimäärä myös lämpiämään oikeaan lämpötilaan ja säävutettaisiin tasaisempi lämpötila styroksien avulla. Laitteenvalmistajalta saatiin tietää, että ravisteleva lava ei kestä korkeampia lämpötiloja.

### *3.6.3 Ravisteleva lava-lämpökaappi-styroksi -yhdistelmä*

Laitteen kehittämistä jatkettiin mittaamalla pelkän styroksilevyn lämpötilaa sijoittamalla digitaalinen lämpömittari kahden styroksilevyn väliin. Ajatuksena oli rakentaa laiteyhdistelmä, jossa työn kaivot tulisivat näiden styroksilevyjen väliin muotoiltuun kuoppaan. Näin pyrittiin saamaan tasainen lämmönkulku kaivoihin ilman vettä. Lämpötila nousi kuitenkin jälleen yli +46 °C. Styroksikokonaisuus siirrettiin pois ravistelijan päältä, jolloin lämpötila oli juuri oikea. Ravistelijan todettiin yhä lämmittävän liikaa. Ravistelijan päälle laitettiin styroksinen kylmälaukku, jonka päälle kaksi styroksilevyä lämpömittarilla. Lämpötila pysyi tällä rakennelmalla hyvänä. Tämän jälkeen järjestettiin koetilanne, jossa styroksilevyyden muotoiltiin kaivot ja se laitettiin lämpiämään etukäteen lämpökaappiin. Parafilmistä muotoiltiin samanlaiset kaivot ja näihin pi-

petoitiin saman lämpöistä vettä samassa suhteessa kuin itse työssä. Kaivot siirrettiin lämpökaappiin styroksikaivoihin ja digitaalinen lämpömittari laitettiin mittaamaan kaivon nesteen lämpötilaa. Kaivojen päälle asetettiin styroksinen kansi. Lämpötilaa seurattiin kuten oikeassa työtilanteessa. Lämpötilat jäivät kuitenkin liian alhaisiksi. Yhdistelmää kokeiltiin vielä lisäämällä styroksisten kaivojen päälle folio (kuva 10). Ajateltiin, että tällä tavoin saataisiin kaivojen lämpötila korkeammaksi. Muuten kaikki vaiheet tehtiin samalla tavoin kuin edellä. Lämpötilat jäivät kuitenkin yhä liian alhaisiksi, vaikka lämpötilat nousivat jo nopeammin näytteen lisäyksen jälkeen.



Kuva 10. Ravisteleva lava-styroksi-lämpökaappi -yhdistelmä

#### 3.6.4 Ravisteleva lava-lämpöhaude -yhdistelmä ja kuljetusastia

Monien epäonnistuneiden lämpökaappia hyödyntävien yritysten jälkeen kokeiltiin jäljitellä kittivalmistajan suosittelemaa inkubaattoria. Ravistelijä nos-

tettiin pöydälle, päälle laitettiin lämpöhaude ja lämpöblokkien päälle tehtiin foliosta näytekaivojen muotoiset kaivot. Kanneksi laitettiin sekä folio että rakennettiin styroksinen kansi, jossa oli sisäosa foliosta. Kannen painoksi laitettiin kirja, jotta lämpötila pysyy tasaisena. Digitaalinen lämpömittari laitettiin kaivoihin mittaamaan lämpötilaa. Lämpötilaa säädeltiin lämpöblokista sen mukaan, mitä kaivossa oleva digitaalimittari näytti. Tarkemmat kuvat laiteyhdistelmästä ovat liitteessä 5. Tällä yhdistelmällä lämpötila saatiin pysymään melko tasaisena koko päivän ajan. Eri kaivojen välillä oli kuitenkin huomattavissa eroavaisuuksia, joten lämpötilaa seurattiin mittaamalla useamman kaivon lämpötilaa. Lämpöhauteesta säädettiin näiden lämpötilojen mukaan sellainen lämpötila, jossa kaikkien kaivojen lämpötila pysyisi annetuissa rajoissa. Lisäksi rakennettiin kuljetusastia työssä esilämmitettäville reagensseille, jotta reagenssit pysyisivät mahdollisimman oikean lämpöisinä lisäykseen asti. Näin näytteiden lämpötilat eivät menisi niin alas ja oikea lämpötila saavutettaisiin nopeasti. Kuljetusastia rakennettiin dekantterilasista, johon laitettiin styroksia tiiviisti ja foliokuppi reagenssipullon ympärille (kuva 11). Kanneksi kuljetusastiaan laitettiin folio.

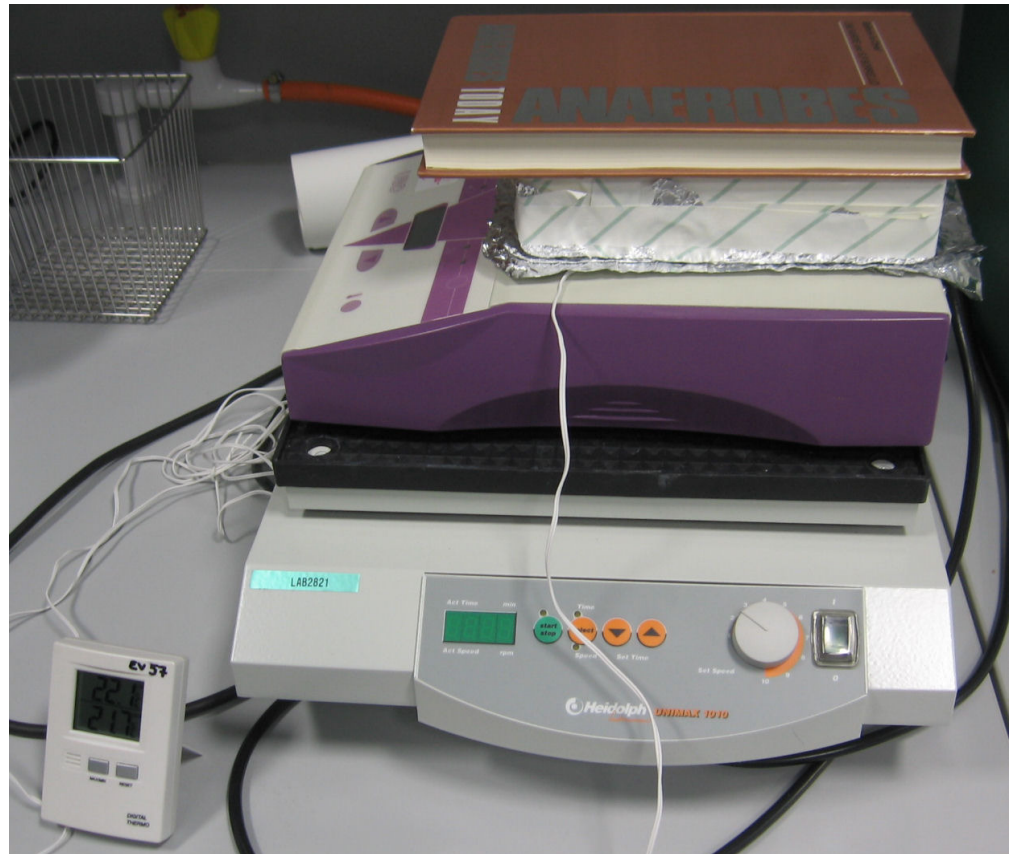


*Kuva 11. Itse rakennettu kuljetusastia reagensseja varten*

### 3.7 Uuden laitteen koeajo

#### 3.7.1 1. koeajo: laitteiden säätö

Ravistelijä-lämpöhaude-yhdistelmän (kuva 12) toimivuutta kokeiltiin myös käytännössä. Työhön valittiin aluksi vain *M. intracellulare* ATCC 13950- ja *M. avium* ATCC 25291 -kannat. Näiden kahden bakteerin tuloksissa oli aiemmin ollut vääriä vaaleita viivoja. Näin pystyttiin testaamaan laitteen toimivuutta verrattuna aikaisempaan laiteyhdistelmään.



Kuva 12. Ravistelevana lämpöhauteena toimiva ravisteleva lava-lämpöhaude-yhdistelmä

Ravistelijä-lämpöblokki-yhdistelmän lämpötilaa seurattiin heti aamusta, jotta kaivoihin saatiin varmasti oikea lämpötila. Pyrittiin kuitenkin siihen, että lämpötilat eivät olisi ainakaan liian alhaisia, kuten luultavammin oli ollut aikaisemmin. Laitteen lämpötila säädettiin +48,5 °C:seen, jolloin lämpötila oli näytteiden viereisessä kaivossa +45,3 °C. Näytteen lisäyksen aikana lämpötila laski jonkun verran, mutta palasi takaisin +45,0 °C:seen viiden minuutin aikana. Lämpötila nousi viereisessä kaivossa 30 minuutin hybridisaatioliuoksen inkuboinnin aikana +45,6 °C:seen. Pesuliuoksen lisäyksen jälkeen lämpötila laski +44,0 °C:seen, mutta pysyi annetuissa rajoissa. Sekoitusnopeut-

ta jouduttiin työn aikana myös säätämään. Hybridisaatioliuoksen aikana nopeus oli 181 rpm, jota laskettiin 10 minuutin kuluttua 124 rpm. Pesun aikana ravistelunopeus pidettiin 82 rpm. Substraattiliuoksen annettiin vaikuttaa 20 minuuttia, jotta nähtiin kaikki muodostuvat vaaleat viivat.

