



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# SOLUVILJELYIDEN MYKOPLASMA- MÄÄRITYSTEN TESTAUS JA VERTAILU

Silja Koskinen

Opinnäytetyö  
Huhtikuu 2017  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboratoriotekniikan koulutus



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboriotekniikan koulutus

KOSKINEN, SILJA:

Soluviljelyiden mykoplasmamääritysten testaus ja vertailu

Opinnäytetyö 48 sivua, joista liitteitä 6 sivua  
Huhtikuu 2017

---

Soluviljelyssä soluja kasvatetaan keinotekoisessa ympäristössä erilaisten tutkimusten käyttöön. Soluviljelyä käytetään laajalti solu- ja molekyylibiologiaan liittyvissä tutkimuksissa. Soluviljelyiden mykoplasmakontaminaatio voi pysyä isoinakin konsentraatioina huomaamattomana ja pysyvistä solulinjoista 15-35 % onkin arvioitu olevan mykoplasmakontaminoituneita. Mykoplasmakontaminaatio on vakava ongelma soluviljelyssä, sillä se voi aiheuttaa monenlaisia poikkeamia soluissa, mikä voi vaikuttaa soluilla tehtäviin tutkimuksiin. Mykoplasmakontaminaatioiden vaikutusten vuoksi on soluviljelyiden säännöllinen mykoplasmamääritysten tekeminen tärkeää.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli valita Tampereen yliopiston soluviljelyosastolle sopivin mykoplasmamääritysmenetelmä. Tällä hetkellä soluviljelyosaston eri ryhmillä on käytössään erilaisia määritysmenetelmiä ja tavoitteena oli löytää kaikille ryhmille yhteinen mykoplasma-testikitti. Työn tarkoituksena oli testata seitsemää erilaista kaupallista mykoplasma-testikittiä. Tarkoituksena oli myös saatujen tulosten sekä kittien käyttöohjeissa ilmoitettujen tietojen vertailu keskenään. Näytteinä testeissä käytettiin soluviljelyistä kerättyä kasvatusmediumia. Kitistä riippuen mykoplasmamääritykset perustuivat PCR-menetelmään, ELISA-testiin, kolorimetriaan, luminesenssiin tai fluoresenssimikroskopiaan.

Työssä testatuista kiteistä Venor®GeM Classic osoittautui kaikissa vertailtavissa ominaisuuksissa hyväksi ja tasalaatuisena testinä sopivimmaksi Tampereen yliopiston Laboratoriopalvelut-yksikön käyttöön. Myös MycoAlert™ ja Plasmotest™ olivat yleisesti ottaen hyviä testejä, mutta kummassakin oli myös heikkouksia. Testikiteistä Mycoplasma PCR ELISA ja MycoProbe™ olivat ominaisuuksiltaan keskinkertaisia. Molemmat olivat joiltain ominaisuuksiltaan erittäin hyviä, mutta joissain ominaisuuksissa oli kummassakin kitissä heikkouksia. Vertailluista kiteistä heikoimmin pärjäsivät PCR Mycoplasma Test Kit I/C ja MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit.

---

Asiasanat: mykoplasma, soluviljely, kontaminaatio

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Engineering

KOSKINEN, SILJA:

Testing and Comparing Different Detection Methods of Mycoplasma in Cell Cultures

Bachelor's thesis 48 pages, appendices 6 pages  
April 2017

---

Cell culture refers to growing cells in an artificial environment. Cell culture is widely used for research in cellular and molecular biology. In cell culture mycoplasma contamination can stay hidden even at high concentrations and it has been estimated that 15-35% of continuous cell lines are contaminated by mycoplasmas. Mycoplasma contamination is a serious problem in cell culture because it can cause various alterations in cells which can affect results of cell research. Because of the effects of mycoplasma contaminations it is important to determine mycoplasmas routinely.

The aim of this thesis was to choose the most suitable mycoplasma detection method for the cell culture unit of Tampere University. At present, different groups of the cell culture unit use many different detection methods and the aim was to find a common mycoplasma test kit for all the groups. The purpose was to test seven different commercial mycoplasma detection kits. The purpose was also to compare test results and the information given in each kit manual. The samples used in the tests consisted of growth medium collected from cell cultures. Detection methods were based on PCR methods, ELISA test, colorimetry, luminescence or fluorescence microscopy, depending on the kit.

Venor®GeM Classic proved to be a great kit in every compared characteristic and therefore it is the most suitable mycoplasma detection kit for the Laboratory Services unit of Tampere University to use. MycoAlert™ and Plasmotest™ were also good kits in general but there were also some weaknesses in them. Mycoplasma PCR ELISA and MycoProbe™ were both good kits in some characteristics but weak in some other characteristics. PCR Mycoplasma Test Kit I/C and MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit fared weaker than other kits.

---

Key words: mycoplasma, cell culture, contamination

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	SOLUVILJELY.....	8
	2.1 Soluviljelymenetelmät .....	8
	2.2 Soluviljelyolosuhteet .....	10
	2.3 Aseptiikka soluviljelyssä .....	11
3	MYKOPLASMA.....	13
	3.1 Mykoplasman määritelmä.....	13
	3.2 Mykoplasmakontaminaatio soluviljelyssä .....	14
	3.3 Mykoplasmakontaminaation ehkäisy ja hävittäminen.....	15
4	MÄÄRITYSMENETELMÄT.....	18
	4.1 PCR-menetelmä .....	18
	4.2 Agaroosigeelielektroforeesi .....	18
	4.3 ELISA-menetelmä .....	19
	4.4 Kolorimetria.....	19
	4.5 Luminesenssi .....	19
	4.6 Fluoresenssimikroskopia .....	20
5	TYÖN SUORITUS .....	21
	5.1 Näytteet ja näytteenkäsittely .....	21
	5.2 PCR-menetelmät .....	22
	5.2.1 PCR Mycoplasma Test Kit I/C .....	22
	5.2.2 Venor®GeM Classic .....	24
	5.2.3 Mycoplasma PCR ELISA .....	25
	5.3 Kolorimetriset menetelmät .....	26
	5.3.1 Plasmotest™ .....	26
	5.3.2 MycoProbe™ .....	28
	5.4 Luminesenssimenetelmä.....	30
	5.4.1 MycoAlert™ .....	30
	5.5 Mikroskopointimenetelmä .....	31
	5.5.1 MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit .....	31
6	TULOKSET .....	32
	6.1 PCR-menetelmät .....	32
	6.2 Kolorimetriset menetelmät .....	33
	6.3 Luminesenssimenetelmä.....	35
	6.4 Mikroskopointimenetelmä .....	35
	6.5 Menetelmien vertailu .....	36
7	POHDINTA.....	38