### *Tulokset*

Uuden laiteyhdistelmän myötä sekä *M. avium*- että *M. intracellulare*-bakteerien liuskojen taustat olivat huomattavasti valkeampia kuin aikaisemmin 20 minuutin substraatin vaikutusajalla. *M. avium* -kannan tummat viivat olivat todella selkeät ja oikeilla kohdilla. Tosin värien leviämistä oli havaittavissa viivojen välille, mutta se johtui luultavammin viivojen tummuudesta. Fakultatiivinen vaalea viiva puuttui vyöhykkeeltä 6. *M. intracellulare* -kannan tummat viivat olivat selkeitä ja oikeilla kohdilla. Vyöhykkeen 6 fakultatiivinen vaalea viiva puuttui. Vyöhykkeellä 9 viiva oli todella voimakas ja väri oli levinnyt siitä vyöhykkeelle 10 asti. Vyöhykkeellä 10 saattoi olla myös vaalea haamuviiva. (Liite 4, 3.7.)

### 3.7.2 2. koeajo: eläinkannat

Laiteyhdistelmää kokeiltiin myös muutamilla aikaisempien tulosten perusteella valituilla eläinkannoilla. Tehdyistä kannoista valittiin sellaiset, joissa aikaisemmin oli ollut paljon haamuviivoja ja/tai oikeita vaaleita viivoja puuttui ja/tai vääriä ilmestyi. Tällaisia olivat kannat nro 2, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15. Lämpötila säädettiin laitteesta jälleen +48,5 °C:seen ja sekoitus 82 rpm:n. Lämpötila näytteiden viereisessä kaivossa +45,4 °C. Lämpötila laski hybridisaatioliuoksen ja näytteen lisäyksen aikana +42,4 °C:seen. Viiden minuutin kuluttua lämpötila palasi rajoihin (+44,4 °C). STR-liuoksen lisäyksen aikana lämpötila laski +42,5 °C:seen ja kuuden minuutin kohdalla lämpötila oli +44,0 °C. Lopussa lämpötila oli +44,7 °C. Lämpöhauteen lämpötila ei missään työvaiheessa laskenut. Ennen tätä esilämmitettävät liuokset oli lämmitetty lämpökaapissa, mutta tämän työn kohdalla päätettiin siirtyä +42,0 °C:n vesihautteeseen. Näin varmistuttiin, että reagenssit olivat varmemmin oikean lämpöisiä. Substraatin vaikutusaikana pidettiin 20 minuuttia. Näin pystyttiin vertaamaan tuloksia aiempiin ja nähtiin tilanteen kehittyminen.

### Tulokset

Selvä parannus laitemuutoksen myötä oli huomattavissa kaikkien eläinkantojen liuskojen taustoissa, jotka olivat huomattavasti vaaleampia. Haamuviivoja oli huomattavasti vähemmän, mutta myös oikeita fakultatiivisia viivoja katosi. Tummat viivat olivat kaikissa näytteissä oikeilla kohdilla ja ne olivat tummia ja selkeitä. Huomattavissa oli kuitenkin pitkä substraattiliuoksen vaikutusaika, sillä lähes kaikki tummat viivat olivat jonkin verran levinneet. Täysin oikeata viivayhdistelmää ei antanut mikään kannoista. (Liite 4, 5.7.)

Kannoissa nro 8 ja 9 (*M. marinum*) oli huomattavissa molemmissa samat virheet. Vyöhykkeen 6 fakultatiivinen vaalea viiva puuttui ja väärä vaalea viiva muodostui kohdalle 9. Lisäksi liuskoissa oli nähtävissä paljon värien leviämisen aiheuttamaa sotkuisuutta. Samat virheet olivat myös aiemmalla laiteyhdistelmällä tehdessä, tosin aiemmin tehdyissä vyöhykkeellä 6 oli havaittavissa vaaleaa viivaa tarkkaan tarkasteltuna. (Liite 4, 5.7.)

Kannan nro 10 (*M. xenopi*) liuskalla oli selvä vaalea viiva oikealla kohdalla, mutta myös väärä vaaleampi vaalea viiva kohdalla 7. Aiemmin kyseinen kanta meni pieleen, joten hyvää vertailukohdetta ei ole kyseiselle kannalle. (Liite 4, 5.7.)

Kantojen nro 5 ja 6 (*M. avium ssp.*) liuskoista puuttuivat fakultatiiviset vaaleat viivat kuten aiemminkin laiteyhdistelmällä. Aiemmin kuitenkin myös vaaleita haamuviivoja muodostui koko liuskojen matkalla, mutta nyt taustat olivat puhtaita lukuun ottamatta värisotkuja. (Liite 4, 5.7.)

Kantojen nro 2 ja 15 (*M. fortuitum*) liuskat vastasivat myös toisiaan. Kyseiset kannat oli eristetty saman karjan näytteistä, joten liuskojen samankaltaisuus johtuu luultavammin tästä. Värien leviämistä oli koko liuskan matkalla paljon, joten oli mahdoton sanoa, näkyikö taustalla vääriä vaaleita viivoja ja näin ollen liuskoja ei voi verrata aikaisempiin tuloksiin. (Liite 4, 5.7.)

Kannasta nro 14 (*M. malmoense*) puuttui fakultatiivinen viiva. Aiemmalla laiteyhdistelmällä tehdyssä liuskassa kohdalla 9 ollut väärä vaalea viiva oli huomattavasti vaaleampi. (Liite 4, 5.7.)



### 3.7.3 3. koeajo: substraatin vaikutusaika

Työ toistettiin vielä kerran kyseisellä laiteyhdistelmällä, mutta tällä kertaa muutettiin substraatin vaikutusaikaa 12 minuuttiin aikaisempien aikatestausien perusteella. Kokeiluun valittiin yhä samat eläinkannat. Ennen työn toistamista lämpötilaa seurattiin muutaman päivän ajan, jolloin varmistettiin lämpöblokin ja kaivojen lämpötilat. Lämpötilaa seurattiin kaikista kaivoista, sillä oikeasta reunasta kolmannen kaivon lämpötila oli huomattavasti korkeampi kuin muiden. Tätä ei ollut huomattu aiemmin. Tämän perusteella etsittiin lämpöhauteesta uudestaan lämpötila, joka pitäisi kaikissa kaivoissa lämpötilan työn vaatimissa rajoissa. Lisäksi lämpömittari asetettiin kosketuksiin kaivon pohjan kanssa, sillä siinä lämpötila oli korkeampi kuin ilmassa. Työ tehtiin lämpötilan ollessa lämpöblokista säädetty +47,3 °C:seen eli noin asteen kylmemmäksi kuin aikaisemmilla kerroilla. Lämpötila laski hybridisaatioliuoksen ja näytteen lisäyksen aikana +42,3 °C:seen. Seitsemän minuutin kohdalla lämpötila oli +44,5 °C ja lopussa +44,9 °C. STR-liuoksen lisäyksen aikana lämpötila laski +42,1 °C:seen. Seitsemän minuutin kuluttua lämpötila oli +44,3 °C ja lopussa +44,7 °C.

#### *Tulokset*

Edellisiin tuloksiin verrattuna liuskojen taustat olivat huomattavasti puhtaampia eikä värien leviämistä ollut tapahtunut niin paljon. Tämä oli havaittavissa varsinkin näytteissä 8, 9, 15 ja 2. Tämä luultavammin johtui siitä, että myös tummat viivat olivat vaaleampia. Muuten samat virheet toistuivat ja nyt myös kannoista 15 ja 2 huomasivat taustalla olevan haamuviivoja kaikkialla liuskoissa. Mikään kannoista ei edelleenkään antanut täysin oikeata viivayhdistelmää. (Liite 4; 12.7.)

## 4 POHDINTA

### 4.1 Kantojen tulokset

Työssä käytettyjen sekä eläin- että ATCC-kantojen tuloksissa oli samoja virheitä, vaikka työn alussa ajateltiin, että ATCC-kannat antaisivat varmemmin oikeita tuloksia. ATCC-kantojen luotettavuutta saattaa ehkä heikentää se, että niitä oli siirrostettu useita kertoja.

Kitti tunnisti parhaiten *M. tuberculosis* ATCC 25177 -kannan, johon muodostuivat aina oikeat tummat ja vaaleat viivat. Substraatin aikaseurannassa kyseisellekin kannalle muodostui todella vaalea väärä viiva inkuboitessa 10 minuuttia. Substraatin vaikutusajaksi oli valmistajan työohjeessa annettu 3 - 20 minuuttia, mikä lopulta vaikutti paljon tuloksiin. *M. tuberculosis* -bakteerin kohdalla jo kolme minuuttia olisi antanut oikean tuloksen eikä siinä vaiheessa väärää vaaleita viivoja olisi muodostunut. Huomioitavaa on myös, että *M. tuberculosis* -bakteerille ei muodostunut muita kuin yksi haamuviiva pidemmällä ajalla ja tausta pysyi aina yhtä puhtaana.

Väärät vaaleat viivat muodostuivat yleensä toistuvasti samalle kohtaa saman kannan kohdalla. Laitteyhdistelmää vaihtamalla tuloksia saatiin parantumaan, mutta toistuvat virheet pysyivät. Tausta saatiin huomattavasti vaaleammaksi, mutta samalla katosi myös oikeita vaaleita viivoja. ATCC-kantakokoelman *M. avium*- ja *M. intracellulare* -kannat eivät muodostaneet täydellistä viivakuviointia, vaan *M. avium* -kannalta puuttui järjestelmällisesti vaalea viiva ja *M. intracellulare* -kannalle muodostui väärää vaaleita viivoja. Taustat näistä molemmista saatiin puhtaiksi. Mitkään eläinkannoista eivät antaneet täysin oikeata viivakuviointia missään vaiheessa, vaan vaaleita viivoja joko puuttui tai niitä oli ylimääräisiä tai tausta oli muuten sotkuinen. Tähän saattaa olla syyinä, että kitit on yleensä valmistettu ja testattu ihmisistä eristetyillä kannoilla ja kyseiset kannat voivat erota eläinperäisistä kannoista. Myös lajinsisäiset vaihtelut ovat mahdollisia.

#### 4.2 Valmistajan työohje

Kitin ohjeen mukaan yleistä kontrollia vaaleampia viivoja ei tulisi ottaa huomioon. Kuitenkaan mitkään työssä saadut vaaleat fakultatiiviset viivat eivät olleet yhtä tummia kuin yleinen kontrolli eikä kitin ohjeesta selviä, kuuluuko vaaleiden viivojen edes olla yhtä tummia. Tummat viivat olivat yleensä yhtä tummia tai tummempia. Jos vaaleiden viivojen tulee olla yhtä tummia tai tummempia kuin yleinen kontrolli, tummien viivojen tulisi olla todella tummia, jotta vaalean ja tumman viivan erottaisi toisistaan. Kuitenkin työn aikana pyrittiin huomioimaan kaikki mahdolliset vaaleat viivat. Tämä teki yhtenäisestä tulkittamisesta vaikeata, sillä ei ollut selvää intensiteettirajaa, mitkä viivat tulisi vielä hyväksyä viivoiksi.

Kitti ei selvitä tarpeeksi selvästi, mitä käsitteillä vaalea fakultatiivinen viiva ja fakultatiivinen värjäytyminen tarkoitetaan. Yleensä fakultatiivinen-sanalla tarkoitetaan, että asialla voi olla molemmat puolet eli esimerkiksi fakultatiivinen anaerobinen bakteeri tulee toimeen sekä hapettomissa että hapellisessa ympäristössä. Tuloksien tulkinnassa sanaa fakultatiivinen ei otettu huomioon, vaan pyrittiin samaan myös fakultatiiviset viivat näkyviin. Jos fakultatiivisella tarkoitetaan sanamukaisesti valinnaista, testi toimi jo alusta alkaen moitteettomasti ja vain kolme kantaa (kanta nro 3 *M. scrofulaceum*, kanta nro 12 *M. chelonae* ja 19. *M. smegmatis* / interkalibrointi näyte) olisi antanut tulokset, joita ei olisi voitu tulkita kyseisellä kitillä.

Kitti tunnisti kaikki mykobakteerit sukutasolla oikein. Testiä olisi hyvä kokeilla erilaisilla mykobakteerin lähisukulaisbakteereilla, esimerkiksi Nocardia-bakteereilla, joiden erottaminen mykobakteereista on ongelmallista. Jo tieto, että kyseessä on mykobakteeri, on usein tarpeellinen.

#### 4.3 Jatkomahdollisuudet

Kitin ohjeen perusteella ylimääräisiä viivoja saattaa muodostua, jos PCR-tuotetta on liikaa. Näin ollen kitin toimivuutta kokeiltaisiin seuraavaksi tekemällä laimennussarja PCR-tuotteesta ja katsottaisiin, vaikuttaako tämä tulokseen.

Kitin valmistajalta on tiedusteltu, mitä tarkoitetaan fakultatiivisella värjäytymisellä ja kuinka tärkeänä vaaleita viivoja pidetään tunnistamisen kannalta. Valmistaja selvittelee vastausta. Jos mahdollista, niin voitaisiin myös keskustella muiden tätä kittiä käyttäneiden kanssa.

Kittiä olisi hyvä kokeilla kitin valmistajan suosittamalla laitteella, sillä välttämättä työssä tehdyt laitteistojärjestelyt eivät riittäneet oikeiden tulosten saamiseksi. Mäkisen ym. tutkimuksessa on todettu, että hybridisaatiolämpötilalla on vaikutusta tulokseen. Jos lämpötila oli liian alhainen, alkoi muodostua ylimääräisiä viivoja.

Jatkossa kitin toimivuutta olisi hyvä kokeilla suuremmalla määrällä eläimistä eristettyjä kantoja, jotta saataisiin parempi kuva siitä, kuinka kitti sopii eläinkannoille. Lisäksi ristiriitaisissa tuloksissa olisi hyvä tarkistaa eristetyn kannan alkuperäinen nimi uudelleen.

## 5 YHTEENVETO

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin GenoType® Mycobacterium CM -kitin soveltuvuutta eläimistä eristetyille mykobakteerikannoille. Tavoitteena oli löytää Eviran eläintautibakteriologian ryhmän käyttöön AccuProbe-testin rinnalle monipuolisempi menetelmä, jolla pystytään tunnistamaan mahdollisimman monta tärkeimpiin mykobakteerilajeihin kuuluvaa mykobakteeria. Työssä käytettiin sekä ATCC-kantakokoelman että eläinnäytteistä eristettyjä kantoja. Testiä opeteltiin käyttämään *M. avium* ATCC 25291 -kannalla. Seuraavaksi menetelmää testattiin eläinkannoilla sekä *M. intracellulare* ATCC 13950- ja *M. tuberculosis* ATCC 25177 -kannoilla, jolloin huomattiin vaaleiden viivojen muodostumisessa ongelmia. Tätä ongelmaa selvitettiin kiinnittämällä huomiota substraatin vaikutusajan merkitykseen ja hybridisaatiovaiheen lämpötilan oikeellisuuteen. Kun hybridisaatiovaiheen lämpötiloissa huomattiin heittoa raja-arvoista, kehitettiin ravistelevaa haudetta / inkubaattoria vastaavia laitteita.

Kitti toimi moitteettomasti sukutasolla ja 89,5 prosenttisesti myös tummien viivojen kohdalta lajitasolla. Ongelmia aiheuttivat erityisesti ylimääräiset vaaleat viivat. Myös fakultatiivisten viivojen puuttuminen vaikeutti tulosten tulkitusta erityisesti, koska kitin valmistajan työohje ei ollut selkeä tältä osin. Saatut tulokset antavat kuitenkin hyvän pohjan jatkaa GenoType® Mycobacterium CM -kitin validointia suuremmalla kantamäärällä.