LÄHTEET .....	41
LIITTEET .....	43
Liite 1. Mykoplasmamääritysten tulokset .....	43
Liite 2. Mykoplasma-testikittien hinnat .....	46
Liite 3. Mykoplasma-testikittien spesifisyydet .....	47

## LYHENTEET JA TERMIT

adherentti solu	solu, joka kasvaa kasvualustaan kiinnittyneenä
AGE	agaroosigeelielektroforeesi
AMP	adenosiinimonofosfaatti
anti-DIG-AP	alkalisella fosfataasilla konjugoitu vasta-aine digoksigeniinille
anti-DIG-POD	peroksidaasilla konjugoitu vasta-aine digoksigeniinille
ATP	adenosiinitrifosfaatti
bp	emäspari
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
FBS	naudan sikiön seerumi
generaatioaika	solupopulaation kaksinkertaistumiseen kuluva aika
<i>in vitro</i>	koeputkessa tai kasvatusalustalla tehtävä toimenpide
kb	kiloemäs, DNA:n mittayksikkö
konfluenssi	solujen tiheys kasvatusalustalla
lag-vaihe	viivevaihe, jolloin solupopulaatio ei lisäännä
log-vaihe	solujen eksponentiaalisen kasvun vaihe
lyysaus	solujen hajotus
passage	siirrostusluku, solulinjan jakamiskertojen lukumäärä
PCR	polymeraasiketjureaktio
Pen/Strep	penisilliinin ja streptomysiinin muodostama antibioottiseos
rRNA	ribosomaalinen ribonukleiinihappo
suspensiosolu	solu, joka kasvaa irrallaan kasvatusmediumissa
TBE	Tris-boraatti-EDTA
topoisomeraasi	entsyymi, joka poistaa DNA:n kaksoiskierteen avautumisesta muodostuvaa jännitettä
transformaatio	solujen muokkaus kuolemattomiksi

## 1 JOHDANTO

Solujen kasvatusta keinotekoisessa ympäristössä kutsutaan soluviljelyksi. Soluviljelyissä solujen kasvuolosuhteita, kuten pH:ta, lämpöä ja ravintoaineita, säädellään tarkasti. Soluviljelyä hyödynnetään laajalti erilaisissa tutkimuksissa, joiden tarkoituksena on selvittää muun muassa solujen fysiologiaa ja aineenvaihduntaa. Soluviljelyä voidaan hyödyntää myös lääkkeiden kehityksessä ja valmistuksessa.

Mykoplasmat ovat pieniä bakteereita ja niitä tunnetaan noin 200 eri lajia. Mykoplasmojen solun ja genomien koko on pienempi kuin tavallisten bakteerien. Pienen kokonsa lisäksi mykoplasmat eroavat tavallisista bakteereista rakenteensa osalta, sillä niillä ei ole ollenkaan soluseinää. Soluseinättömyyden vuoksi mykoplasmat pystyvät muuttamaan muotoaan ja läpäisemään hyvin pieniä huokosia, mikä edesauttaa mykoplasmaakontaminaatioiden syntymistä.

Soluviljelyiden mykoplasmaakontaminaatiot ovat vakava ongelma, sillä ne voivat olla jopa isoina konsentraatioina huomaamattomia soluviljelyissä. Vaikka soluviljelyissä ei olisi näkyviä merkkejä kontaminaatiosta, mykoplasma voi aiheuttaa monia muutoksia soluissa. Mykoplasmaakontaminaatio voi vaikuttaa esimerkiksi kromosomeihin, solukalvoon, nukleiinihappoaineenvaihduntaan sekä solujen kasvunopeuteen (Doyle & Griffiths 2000, 51). Jotta soluilla tehtävien tutkimusten tulokset olisivat luotettavia, on soluviljelyiden rutiininomainen mykoplasmamäärittysten tekeminen tärkeää.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Laboratoriopalvelut-yksikölle. Laboratoriopalvelut-yksikön tehtävänä on tarjota Tampereen yliopiston tutkimusryhmille ympäristö, jossa tutkijat voivat keskittyä tutkimustyöhön. Opinnäytetyön tavoitteena oli soluviljelyosastolle sopivimman mykoplasmamäärittelyn valitseminen. Työn tarkoitus oli testata soluviljelyistä otetuilla näytteillä erilaisia mykoplasma-testikittejä ja vertailla saatuja tuloksia keskenään. Vertailuun otettiin seitsemän erilaista testikitettä, joista kolme perustui PCR-menetelmään, kaksi kolorimetriaan, yksi luminesenssiin ja yksi fluoresenssimikroskopiaan.

## 2 SOLUVILJELY

### 2.1 Soluviljelymenetelmät

Soluviljely on yksi tärkeimmistä menetelmistä solu- ja molekyylibiologiaan liittyvissä tutkimuksissa. Soluviljelyn avulla pystytään tutkimaan solujen biokemiaa, aineenvaihduntaa, solujen normaalia fysiologiaa sekä lääkeaineiden vaikutuksia soluihin. Soluviljelystä voidaan käyttää myös lääkkeiden kehittämiseen ja biologisten yhdisteiden, kuten rokotteen, valmistamiseen. (Life Technologies Corporation 2012, 3.)