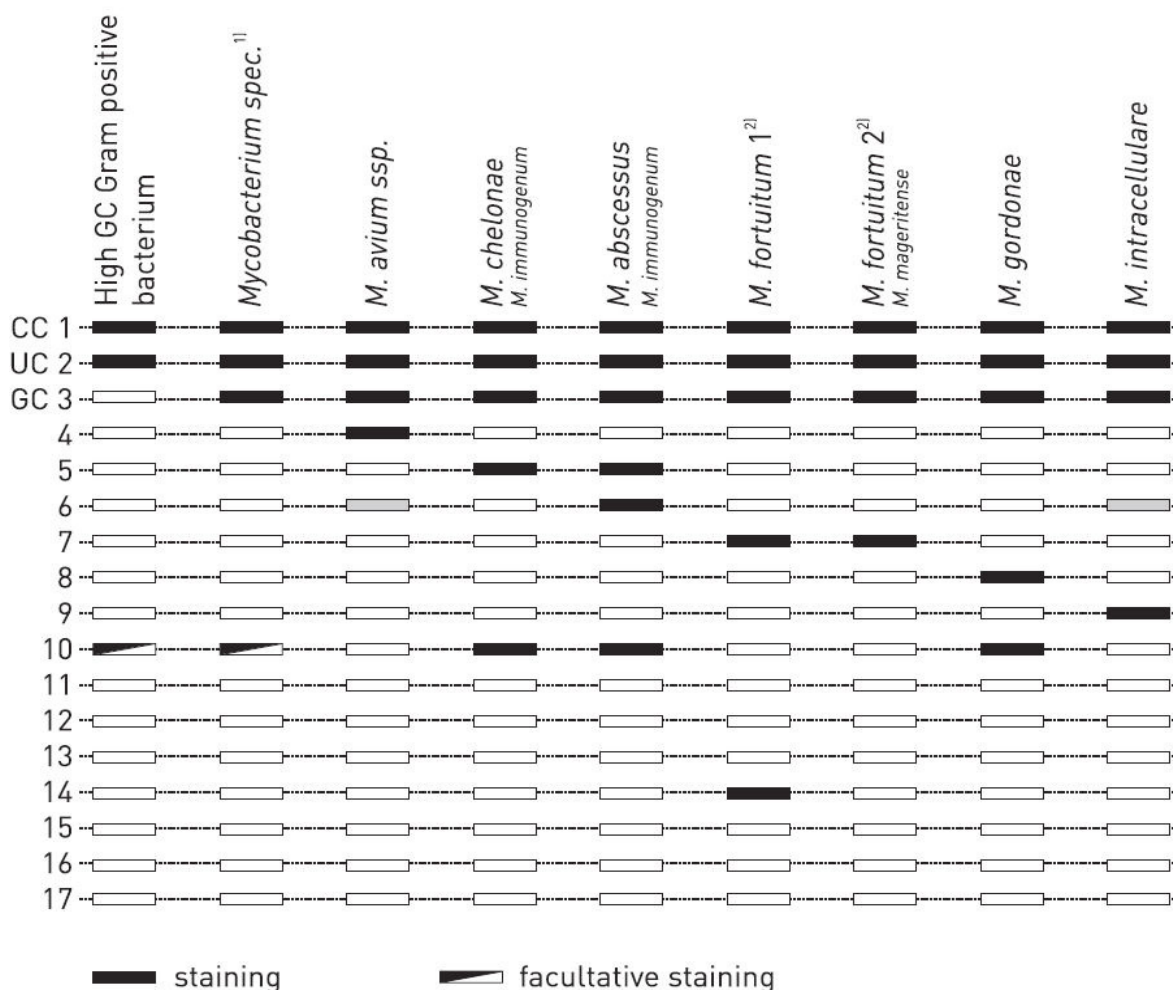
## VIITELUETTELO

- [1] Lukkari Susanna, *Nautojen paratuberkuloosi-aiheuttajabakteerin ominaisuudet, patogeneesi ja diagnostiikka*. Lisensiaatintutkielma. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Helsinki. 2007.
- [2] Tiilikainen, Anja S. ym. *Lääketieteellinen mikrobiologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 8. uud. painos. 1998 (1997).
- [3] Coronaria Media Oy. *Tohtorin lääkärikirja haku* [online-tietokanta]. Julkaisu-aika tuntematon [viitattu 24.9.2007]. Saatavissa: <http://www.tohtori.fi/?page=6625671&search=apatogeeninen>
- [4] Helsingin yliopiston avoin yliopisto. *Terveys-sanasto* [online-tietokanta]. 2000 [viitattu 24.9.2009]. Saatavissa: <http://www.avoin.helsinki.fi/laaketiede/sanasto.asp?show=O>
- [5] Eskola, Jussi - Soini, Hanna, Nykyaikainen mykobakteeridiagnostiikka. *Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim* 120. vuosikerta (18/2004), s. 2232 - 2239.
- [6] Pelkonen Paula, *Mycobacterium avium -kantojen molekyylibiologinen erotteilu*. Syventävät opinnot. Helsingin yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Helsinki. 1999.
- [7] Eskola, Juhani ym. *Infektiosairaudet*. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 2. uud. painos. 1998 (1998).
- [8] Kansanterveyslaitos. *Tuberkuloosi* [verkkodokumentti]. Julkaisuaika tuntematon, päivitetty: 21.8.2007 [viitattu 26.9.2007]. Saatavissa: [http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa\\_terveydesta/terveys\\_ja\\_sairaudet/infektio\\_taudit/tuberkuloosi/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa_terveydesta/terveys_ja_sairaudet/infektio_taudit/tuberkuloosi/)
- [9] Ruutu, Petri. *Tuberkuloosi* [verkkodokumentti]. Kansanterveyslaitos. 24.10.2003 [viitattu 26.9.2007]. Saatavissa: [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=sae07050](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=sae07050)
- [10] Ruutu, Petri - Soini, Hanna. *Tuberkuloosi* [verkkodokumentti]. Kansanterveyslaitos. 31.1.2007 [viitattu 26.9.2007]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ktl.mat?p\\_artikkeli=mat00022](http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ktl.mat?p_artikkeli=mat00022)
- [11] Kansanterveyslaitos. *Mykobakteeri-infektiot* [verkkodokumentti]. Julkaisuaika tuntematon, päivitetty: 24.5.2007 [viitattu 25.9.2007]. Saatavissa: [http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/infe/julkaisut/tartuntataudit\\_suomessa\\_vuonna\\_2006/mykobakteeri-infektiot\\_2006/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/infe/julkaisut/tartuntataudit_suomessa_vuonna_2006/mykobakteeri-infektiot_2006/)
- [12] Ali-Vehmas, Terhi - Moisander, Anna-Maria - Soini, Hanna, Yleiskatsaus mykobakteerioosien esiintymisestä ja Suomen tilanteesta. *Suomen eläinlääkärilehti* (2004, 110, 2), 79 - 84.
- [13] Katila, Marja-Leena ym. Atyyppisten mykobakteerien aiheuttama tautikirjo. *Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim* 120. vuosikerta (18/2004), s. 2240 - 2246.

- [14] Saari, Seppo ym. Yleistynyt *Mycobacterium avium-intracellulare*-infektio kääpiösnautserilla - Esimerkki koiran perinnöllisestä alttiudesta infektioitaudille? *Suomen eläinlääkärilehti* (2001, 107, 1), s. 7 - 13.
- [15] Rimaila-Pärnänen, Eija - Seppänen, Jaana - Vennerström, Pia, Kalatuberkuloosi on yleinen akvaariokalojen tauti. *Suomen eläinlääkärilehti* (2005,111,5), s. 235 - 238.
- [16] Seppänen, Jaana. Sian mykobakteerit. *Eläinlääkärpäivien luentokokoelma* (1999), s. 159 - 161.
- [17] Tuominen ym. Paratuberkuloosiriski suomalaisessa emolehmätuotannossa ja eri toimenpiteiden vaikutus siihen. *Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos* (02/2004), s. 16 - 18.
- [18] Gen-Probe. *Mycobacteriology* [tuotetiedot]. Julkaisuaika tuntematon [viitattu 22.10.2007]. Saatavissa: [http://www.gen-probe.com/prod\\_serv/mycobac\\_accuprobe.asp](http://www.gen-probe.com/prod_serv/mycobac_accuprobe.asp)
- [19] Innogenetics. *Inno-Lipa Mycobacteria v2* [verkkodokumentti]. Julkaisuaika tuntematon [viitattu 17.10.2007]. Saatavissa: <http://www.innogenetics.com/site/prodview.asp?id=40>
- [20] Hain Lifescience. *Molecular biological diagnostics* [tuotetiedot]. 11.9.2007 [viitattu 9.11.2007]. Saatavissa: [http://www.hain-lifescience.com/products/molecular\\_biological\\_diagnostics.html#N3CC](http://www.hain-lifescience.com/products/molecular_biological_diagnostics.html#N3CC)
- [21] Hain Lifescience. *GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium AS, GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM* [verkkodokumentti]. 12.8.2004, päivitetty 17.8.2004 [viitattu 17.10.2007]. Saatavissa: [http://www.hain-lifescience.com/pdf/myco\\_flyer\\_eng.pdf](http://www.hain-lifescience.com/pdf/myco_flyer_eng.pdf)
- [22] Hain Lifescience. *GenoType<sup>®</sup> Mycobacteria Direct* [verkkodokumentti]. 12.8.2004, päivitetty 17.8.2004 [viitattu 17.10.2007]. Saatavissa: [http://www.hain-lifescience.com/pdf/4000\\_flyer\\_eng.pdf](http://www.hain-lifescience.com/pdf/4000_flyer_eng.pdf)
- [23] Mäkinen, Johanna ym. Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA Assays for Identification of Finnish Mycobacterial Isolates. *Journal of clinical Microbiology* (2002, Vol. 40, No. 9), s. 3478 - 3481.
- [24] Sarkola, A. ym. Prospective evaluation of the GenoType Assay for routine identification of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2004, 23), s. 642 - 645.
- [25] Hain Lifescience. *GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM* [verkkodokumentti]. 7/2007 [viitattu 26.9.2007]. Saatavissa: [http://www.hain-lifescience.com/pdf/299xx\\_pbl.pdf](http://www.hain-lifescience.com/pdf/299xx_pbl.pdf)
- [26] Opetushallitus. *Nukleiinihappojen leimausmenetelmät* [verkkodokumentti]. Julkaisuaika tuntematon [viitattu 31.10.2007]. Saatavissa: <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/nhleim.html>

## Testin tulkitintaulukko

### Interpretation Chart



Band No. 1 (CC): Conjugate Control

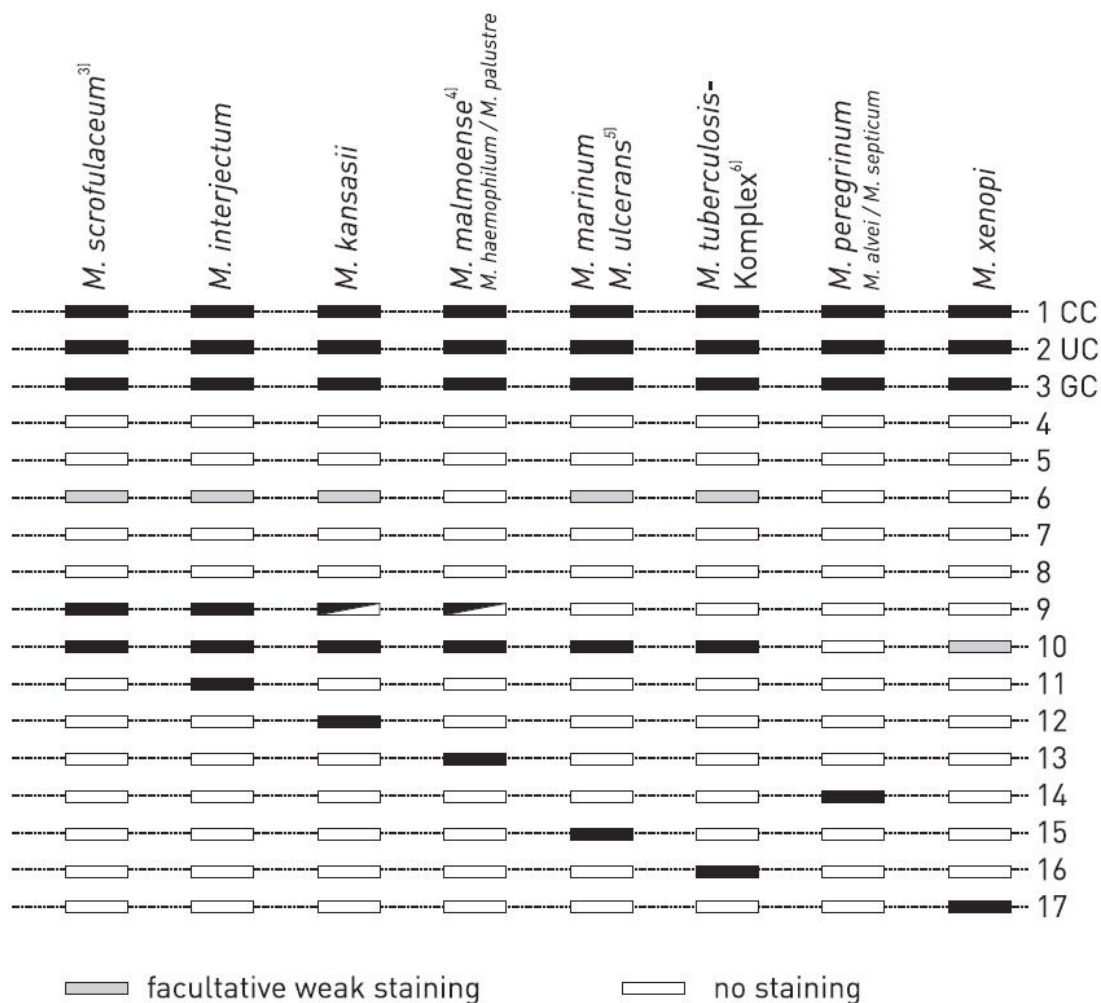
Band No. 2 (UC): Universal Control

Band No. 3 (GC): Genus Control

<sup>1)</sup> Species may possibly be further differentiated with the **GenoType® Mycobacterium AS** kit.

<sup>2)</sup> Due to variations in the probe region *M. fortuitum* is divided into two groups.

<sup>3)</sup> *M. "paraffinicum"* and *M. parascrofulaceum* show the same banding pattern as *M. scrofulaceum*.



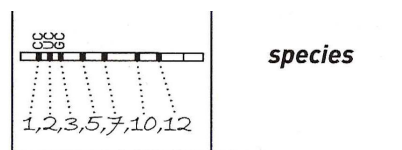
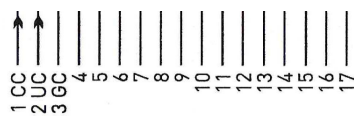
<sup>4)</sup> *M. nebraskense* shows the same banding pattern. *M. haemophilum* can be identified by the **GenoType® Mycobacterium AS** kit.

<sup>5)</sup> *M. ulcerans* can be identified by the **GenoType® Mycobacterium AS** kit.

<sup>6)</sup> For further differentiation use the **GenoType® MTBC** kit.



## Arviointipaperi



# GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM/AS

VER 1.0

**HAIN**  
LIFESCIENCE



Mikrobiologian tutkimusyksikkö  
Eläintautibakteriologia

Vastuuhenkilö Jaana Seppänen  
Laatija Sini Mutikainen  
Hyväksyjä

Sivu/sivut 1 / 9  
Työohje Evira  
Käyttöönotto

## GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM

# GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM -työohje

## 1 Menetelmä

Kyseessä on kaupallinen DNA-liuska menetelmään perustuva kitti GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM (Common Mycobacteria), Hain Lifescience.

## 2 Soveltuvuus

GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM soveltuu seuraavien mykobakteerilajien tunnistamiseen: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* -kompleksi ja *M. xenopi*.

## 3 Määritelmä

Mykobakteerit ovat *Mycobacterium*-sukuun kuuluvia haponkestäviä sauvabakteereita. Niiden joukossa on sekä patogeenisia, apatogeenisia että opportunistisia bakteereita. Tärkeimpiä taudinaiheuttajia ovat *M. tuberculosis* (ihmisten tuberkuloosi), *M. bovis* (nautatuberkuloosi) ja *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (paratuberkuloosi). Sikojen imusolmuke- ja maksamuutoksista eristetään usein *M. avium*.

## 4 Periaate

Lajinmääritys kitin avulla perustuu kolmeen päävaiheeseen. Ensimmäiseksi DNA eristetään viljellystä materiaalista. Tämän jälkeen DNA monistetaan PCR:llä biotinyloiduilla alukkeilla. Lopuksi käänteisen hybridisaation avulla saadaan selville bakteerin laji.

Hybridisaatio sisältää seuraavat vaiheet: monistetun tuotteen kemiallinen denaturaatio, monistetun yksijuosteisen biotiinileimatun tuotteen hybridisaatio membraaniin sidottuihin koettimiin, stringent-pesu, streptavidini/alkalinen fosfataasi (AP) -konjugaatin lisäys ja AP:n epäsuora värireaktio. Templaatin avulla tulkitaan saatu viivakuvio.

## 5 Laitteet ja välineet

- 5.1 kertakäyttökäsineitä
- 5.2 kertakäyttöhihansuojia
- 5.3 1 ja 10 µ siirrotussilmukoita
- 5.4 eppendorf-putkia
- 5.5 safe-lock-eppendorf-putkia
- 5.6 lämpöhaude

## GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM

---

- 5.7 ultraäänihaude  
5.8 sentrifugi
- Eppendorf Sentrifugi 5415D (eristys)
  - Sanyo GWB Micro Centaur MSE (PCR)
- 5.9 kertakäyttöisiä pipetinkärkiä filttereillä  
5.10 säädettäviä pipettejä: 0,5 - 1000 µl  
5.11 PCR-putkia  
5.12 PCR-laite  
5.13 kalibroitu digitaalinen lämpömittari  
5.14 tarjotin (kaivot)  
5.15 pinsetit  
5.16 sekoittava taso/lämpöhaude -yhdistelmä  
5.17 vesihaude  
5.18 sekoittava taso  
5.19 foliokaivot, styroksikansi  
5.20 reagenssien kuljetusastia  
5.21 ajanottaja  
5.22 maitoputkia  
5.23 imukykyistä paperia

## 6 Reagenssit

### Kitin sisältämät reagenssit:

- 6.1 Kalvoliuskat spesifisillä koetinpinnoitteilla (STRIPS)
- 6.2 Aluke-nukleotidi-seos (PNM)
- sisältää spesifisiä biotinyloituja alukkeita, nukleotideja väriainetta
- 6.3 Denaturaatioliuos (DEN)
- käyttövalmis
  - sisältää < 2 % NaOH:a, väriainetta
- 6.4 Hybridisaatiopuskuri (HYB)
- käyttövalmis
  - sisältää 8 - 10 % anionisia tensidejä, väriainetta
- 6.5 Stringent-pesuliuos (STR)
- käyttövalmis
  - sisältää > 25 % kvaternaalisia ammoniumyhdisteitä, < 1 % anionisia tensidejä, väriaineita
- 6.6 Huuhteluliuos (RIN)
- käyttövalmis
  - sisältää puskuria, < 1 % NaCl:a, < 1 % anionisia tensidejä
- 6.7 Konjugaattikonsentraatti (CON-C), konsentraatti
- sisältää streptavidinikonjugoitua alkaalista fosfataasia, väriainetta

## GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM

---

- 6.8** Konjugaattipuskuri (CON-D)
- sisältää puskuria, 1 % estoreagenssia, < 1 % NaCl:a
- 6.9** Substraattikonsentraatti (SUB-C), konsentraatti
- sisältää dimetyylisulfoksidia, substraattiliuosta
- 6.10** Substraattipuskuri (SUB-D)
- sisältää puskuria, < 1 % MgCl<sub>2</sub>:a, < 1 % NaCl:a

### Muut reagenssit:

- 6.11** PCR-vesi
- 6.12** Steriili vesi
- 6.13** Lämmönkestävä DNA-polymeraasi, Finnzymes
- 6.14** 10 X polymeraasi-inkubointipuskuri (sis. MgCl<sub>2</sub>), Finnzymes

### Reagenssien säilytys

Aluke-nukleotidi-seos (PNM) säilytetään 2 - 8 °C:ssa. Jos säilytys kestää yli 4 viikkoa, säilytys -20 °C:ssa. Toistuvaa sulatusta ja jäädytystä tulee välttää kuten myös seoksen kontaminoimista.

Muut reagenssit säilytetään 2 - 8 °C:ssa. Reagensseja ei tule käyttää niiden vanhentumispäivän jälkeen.

## 7 Suoritus

### 7.1 DNA:n eristäminen

- Työn aikana käytetään hihansuojia ja hanskoja.
- Lämpöhaude laitetaan lämpenemään +95 °C:seen.
- Ultraäänihauteen on hyvä olla päällä noin 10 minuuttia ennen näytteiden laittoa.
- Safe-lock-ependorf-putkeen pipetoidaan noin 300 µl PCR-vettä, johon suspensoidaan bakteerimassaa tarvittava määrä silmukalla (1 µl:n silmukallinen).
- Inkuboidaan ainakin 20 minuuttia + 95 °C:n lämpöhauteessa
- Inkuboidaan 15 minuuttia ultraäänihauteessa.
- Sentrifugoidaan 5 minuuttia täydellä nopeudella (16110 rcf, 13200 rpm, Eppendorf Sentrifugi 5415D).
- 5 µl supernatanttia käytetään suoraan PCR:ään.
- Jos tarkoituksena on säilyttää DNA, supernatantti siirretään toiseen putkeen ja laitetaan -20 °C:n pakastimeen.