Soluviljelyllä tarkoitetaan solujen kasvatusta suotuisassa, keinotekoisessa ympäristössä. Viljeltävät solut ovat peräisin joko suoraan kudoksesta tai solulinjasta, joka on jo olemassa. Kun solut eristetään kudoksesta, muodostuu primääriviljelmä. Primääriviljelmästä voidaan puhua siihen asti, kunnes solut valtaavat koko kasvualustan eli ovat täysin konfluentteja ja ne täytyy siirrostaa uuteen kasvualustaan. Ensimmäisen siirrostuksen jälkeen primääriviljelmästä tulee solulinja. (Life Technologies Corporation 2012, 2.)

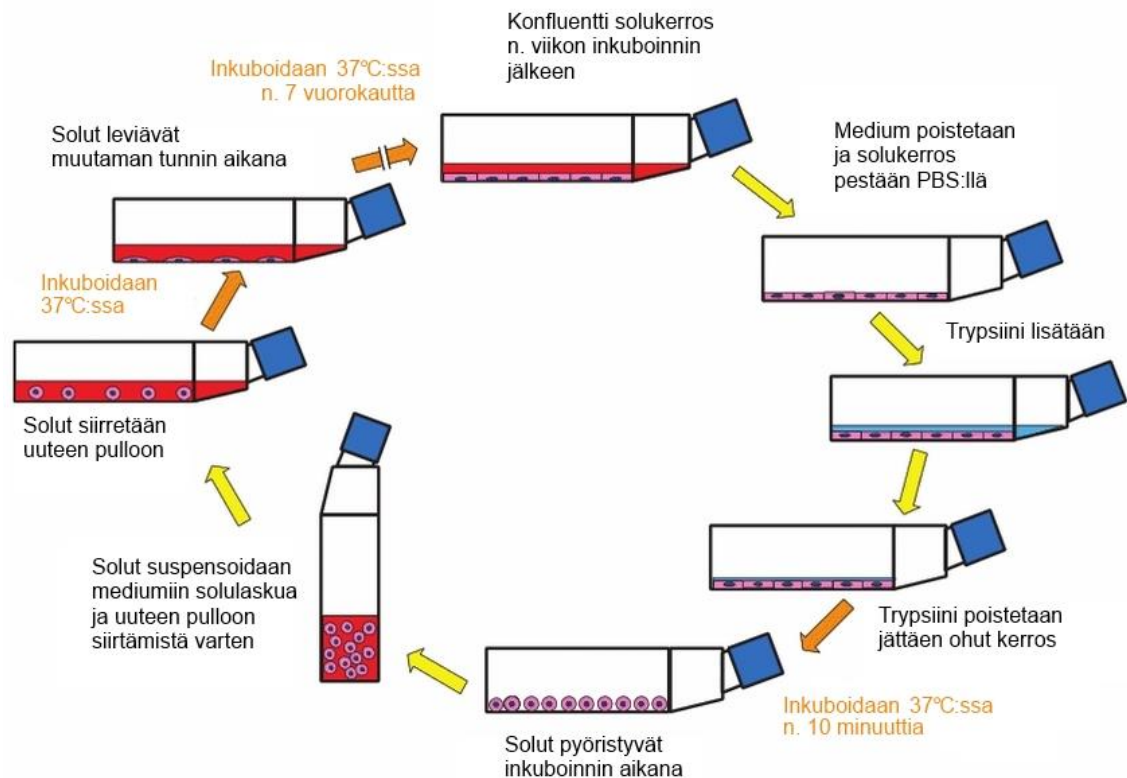
Kudoksista peräisin olevia primäärisoluja viljellään vain lyhytaikaisesti ja niistä muodostuvalla solulinjalla on rajallinen elinaika. Pysyvien solulinjojen soluja taas voidaan viljellä *in vitro* -olosuhteissa rajattomasti. Pysyvät solulinjat ovat usein peräisin kasvainkudoksista tai ne ovat käyneet läpi transformaation, jossa niistä tulee kuolemattomia. Transformaatio voi tapahtua spontaanisti tai se tehdään kemiallisesti tai viruksia käyttämällä. (Doyle & Griffiths 2000, 149 ; Life Technologies Corporation 2012, 2.)

Solut kasvavat joko kasvualustaan kiinnittyneinä tai irrallaan kasvatusmediumissa. Kasvualustaan kiinnittyneet solut eli adherentit solut muodostavat kasvualustalle yksikerroksisen solukasvuston. Kasvatusmediumissa irrallaan kasvatettavista soluviljelmistä käytetään termiä suspensioviljelmä. Suurin osa soluista, jotka ovat selkärankaisista peräisin, kasvatetaan adherentteina soluviljelminä lukuun ottamatta muutamia harvoja solulinjoja. Hyönteissolut sen sijaan kasvavat useimmiten hyvin sekä adherentteina, että suspensioviljelminä. (Life Technologies Corporation 2012, 19.)

Adherentit solut tulee siirrostaa, kun ne ovat log-vaiheessa eli eksponentiaalisen kasvun vaiheessa ja ennen kuin solut kasvavat konfluentteina. Solut eivät kasva enää, kun ne ovat



konfluentteja ja tällöin niillä kestää kauemmin elpyä siirrosta. Suspensiosolut tulee myös siirrostaa log-vaiheessa ja ennen kuin ne kasvavat konfluentteina. Konfluentteina suspensiosolut kasaantuvat rykelmäksi ja kasvatusmedium muuttuu sameaksi. (Life Technologies Corporation 2012, 27, 30.)