## GenoType® Mycobacterium CM

### 7.2 PCR (monistaminen)

- Kaikissa työvaiheissa käytetään kertakäyttökäsitteitä ja -hihansuojia.
- Kaikki tarvittavat välineet ja laminaarikaappi desinfioidaan, jonka jälkeen annetaan kaapin olla käynnissä noin puolituntia ennen työn aloittamista.
- Jääkaapista ja pakkasesta otetaan PNM-seos, 10 x polymeraasi-inkubointipuskuri, 2 U/μl lämmönkestävä DNA-polymeraasi ja PCR-vesi, joita pidetään työnajan jäissä olevassa telineessä.
- Eppendorf-putkia ja PCR-putkia otetaan tarvittavat määrät jäissä olevaan telineeseen.
- Tarvittaessa tehdään sekä positiivinen että negatiivinen kontrollinäyte (5 μl vettä DNA:n sijasta).
- Mastermix valmistetaan ensin ennen DNA:n lisäystä eppendorf-putkeen erillisessä mastermix-laboratoriossa. Reagenssien määrät ovat alla olevassa taulukossa. Sekoitetaan hyvin (ei vorteksointia). Jos näytteitä on vain muutama, voi oikeat määrät reagensseja pipetoida myös suoraan PCR-putkiin.
- Mastermix-liuosta pipetoidaan 45 μl kuhunkin PCR-putkeen ja putket merkataan näytteiden mukaan.
- DNA-liuos otetaan pakastimesta jäissä olevaan telineeseen. Jos monistus tehdään samana päivänä kuin eristys, DNA voidaan laittaa suoraan jäihin.
- Näyte lisätään PCR-putkiin näytteenlisäyslaminarissa, joka desinfioidaan ennen ja jälkeen näytteenlisäyksen huolella kuten myös tarvittavat välineet.
- Näytettä lisätään 5 μl kutakin näytettä vastaavaan PCR-putkeen.
- PCR-putkiin pipetoidaan taulukon mukaiset määrät kyseisiä reagensseja (Mastermix + DNA-liuos):

Määrä	Reagenssi
35 μl	PNM (aluke/nukleotidi-seos)
5 μl	10 x polymeraasi-inkubointipuskuri
0,5 μl (1U)	2 U/μl lämmönkestävä DNA-polymeraasi
4,5 μl	PCR vesi
5 μl	DNA-liuos
Kokonaistilavuus	50 μl

- Sentrifugoidaan nopeasti (painetaan "pulse"-nappia pohjassa, kunnes näytössä lukee 10) PCR-laitteen vieressä olevalla sentrifugilla (Sanyo GWB Micro Centaur MSE).



Mikrobiologian tutkimusyksikkö  
Eläintautibakteriologia

Vastuuhenkilö Jaana Seppänen  
Laatija Sini Mutikainen  
Hyväksyjä

Sivu/sivut 5 / 9  
Työohje Evira  
Käyttöönotto

## GenoType® Mycobacterium CM

### PCR-ohjelma:

5 min	95 °C	1 sykli
30 sek	95 °C	} 10 sykliä
2 min	58 °C	
25 sek	95 °C	} 20 sykliä
40 sek	53 °C	
40 sek	70 °C	
8 min	70 °C	1 sykli

- Ohjelma on tallennettu monistuslaite 2:lle nimellä "TUBI".
- PCR -tuotteen säilytys + 4 - -20 °C:ssa.

### 7.3 Hybridisaatio

#### Esivalmistelut

1. Sekoittava taso/lämpöhaude yhdistelmä esilämmitetään +45 °C:seen (+/-1 °C). Lämpötila tulee säätää lämpöblokista noin +47,3 °C:seen, jotta lämpötila on oikea kaivossa. Lämpötila tarkistetaan kaivon asetetusta digitaalisesta lämpömittarista. Eri kaivoissa lämpötilat kuitenkin vaihtelevat, mikä on hyvä ottaa huomioon ja säätää lämpötilaa sen mukaan. Laite kannattaa laittaa päälle heti aamusta, että lämpötila ehtii tasaantua.
2. Kaksi kaivojen kokoista parafilmin palaa laitetaan lämpenemään styroksikannen ja kaivojen päälle tulevan folion väliin.
3. Vesihaude (serologian laboratorio) lämmitetään +42,0 °C:seen.
4. Liuosten kuljettamiseen tarkoitettu styroksilla vuorattu dekanterilasi laitetaan lämpenemään +45 °C:n lämpökaappiin. Kuljetusastiaa voidaan säilyttää myös koko ajan lämpökaapissa.
5. HYB- ja STR-liuokset esilämmitetään +37 - 45 °C:seen ennen käyttöä. Liuokset laitetaan 42 °C:n (serologian) vesihauteeseen noin kahta tuntia ennen työn aloittamista.
6. Muut reagenssit lämmitetään huoneenlämpötilaan, paitsi CON-C ja SUB-C.
7. Kaikki tarvittavat välineet desinfioidaan ja laitetaan laminaarikaappiin noin puolta tuntia ennen työn aloittamista.
8. Reagensseissa ei saa olla sakkaa, CON-D läpinäkymätön. Sekoitetaan, jos tarpeen.



Mikrobiologian tutkimusyksikkö  
Eläintautibakteriologia

Vastuuhenkilö	Jaana Seppänen	Sivu/sivut	6 / 9
Laatija	Sini Mutikainen	<b>Työohje</b>	<b>Evira</b>
Hyväksyjä		Käyttöönotto	

## GenoType® Mycobacterium CM

---

9. Konjugaattikonsentraatti (CON-C, oranssi) ja substraattikonsentraatti (SUB-C, keltainen) laimennetaan 1 : 100 kullekin kuuluvaan puskuriin (CON-C → CON-D, SUB-C → SUB-D). Eli jokaista liuskaa kohden lisätään 10 µl konsentraattia 1 ml:n kyseiselle liuokselle tarkoitettua puskuria. CON-C ja SUB-C otetaan huoneenlämpötilaan juuri ennen lisäystä. Liuoksia tehdään tarvittavat määrät (+vähän ylimääräistä, 250 - 500 µl) maitoputkiin. SUB-C suojataan valolta foliolla. Sekoitetaan hyvin. Liuokset ehtii hyvin valmistaa hybridisaatioliuoksen inkuboinnin aikana.
10. CON-C liuotetaan aina ennen jokaista käyttöä.
11. Laimennettu SUB-C on stabiili neljä viikkoa, jos se säilytetään huoneen lämpötilassa ja suojataan valolta.

### Toteutus

1. Kaikissa työvaiheissa käytetään kertakäyttöhihansuojia ja -käsineitä.
2. Liuskat merkataan, jos näytteitä on useita.
  - Liuskat otetaan ulos putkesta käyttäen pinsettejä ja merkataan ne kynällä värillisen merkin alapuolelta. Merkitsemisen jälkeen liuskat laitetaan maitoputkeen tai takaisin säilytysputkeen, jos se on tyhjä.
3. Jääpaloja haetaan läpinäkyvään astiaan ja monistetut näytteet laitetaan esikäsitteilylaboratorion pakkasesta tai suoraan PCR-laitteesta keltaiseen telineeseen jääpaloilla täytettyyn astiaan.
4. Muoviset kaivot merkataan tussilla näytteitä vastaavaksi.
5. Jokaisen kaivon kulmaan pipetoidaan 20 µl denaturaatioliuosta (DEN, sininen).
6. Kaivoon lisätään 20 µl monistettua näyteliuosta. Liuos sekoitetaan hyvin pipetoimalla liuosta ylös ja alas. Inkuboidaan 5 minuuttia huoneen lämpötilassa.
  - Jos liuskoja ei ole vielä merkattu, otetaan liuskat ulos putkesta käyttäen pinsettejä ja merkataan ne kynällä värillisen merkin alapuolelta. Liuskat voi merkata myös jo ennen työn aloittamista ja laittaa takaisin säilytysputkeen. Juuri ennen inkuboinnin loppumista haetaan hybridisaatiopuskuri valmiiksi dekanterilasikuljetusastialla.
7. Jokaiseen kaivoon lisätään varovaisesti 1 ml esilämmitettyä hybridisaatiopuskuria (HYB, vihreä). Tarjotinta ravistetaan hellävaraisesti, kunnes liuos on yhtenäisen värinen.
8. Liuskat asetetaan jokaiseen kaivoon.
  - Liuskojen tulee olla peitettynä kokonaan liuoksella. Päälystetty puoli pitää olla ylöspäin. Pinsettejä käytetään liuskoja käsiteltäessä. Jos liuskat kääntyvät väärinpäin, käännetään ne takaisin. Pinsetit puhdistetaan joka käytön jälkeen, jotta vältetään kontaminaatioilta.

## GenoType® Mycobacterium CM

---

9. Tarjotin asetetaan sekoittava taso/lämpöhaude-yhdistelmän foliokaivoihin (+45 °C) ja inkuboidaan 30 minuuttia.
  - Riittävän lämmönsiirron sallimiseksi tarjotin upotetaan folioon siten, että ainakin 1/3 sen korkeudesta on folion peitossa.
  - Kaivojen päälle on hyvä laittaa kevyesti parafilmi, jotta alumiinifolio ei kontaminoi seuraavia kaivoja.
  - Ravistusnopeus noin 82 rpm. Sekoitusnopeus säädetään sellaiseksi, että saavutetaan jatkuvasti ja kokonaan sekoittuva liuos.
  - Tällä aikaa on hyvä tehdä valmiiksi konjugaatti- ja substraattiliuokset.
  - Juuri ennen inkuboinnin loppumista haetaan stringent-pesuliuos valmiiksi dekantterilasikuljetusastialla.
10. Hybridisaatio puskuri imetään kokonaan pois pipetillä.
11. Stringent-pesuliuosta (STR, punainen) lisätään jokaiseen kaivoon 1 ml. Inkuboidaan 15 minuuttia 45 °C:n lämpötilassa sekoittava taso/lämpöhaude-yhdistelmällä.
12. Tästä eteenpäin työskennellään huoneenlämpötilassa.
13. Poista kokonaan STR-pesuliuos
  - Pesuliuos pipetoidaan jätesäiliöön. Kaikki jäljelle jäänyt neste poistetaan kääntämällä tarjotin ylösalaisin ja hellävaraisesti lyömällä tarjotinta imukykyiselle paperille. Tämä koskee myös kaikkia muita pesuvaiheita.
14. Jokainen liuska pestään kerran 1 ml:lla Rinse-liuosta (RIN) 1 minuutin ajan sekoittavalla tasolla (serologian laboratorio, vetokaappi). Kaada RIN pois inkuboinnin jälkeen.
15. Jokaiseen kaivoon lisätään 1 ml laimennettua konjugaattia ja inkuboidaan 30 minuuttia sekoittavalla tasolla.
16. Liuos poistetaan ja jokainen liuska pestään kahdesti 1 minuutin ajan 1 ml:lla RIN-liuosta ja kerran 1 minuutin ajan 1 ml:lla tislattua vettä sekoittavalla tasolla.
  - Jokaisen pesun jälkeen liuos pipetoidaan pois ja kaikki jäljelle jäänyt neste poistetaan kääntämällä tarjotin ylösalaisin ja hellävaraisesti lyömällä tarjotinta imukykyiselle paperille.
17. Jokaiseen kaivoon lisätään 1 ml laimennettua substraattia ja inkuboidaan valolta suojattuna ilman sekoitusta. Laminaarikaapista kannattaa sammuttaa valot ja laittaa alumiinifolio kaivojen päälle.
  - Aika voi olla 3 - 20 minuutin väliltä riippuen testin olosuhteista (esimerkiksi huoneen lämpötilasta). Substraatin inkuboinnin jatkaminen saattaa johtaa lisääntyneeseen taustan värjäytymiseen ja vaikuttaa tulosten tulkintaan. Aikaisempien tulosten perusteella noin 12 minuutin vaikutusaika antaa parhaat tulokset.