KUVIO 1. Adherentin soluviljelyn siirrostus ja kasvusykli (Freshney 2016, 246, muokattu)

Adherenttien solujen siirrostus ja kasvusykli on esitetty kuviossa 1. Ennen siirrostusta uuteen viljelyastiaan adherentit solut on irrotettava kasvualustasta joko mekaanisesti tai entsymaattisesti. Mekaaninen irrotus tapahtuu ravistelemalla viljelyastiaa, voimakkaalla pipetoinnilla tai soluraaputinta käyttäen. Entsymaattiseen irrotukseen käytetään esimerkiksi trypsiiniä tai kollagenaasia. (Life Technologies Corporation 2012, 27, 30.) Trypsiini on proteaasi, joka pilkkoo proteiinien peptidisidoksia (Doyle & Griffiths 2000, 29). Solut kiinnittyvät toisiinsa kadheriini-proteiinin avulla. Kadheriini tarvitsee toimiakseen  $\text{Ca}^{2+}$ -kationeja ja tämän vuoksi solujen irrottamiseen toisistaan tarvitaan usein  $\text{Ca}^{2+}$ -kationien kelaatio. Tämän takia trypsiiniä käytetään usein yhdessä EDTA:n kanssa, jonka tehtävänä on kelatoida kahdenarvoisia  $\text{Ca}^{2+}$ -kationeita. (Freshney 2016, 20, 244.)

## 2.2 Soluviljelyolosuhteet

Soluviljelyt tehdään sopivassa astiassa, jossa on välttämättömiä ravintoaineita sisältävää kasvatusmediumia. Soluviljelyastioina käytetään joko maljoja, pulloja tai kuoppalevyjä (kuva 1). Kasvatusmedium on soluviljely-ympäristön tärkein osa, sillä se tarjoaa solujen tarvitsemat ravinteet, kasvutekijät sekä hormonit ja se vaikuttaa solujen kasvu-ympäristön pH-arvoon ja osmoottiseen paineeseen. Kasvatusmediumeissa käytetään usein seerumia, joka toimii kasvutekijöiden, hormonien, lipidien ja mineraalien lähteenä. Seerumi vaikuttaa myös solukalvon läpäisevyyteen ja mahdollistaa näin lipidien, entsyymien ja hivenaineiden pääsyn solun sisälle. Seerumilla on myös haitallisia vaikutuksia, kuten solun kasvun ja toiminnan häiriöt. Lisäksi seerumi voi olla soluviljelyn kontaminaation lähde. (Life Technologies Corporation 2012, 2, 6, 20.)



KUVA 1. Soluviljelypulloja, kuoppalevyjä ja petriimalja (Solunetti 2006)

Soluviljelyolosuhteet vaihtelevat laajasti solutyypistä riippuen. Soluviljelyssä käytettävät inkubaattorit mahdollistavat olosuhteiden säätelyn soluille sopiviksi. Inkubaattoreilla säädellään lämpötilaa ja ilman hiilidioksidipitoisuutta. Ilman hiilidioksidipitoisuudeksi säädetään usein 5 – 7 %. Suotuisa lämpötila vaihtelee solujen isäntäeliön ruumiinlämpötilan mukaan. Nisäkässolut kasvavat parhaiten 36 – 37 °C:n, hyönteissolut 27 °C:n, linnuista peräisin olevat solut 38,5 °C:n ja kylmäverisistä eläimistä peräisin olevat solut 15 – 26 °C:n lämpötilassa. (Life Technologies Corporation 2012, 2, 9, 21.)

Myös optimaalinen soluviljelyn pH-arvo vaihtelee soluista riippuen. Nisäkässoluille sopiva pH on useimmiten 7,4. Jotkin transformoidut solut kuitenkin kasvavat paremmin

hieman happamammassa ympäristössä, pH-arvon ollessa 7,0 – 7,4. Fibroblastisolut taas kasvavat parhaiten hieman emäksisemmässä ympäristössä, kun pH on 7,4 – 7,7 välillä. Hyönteissoluille sopivin pH-arvo on 6,2. Kasvatusmediumin valinnan lisäksi myös inkubaattoreilla on osuus pH-arvon säätelyssä, sillä ilman hiilidioksidipitoisuus vaikuttaa mediumin pH-arvoon. (Life Technologies Corporation 2012, 21.)

### 2.3 Aseptiikka soluviljelyssä

Soluviljelyiden suurin ongelma ovat kontaminaatiot. Bakteerit, mykoplasmat, hiivat ja sieni-itiöt voivat päästä viljelyyn monista eri lähteistä, kuten laboratoriohenkilökunnasta, ilmasta, työtasoilta tai käytetyistä liuoksista. Oikealla aseptisellä menettelyllä voidaan välttää kontaminaatioiden pääsy soluviljelyihin. (Freshney 2016, 73–74.) Aseptiseen menettelyyn kuuluvat steriili työskentelyalue, steriilit reagenssit, hyvä henkilökohtainen hygienia ja steriilit työtavat (Life Technologies Corporation 2012, 11).

Soluviljelyyn käytetään laminaarivirtauskaappia, jossa kontaminanttien pääsy työtilaan estetään jatkuvalla, tasaisella ilmavirralla. Ilma, joka johdetaan laminaarivirtauskaappiin, puhdistetaan suodattimilla. Laminaarivirtauskaapit jaetaan ilman virtaussuunnan mukaan vaak- ja pystyvirtauskaappeihin. Vaakavirtauskaappi tarjoaa tasaisimman virtauksen ja pitää työtilan paremmin steriilinä, mutta pystyvirtauskaappi suojaa työntekijää aerosoleilta ja siksi useimmat soluviljelyissä käytetyt kaapit ovatkin pystyvirtauskaappeja. (Freshney 2016, 75.) Laminaarivirtauskaappi pyyhitään 70 %:lla etanolilla aina ennen ja jälkeen työskentelyn sekä työskentelyn aikana, varsinkin jos työtasolle läikkyy tai tippuu reagensseja. Kaappiin otetaan vain tarvittavat välineet, eikä kaappia ole tarkoitettu säilyttämiseen. Tarvittavat välineet ja reagenssit asetetaan kaapin takaosaan ja reunoille siten, että keskelle jää laaja, tyhjä alue työskentelyä varten. Laminaarikaapin sterilointiin käyttökertojen välissä voidaan käyttää ultraviolettivaloa. (Life Technologies Corporation 2012, 8,11; Freshney 2016, 77.)