Mikrobiologian tutkimusyksikkö  
Eläintautibakteriologia

Vastuuhenkilö	Jaana Seppänen	Sivu/sivut	8 / 9
Laatija	Sini Mutikainen	<b>Työohje</b>	<b>Evira</b>
Hyväksyjä		Käyttöönotto	

## GenoType® Mycobacterium CM

---

18. Reaktio pysäytetään huuhtomalla kahdesti lyhyesti tislatulla vedellä.
19. Liuskat poistetaan pinseteillä tarjottimelta ja ne kuivataan imukykyisellä paperilla.

### 8 Tulokset

Liuskat säilytetään valolta suojattuna. Kun käytät arviointipaperia, kohdista kehittyneet liuskat oletetuille alueille tasaamalla CC- ja UC-vyöhykkeet paperiin merkattujen kullekin kuuluvan viivan kanssa. Kirjoita ylös positiiviset signaalit viimeiseen palstaan, määritä lajit käyttäen apuna tulkintakaavioita ja kirjaa nimetyn lajin nimi viimeiseen palstaan. Templaatti toimii myös arvostelun apuna. Jokaisella liuskalla on yhteensä 17 reaktioaluetta.

#### Konjugaattikontrolli (CC)

Viivan pitää kehittyä tälle alueelle. Se kuvaa konjugaatin sitoutumisen tehokkuutta ja substraattireaktiota.

#### Yleinen kontrolli (UC)

Vyöhykkeen kaksi yleinen kontrolli (UC) havaitsee kaikki tunnetut mykobakteerit ja gram-positiiviset bakteerit, joilla on korkea G + C pitoisuus. Jos liuskaan muodostuu sekä yleisen kontrollin että konjugaattikontrollin viiva muiden viivojen täsmäämättä kuitenkin tulkintataulukon viivayhdistelmiin, pitää kyseinen bakteerilaji selvittää muilla menetelmillä.

Ainoastaan ne viivat, jotka ovat suunnilleen yhtä vahvoja tai vahvempia kuin UC-vyöhyke tulee ottaa huomioon.

#### Sukukontrolli (GC)

Värjäytyminen tällä alueella osoittaa mykobakteerisuvun jäsenen läsnäolon Viivan intensiteetti riippuu mykobakteerin lajista. Sukukontrolliviiva voi jäädä pois huolimatta mykobakteerin DNA:n läsnäolosta. Jos kuitenkin lajispesifisten vyöhykkeiden viivoja ilmaantuu, monistumisreaktio on edennyt kunnolla ja testin tulokset ovat voimassa. Kun ei-laji-spesifinen juovakuvio ilmaantuu, juovakuvio, joka osoittaa suuren G + C pitoisuuden omaavien gram-positiivisten bakteerien läsnäolon, voi joissakin harvoissa tapauksissa silti olla peräisin mykobakteerista, jota ei voi todeta tällä kitillä. Lisää mykobakteerilajeja voidaan tunnistaa GenoType Mycobacterium AS -kitillä.

#### Muut juovat

Muut vyöhykkeet ovat spesifisiä koettimia, joiden avulla tunnistetaan mykobakteerilaji. Arviointi on nähtävissä tulkintataulukossa.

Kaikki liuskojen vyöhykkeet eivät näy yhtä voimakkaana signaaleina. Jos monistettua tuotetta on suuria määriä, ylimääräisiä viivoja voi esiintyä.



Mikrobiologian tutkimusyksikkö  
Eläintautibakteriologia

Vastuuhenkilö	Jaana Seppänen	Sivu/sivut	9 / 9
Laatija	Sini Mutikainen	<b>Työohje</b>	<b>Evira</b>
Hyväksyjä		Käyttöönotto	

## GenoType® Mycobacterium CM

---

### 9 Mahdolliset virhelähteet

Kaiken kaikkiaan heikko tai ei signaalia lainkaan (mukaan lukien konjugaattikontrollivyöhyke)

- Huoneen lämpötila on liian alhainen tai reagenssit eivät ole huoneen lämpötilassa.
- Ei lainkaan tai käytetty liian vähän CON-C ja/tai SUB-C -reagensseja.

Heikko tai ei signaalia lainkaan paitsi konjugaattikontrollivyöhykkeellä.

- Eristetyn DNA:n laatu ja/tai määrä ei salli tehokasta monistumista. Tarkista monistuminen 2 % agaroosigeelillä. Mikäli monistunutta DNA:ta ei ole nähtävissä, toista DNA:n eristäminen ja monistaminen. Jos tarpeellista, yritä erilaista DNA:n eristämismenetelmää.
- Inkubointilämpötila liian korkea.
- Eristettyä bakteerilajia ei voida havaita yleisellä kontrollilla (UC) ja sukukontrollilla.

Ei yhtenäinen värjäytyminen

- Liuskat eivät ole olleet kokonaan uponneena inkubointien aikana.
- Tarjotinta ei ole sekoitettu kunnolla.

Paljon taustaväriä

- CON-C:tä ja/tai SUB-S:ää on käytetty liian väkevänä.
- Pesuvaiheita ei ole tehty tarpeeksi huolella.
- Pesuliuos on ollut liian kylmää.

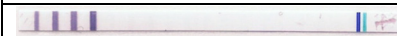
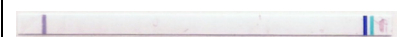






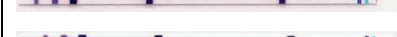
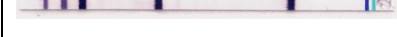
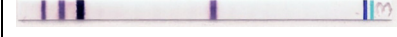
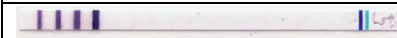



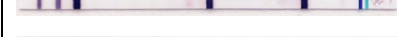






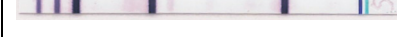
Yllätyksellinen tulos

- Väärä inkubointilämpötila.
- Hybridisaatiopuskuri ja/tai Stringent-pesuliuos eivät ole olleet kunnolla esilämmitettyjä tai sekoitettuja.
- Eristetyn DNA:n ja/tai monistumisen aineiden kontaminoituminen eristetyllä tai monistetulla DNA:lla. Jos monistumisen aineet ovat kontaminoituneet, myös negatiivisen kontrollin juovakuvio on samanlainen
- Kontaminoituminen naapurikaivosta (läikkyminen) hybridisaatiopuskurin lisäyksen aikana.
- Riippuen monistuneen DNA:n käyttömäärästä ja reaktion spesifisistä olosuhteista, voimakas ja nopea värin kehittyminen saattaa tapahtua. Kyseisessä tilanteessa keskeytä substraatin inkubointi heti, kun signaalit ovat selvästi nähtävissä estääksesi ristihybridisoituvien juovien kehittymisen.
- Ei puhdasta kasvustoa alkumateriaalissa.
- Eristettyä bakteerilajia ei voida tunnistaa tällä testillä








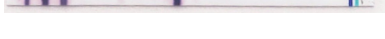
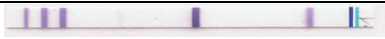

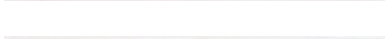

**Liuskat**

Kopioissa kaikki vaaleat viivat eivät näy samanlaisina kuin alkuperäisissä liuskoissa.