Kaupalliset reagenssit ja mediumit käyvät läpi tarkan laadunvalvonnan, jotta niiden steriiliys voidaan taata (Life Technologies Corporation 2012, 11; Freshney 2016, 78). Steriilit reagenssit voivat kontaminoitua, jos niitä ei käsitellä steriilisti. Itse valmistetut reagenssit ja muut liuokset tulee aina steriloida esimerkiksi autoklavoimalla tai suodattamalla. (Life Technologies Corporation 2012, 11.) Jotkut kaupalliset reagenssipullot saa-

tetaan toimittaa kääreen sisällä, mikä pitää pullot puhtaina. Kääre tulee poistaa laminaarivirtauskaapin ulkopuolella. Reagenssipullot pyyhitään 70 %:lla etanolilla ennen kaappiin laittamista. (Freshney 2016, 78–79.)

Kädet tulee pestä aina ennen ja jälkeen soluviljelytyöskentelyn (Life Technologies Corporation 2012, 11). Henkilökohtaisilla suojaimilla, kuten käsineillä, laboratoriotakilla ja kengänsuojilla, on kaksi tehtävää. Ensimmäinen on suojella työntekijää vaarallisilta materiaaleilta ja toinen on suojella soluviljelyä työntekijän aiheuttamilta kontaminaatio-rikkailta (Life Technologies Corporation 2012, 5, 11; Freshney 2016, 77–78). Käsineet puetaan laboratoriotakin hihansuiden päälle ja käsineitä tulee pyyhkiä etanolilla säännöllisesti työskentelyn aikana (Freshney 2016, 78).

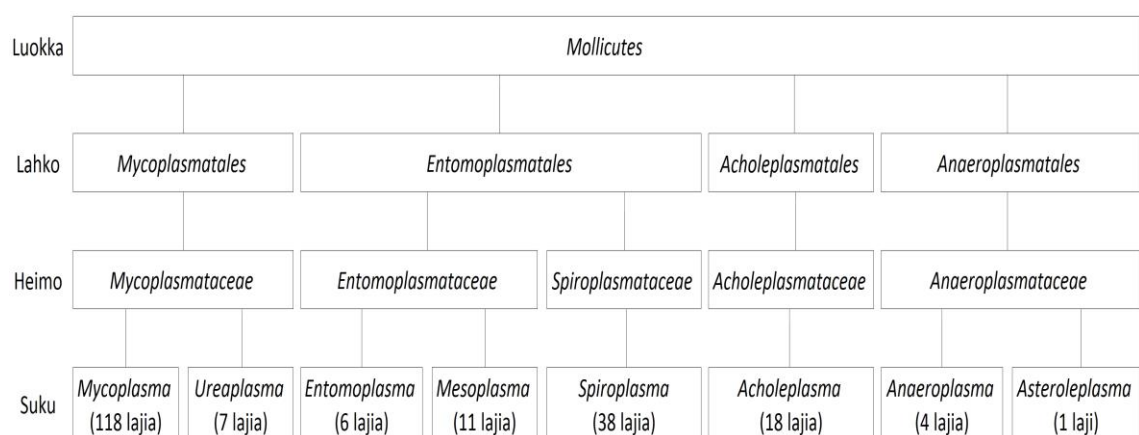
Steriileihin työtapoihin kuuluu käsien ja työtason pyyhkiminen etanolilla. Myös kaikki reagenssipullot ja muut tavarat, joita tarvitaan laminaarivirtauskaapissa, tulee pyyhkiä etanolilla ennen kaappiin asettamista. (Life Technologies Corporation 2012, 12; Freshney 2016, 79.) Käytettävien lasi- ja muovitavaroiden tulee olla steriilejä. Steriilien pipettien kääre tulee poistaa vasta, kun pipettiä tarvitaan ja kutakin pipettiä tulee käyttää vain yhden kerran. Reagenssipullojen korkit tulee avata vasta, kun reagenssia tarvitaan ja sulkea ne heti käytön jälkeen. Soluviljelytyöskentelyssä on syytä välttää puhumista kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. (Life Technologies Corporation 2012, 12.)

### 3 MYKOPLASMA

#### 3.1 Mykoplasman määritelmä

Mykoplasmat ovat pieniä bakteereita ja ne ovat pienimpiä tällä hetkellä tiedossa olevia itsenäisesti eläviä organismeja. Ne ovat tavallisia bakteereja pienempiä niin solun kuin genomien koon perusteella. Mykoplasmojen koot vaihtelevat 0,2 – 0,3 µm halkaisijaltaan olevista kokkibakteereista 1 – 2 µm pitkiin ja 0,1 – 0,2 µm leveisiin sauvabakteereihin. (Waites & Taylor-Robinson 2015, 1088.) Mykoplasmojen genomien koko vaihtelee 580 – 2200 kb:n välillä. Pienin genomi, 580 kb, on *Mycoplasma genitalium*:n genomi. (Rottem, Kosower & Kornspan 2012, 35; Waites & Taylor-Robinson 2015, 1088–1089.)

Mykoplasma termiä käytetään yleisesti puhuttaessa kaikista *Mollicutes*-luokan lajeista. Tarkasti ottaen mykoplasma kuitenkin tarkoittaa vain *Mycoplasma*-suvun lajeja. Taksonomisessa luokittelussa *Mollicutes*-luokka muodostuu neljästä lahkosta, viidestä heimestä, kahdeksasta suvusta ja noin kahdestasadasta tunnetusta lajista (kuvio 2). Mollikuutit ovat kehittyneet klostridi-bakteerin kaltaisista grampositiivisista soluista deleetion avulla. (Waites & Taylor-Robinson 2015, 1088.) Deleetio on mutaatiotyyppi, jossa geenistä poistuu yksi tai useampia nukleotidejä (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 42).



KUVIO 2. Mollikuutti-luokan taksonomia (Waites & Taylor-Robinson 2015, 1089, muokattu)

Mykoplasmoilla on kolmikerroksinen solukalvo, mutta ei ollenkaan soluseinää. Mykoplasmoilta soluseinä puuttuu pysyvästi toisin kuin joiltakin bakteereilta, joilta soluseinä

voi puuttua tilapäisesti ympäristöolosuhteiden seurauksena. Soluseinän pysyvä puuttuminen erottaa mykoplasmat muista prokaryooteista. Soluseinättömyyden vuoksi mykoplasmat eivät myöskään värjäydy gramvärjäyksessä ja niillä on pleomorfinen muoto. (Waites & Taylor-Robinson 2015, 1088.) Pleomorfisella muodolla tarkoitetaan bakteerin kykyä muuttaa kokoa tai muotoa ympäristöolosuhteiden vuoksi (Meriläinen 2015, 46).

### 3.2 Mykoplasmakontaminaatio soluviljelyssä

Yleisimmin mykoplasmakontaminaation aiheuttavia lajeja ovat *M. hyorhina*, *M. arginini*, *M. orale*, *A. laidlawii*, *M. hominis* ja *M. fermentans*. Mykoplasmakonsentraatio soluviljelyn supernatantissa voi tyypillisesti olla  $10^6 - 10^8$  mykoplasmaa millilitrassa. (Doyle & Griffiths 2000, 51; Drexler & Uphoff 2002, 76–77.) Yhteen infektoituneeseen soluun voi olla kiinnittynyt sadasta tuhanteen mykoplasmaa. Solulinjoista on löytynyt yli 20 eri mykoplasmalajia, mutta 90 – 95 % kontaminaatioista on aiemmin lueteltujen kauden yleisimmän kontaminantin aiheuttamia. *M. orale* on kaikista yleisin kontaminaation aiheuttaja, 20 – 40 % mykoplasmakontaminaatioista on sen aiheuttamia. *M. orale*, *M. hominis* ja *M. fermentans* kuuluvat ihmisen suunelun mikrobeihin. *M. arginini* ja *A. laidlawii* ovat naudasta peräisin olevia lajeja ja *M. hyorhina* on sian nenäontelossa yleinen mykoplasma. (Drexler & Uphoff 2002, 76–77.)

Koska suurin osa soluviljelyitä kontaminoivista mykoplasmoista on ihmisperäisiä, voidaan laboratoriohenkilökuntaa pitää yhtenä suurimmista kontaminaatiolähteistä. Naudasta peräisin olevat mykoplasmat voivat päätyä soluviljelyyn naudan seerumin, kuten FBS:n, käytön seurauksena. Pienen kokonsa ja solukalvon joustavuuden ansiosta mykoplasmat pystyvät läpäisemään  $0,45 \mu\text{m}$ :n suodattimen, jolloin esimerkiksi seerumin suodattamisella ei pystytä estämään mykoplasman pääsyä viljelyyn. Ristikontaminaatio mykoplasman infektoimista soluviljelyistä toisiin soluviljelyihin on suuri mykoplasmakontaminaation lähde, sillä kontaminoituneissa viljelmissä mykoplasmakonsentraatiot ovat korkeita. (Drexler & Uphoff 2002, 76–78.)

Primäärisoluviljelmistä vain 1 % ja alhaisen passagen viljelyistä 5 % on mykoplasma-kontaminoituneita. Pysyvistä solulinjoista kontaminoituneita on 15 – 35 % ja joidenkin tutkimusten mukaan jopa 65 – 80 %. Solulinjojen lisääntynyt käyttö tutkimuksissa on voinut osaltaan vaikuttaa mykoplasmakontaminaatioiden yleistymiseen. Lisäksi eräiden

antibioottien käyttö rutiiniviljelyissä on oletettavasti vaikuttanut mykoplasmakontaminaatioiden lisääntymiseen. Tällainen antibiootti on esimerkiksi Pen/Strep, joka ei tuhoa mykoplasmaa, vaan voi ennemminkin pitää sen salassa. (Drexler & Uphoff 2002, 76–77.)

Mykoplasmat eivät välttämättä aiheuta soluviljelmissä bakteeri- tai sienikontaminaation kaltaisia näkyviä muutoksia, kuten sameutta tai pH:n muutoksia. Rutiininomainen mykoplasman määrittäminen soluviljelyistä on tärkeää, sillä mykoplasma voi vaikuttaa soluihin monella tavalla, vaikka näkyviä merkkejä kontaminaatiosta ei välttämättä ole havaittavissa. Mykoplasmakontaminaatio voi aiheuttaa soluviljelyissä muun muassa poikkeamia kromosomeissa, morfologisia muutoksia ja solujen kasvunopeuden häiriöitä. Lisäksi kontaminaatio voi vaikuttaa nukleiinihappo- ja aminohappoaineenvaihduntaan sekä aiheuttaa muutoksia solukalvossa. (Doyle & Griffiths 2000, 51.)

Mykoplasmat kasvavat optimaalisissakin olosuhteissa hyvin hitaasti, verrattuna muihin bakteereihin. Mykoplasmojen generaatioaika vaihtelee tunnista jopa yhdeksään tuntiin. Lisäksi mykoplasmoilla on suhteellisen pitkä lag-vaihe eli vaihe, jolloin solupopulaatio ei lisääny. Pitkän lag-vaiheen takia mykoplasma voi olla huomaamaton pitkään kontaminaation saamisen jälkeenkin. Suurin osa mykoplasmoista esiintyy soluviljelyissä solun ulkopuolelle kiinnittyneinä, mutta ne voivat esiintyä myös solun sisällä. Solunsisäiset mykoplasmat ovat eristettyinä ja voivat täten olla suojassa mykoplasmaa tuhoavilta käsittelyiltä. (Drexler & Uphoff 2002, 76.)