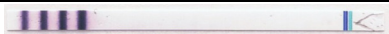

**Koeajo**









8.5.2007	
	<i>M. avium</i> ATCC 25291
	<i>E. coli</i>
16.5.2007	
	<i>M. avium</i> ATCC 25291
	<i>E. coli</i>
25.5.2007	
	17. <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950
	18. <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177
	19. Interkalibrointinäyte
	1. <i>M. fortuitum</i>
	2. <i>M. fortuitum</i>
	3. <i>M. scrofulaceum</i>
	4. <i>M. scrofulaceum</i>
28.5.2007	
	5. <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
	6. <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
	7. <i>M. interjectum</i>
	8. <i>M. marinum</i>
	9. <i>M. marinum</i>
	10. <i>M. xenopi</i>
29.5.2007	
	11. <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. triviale</i>
	12. <i>M. chelonae</i>
	13. <i>M. malmoense</i>
	14. <i>M. malmoense</i>
	15. <i>M. fortuitum</i>
	16. <i>M. gordonae</i>

## Substraatin vaikutusajan testaus









6.6.2007	
	<i>M. avium</i> ATCC 25291, 5 minuuttia
	<i>M. avium</i> ATCC 25291, 10 minuuttia
	<i>M. avium</i> ATCC 25291, 15 minuuttia
	<i>M. avium</i> ATCC 25291, 20 minuuttia
7.6.2007	
	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950, 5 minuuttia
	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950, 10 minuuttia
	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950, 15 minuuttia
	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950, 20 minuuttia
8.6.2007	
	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177, 5 minuuttia
	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177, 10 minuuttia
	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177, 15 minuuttia
	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177, 20 minuuttia

## Uuden laitteen koeajo, 20 minuuttia

3.7.2007	
	<i>M. avium</i> ATCC 25291
	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950

5.7.2007	
	8. <i>M. marinum</i>
	9. <i>M. marinum</i>
	10. <i>M. xenopi</i>
	5. <i>M. avium</i> ssp.
	6. <i>M. avium</i> ssp.
	15. <i>M. fortuitum</i>
	2. <i>M. fortuitum</i>
	14. <i>M. malmoense</i>

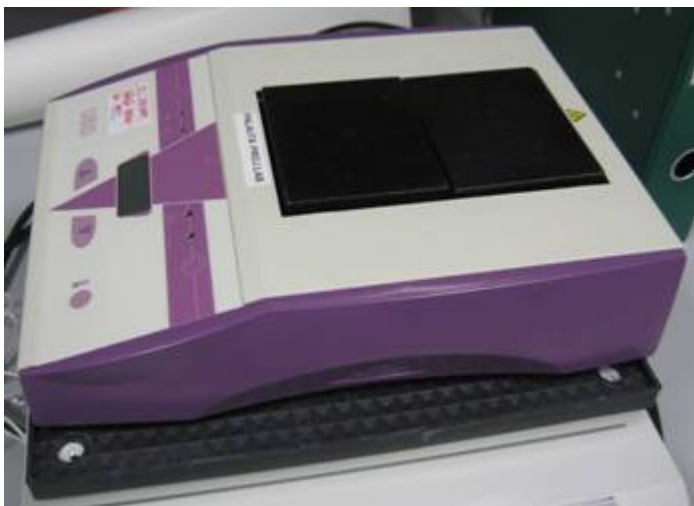
## Uuden laitteen koeajo, 12 minuuttia

12.7.2007	
	8. <i>M. marinum</i>
	9. <i>M. marinum</i>
	10. <i>M. xenopi</i>
	5. <i>M. avium</i> ssp.
	6. <i>M. avium</i> ssp.
	15. <i>M. fortuitum</i>
	2. <i>M. fortuitum</i>
	14. <i>M. malmoense</i>

## Laiteyhdistelmän kokoamisohje



Lämpöhaude.



Lämpöblokit käännettiin toisin päin.



Foliosta muotoiltiin foliokaivot näytekaivoja varten lämpöblokkien päälle.



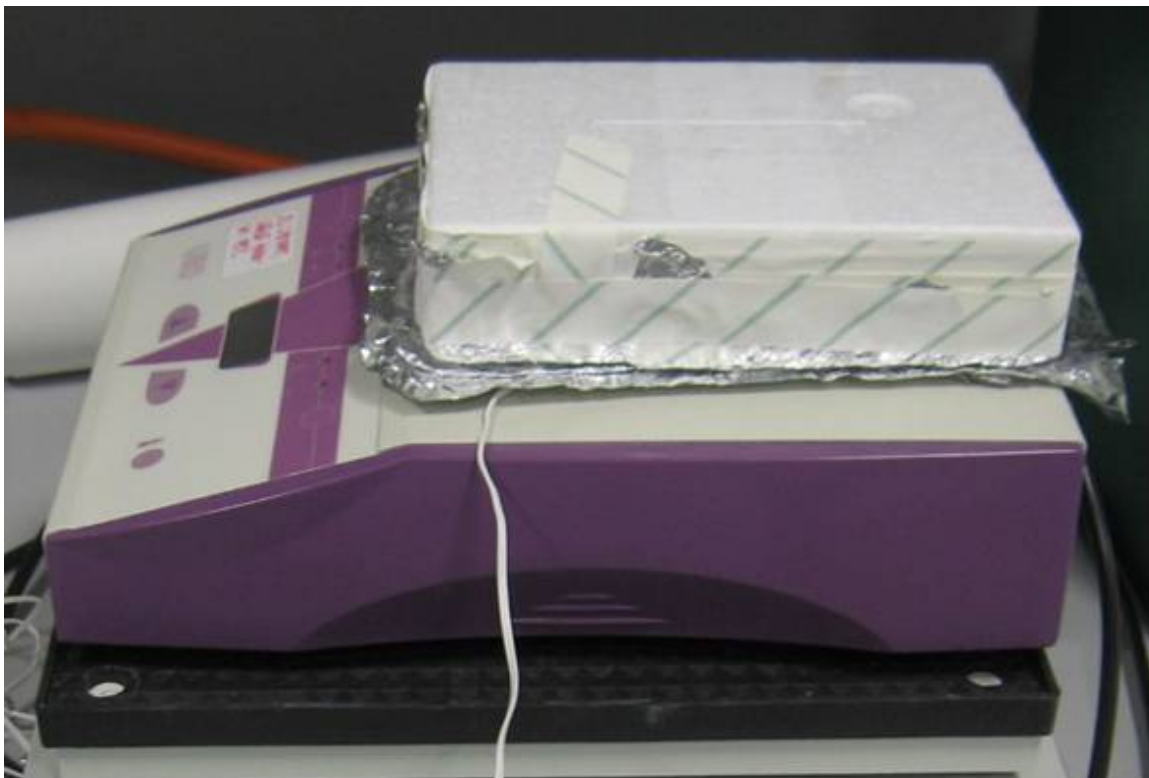
Lämpötiloja mitattiin digitaalisella mittarilla foliokaivoista.



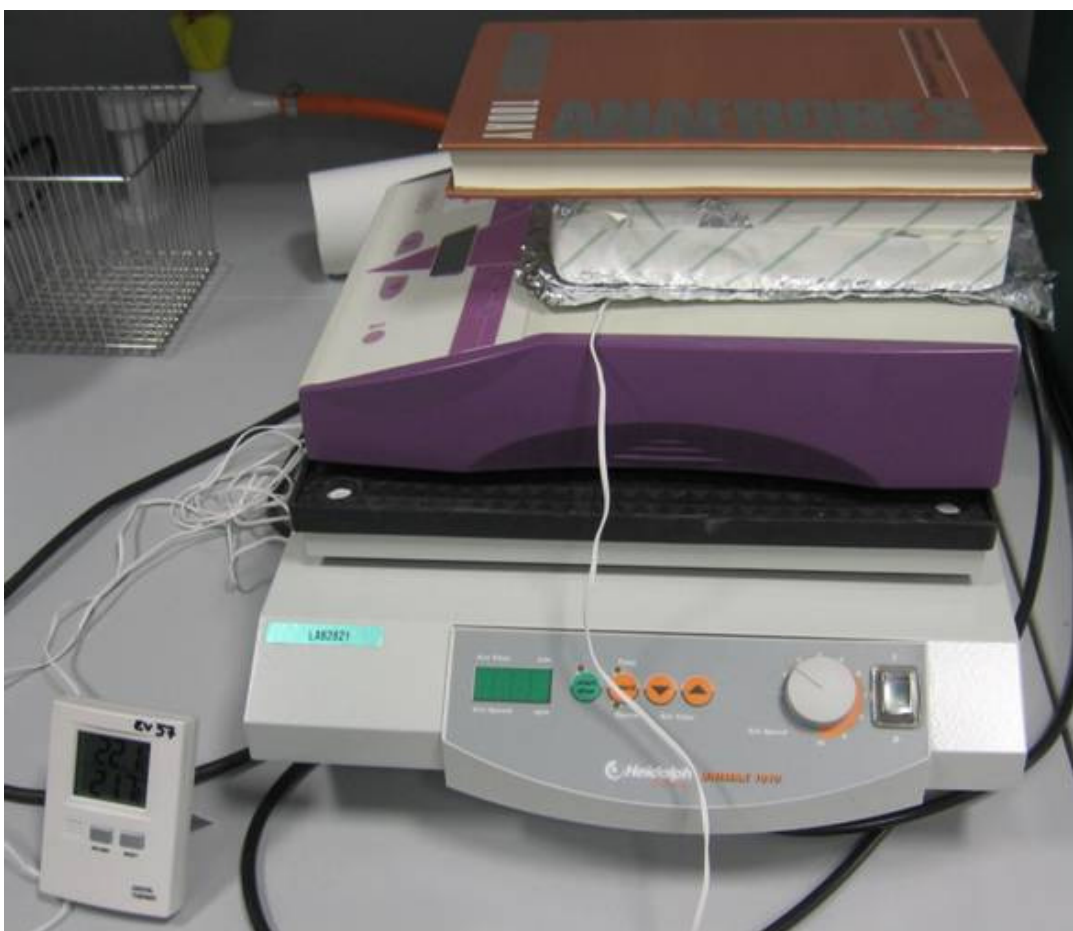
Foliokaivojen päälle laitettiin työn ajaksi foliokansi.



Styroksilevyistä ja foliosta tehtiin kaivojen päälle kansi.



Styroxikansi kaivojen ja foliopaperin päällä.



Laitteyhdistelmä valmiina. Kirja toimii kannen painona, jotta lämpö pysyisi tasaisena.