### **3.3 Mykoplasmakontaminaation ehkäisy ja hävittäminen**

Antibioottien ennalta ehkäisevä käyttö ja hyvä aseptinen menettely voivat vähentää soluviljelyiden kontaminaatoriskiä huomattavasti. Solulinjojen rutiininomaisessa viljelyssä paras tapa välttää kontaminaatioita on hyvän aseptisen menettelyn noudattaminen. Antibiootteja tulisi käyttää ennalta ehkäisevästi vain, kun on olemassa selvä kontaminaatoriski. Suuri kontaminaatoriski liittyy esimerkiksi solulinjoihin, jotka perustetaan kirurgisesta materiaalista ja tällöin on hyödyllistä ja perusteltua käyttää antibiootteja ennalta ehkäisevästi. (Doyle & Griffiths 2000, 17.)

Jos soluviljelyssä havaitaan mykoplasmakontaminaatio, tulee soluviljelmä ensisijaisesti hävittää esimerkiksi autoklavoimalla (Freshney 2016, 303). Vain korvaamattomista soluviljelyistä kannattaa mykoplasmakontaminaatio tuhota antibiootteja käyttämällä (Doyle

& Griffiths 2000, 25). Korvaamattomia soluja voivat olla esimerkiksi solut, jotka ovat ominaisuuksiltaan ainutlaatuisia tai solut, joiden käsittelyyn on tehty suuri määrä töitä (Uphoff & Drexler 2005, 26).

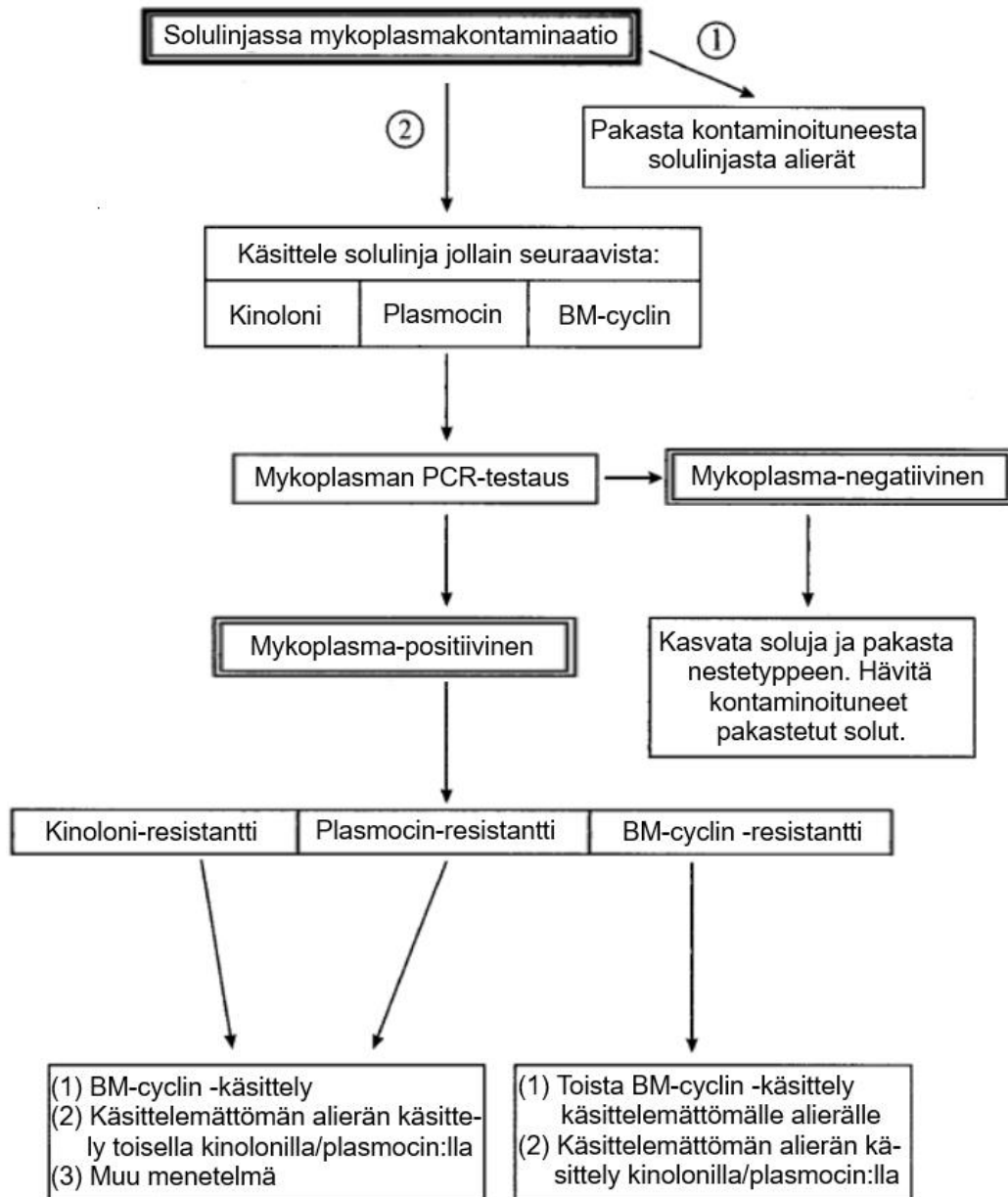
Mykoplasmat ovat resistentteja useimmiten soluviljelyssä käytetyille antibiooteille (Drexler & Uphoff 2002, 75). Esimerkiksi beetalaktaami-antibiootit, kuten penisilliini, eivät tehoa mykoplasmaan soluseinän puuttumisen takia (Rottem ym. 2012, 35; Waites & Taylor-Robinson 2015, 1088). Mykoplasmaan tehoavia antibiootteja on kolmenlaisia ja niitä ovat tetrasykliinit, makrolidit ja kinolonit. Näitä antibiootteja voidaan käyttää pieninä pitoisuuksina, eikä niillä ole suuria vaikutuksia eukaryoottisoluille. Lisäksi näillä antibiooteilla on todella pieni todennäköisyys antibioottiresistanssin syntymiseen. Riski resistanssien kloonien kehitykselle minimoidaan käyttämällä eri antibiootteja, joilla on erilainen vaikutusmekanismi ja käyttämällä riittävän pitkää antibioottihoito-aikaa. (Uphoff & Drexler 2005, 27.)

Tetrasykliinit ovat laaja-alaisia antibiootteja ja ne tehoavat myös mykoplasmaan. Toimintamekanismi perustuu bakteerisolujen proteiinisynteesin estämiseen sitoutumalla ribosomien 30S-alayksikköön. Makrolidit, kuten tetrasykliinitkin, ovat bakteriostaattisia eli bakteerien lisääntymistä estäviä antibiootteja. Makrolidien vaikutusmekanismi on tetrasykliinien kaltainen ja se perustuu proteiinisynteesin estämiseen sitoutumalla rRNA:n 23S-molekyylisiin, joka kuuluu ribosomin 50S-alayksikköön. Kinolonit ovat synteettisiä antibiootteja, joiden toimintamekanismi perustuu DNA:n replikaation estämiseen inhiboimalla bakteerin topoisomeraasia. Bakteerin topoisomeraasi on erilainen kuin nisäkkäiden topoisomeraasi, joten mekanismi on hyvin selektiivinen. (Mishra & Agrawal 2013, 20.)

Kuviossa 3 on esitetty kaavio mykoplasmaakontaminaation antibioottihoidosta. Ennen kuin korvaamattomia soluja hoidetaan antibiooteilla, tulisi kontaminoituneesta solulinjasta pakastaa alierät varmuuden vuoksi, sillä solut voivat kuolla hoidon aikana. Kontaminoituneet solut tulisi pakastaa mieluiten nestetyypitankkiin, erilleen muista soluista. Ennen antibioottihoitoa tulisi optimaaliset kasvuolosuhteet varmistaa lisäämällä seerumin määrää mediumissa 20 %:iin. Solujen antibioottihoitoon on kolme eri menetelmää. Yksi tapa on käyttää yhtä antibioottiyhdistettä, kuten jotakin kinolonia. Toinen tapa on käyttää yhdistettä, joka sisältää kahta eri antibioottia. Tällainen yhdiste on esimerkiksi Plasmocin, jonka sisältämistä antibiooteista toinen estää proteiinisynteesin ja toinen estää DNA:n



kahdentumisen. Kolmas tapa on käyttää kahta eri antibioottia vuorottelevin jaksoin. Tähän perustuu esimerkiksi BM-cyclin, jossa vuorotellaan tetrasykliinin ja makrolidin käyttöä. Kun antibioottihoito on tehty, tulee soluviljelystä testata mykoplasma esimerkiksi PCR-menetelmällä. Jos käytetty hoito ei tuhonnut mykoplasmaa, yritetään toista antibioottihoitomenetelmää. (Uphoff & Drexler 2005, 27–29.)



KUVIO 3. Mykoplasman tuhoaminen soluviljelystä antibioottihoidolla (Uphoff & Drexler 2005, 30, muokattu)

## 4 MÄÄRITYSMENETELMÄT

### 4.1 PCR-menetelmä

PCR-menetelmää eli polymeerasiketjureaktiota käytetään DNA:n monistamiseen. PCR tehdään pienissä mikrosentrifuugiputkissa tai kuoppalevyillä PCR-laitteella, jonka lämpötilaa voidaan säädellä tarkasti. PCR:ssä käytetään lämpöä kestävää DNA-polymeeraasia, kahta erilaista aluketta, templaatti-DNA:ta ja nukleotideja. PCR jaetaan kolmeen vaiheeseen, jotka ovat denaturointi, alukkeiden kiinnitys- eli annealing-vaihe ja pidennys- eli ekstensiovaihe. (Suominen ym. 2013, 153–154.)

Ensimmäisessä eli denaturointi-vaiheessa templaatti-DNA:n juosteet irrotetaan toisistaan. Kun juosteet ovat irrallaan, annealing-reaktio voi tapahtua eli alukkeet voivat kiinnittyä templaattiin. Alukkeet kiinnittyvät DNA:n eri juosteisiin, kopioitavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden tehtävänä on rajata templaattista kopioitava DNA-jakso. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet, seuraa ekstensio-vaihe, jossa DNA-polymeeraasi kiinnittää nukleotideja templaatin mukaan alukkeesta alkaen. Tällöin templaatin molemmille juosteille syntyy vastinjuoste. Kun tällaista kolmivaiheista sykliä toistetaan, saadaan pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistettua suuri määrä tiettyä DNA-jaksoa. (Suominen ym. 2013, 154.)

### 4.2 Agarosigeelielektroforeesi

AGE:a eli agarosigeelielektroforeesia käytetään keskikokoisten eli n. 0,1 – 50 kb:n kokoisten fragmenttien analysointiin. Elektroforeesia varten valmistetaan agarosista hyytelömäinen geeli, jossa tutkittava DNA kulkeutuu negatiivisen varauksensa ansiosta sähkökentässä kohti positiivista anodia. Agarosigeeli hidastaa kulkeutumista nukleiinihapojen koon mukaan, jolloin pidemmät DNA-molekyylit kulkeutuvat hitaammin kuin lyhyemmät molekyylit. Ajon aikana erikokoiset DNA-jaksot erottuvat omiksi vyöhykkeikseen eli bändeikseen. Tutkittavan DNA:n koosta saadaan arvio vertaamalla sen bändejä kokostandardiin, jonka fragmenttien koot tunnetaan. (Suominen ym. 2013, 122–123, 125.)

### 4.3 ELISA-menetelmä

ELISA:lla eli entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä voidaan tarkoittaa mitä tahansa määrittystä, joka hyödyntää entsyymi-leimaa. Useimmiten ELISA:lla kuitenkin tarkoitetaan menetelmää, jossa antigeeni tai vasta-aine on kiinnitettyä kiinteään alustaan ja entsyymi-leimattua vasta-ainetta käytetään tutkittavan aineen havaitsemiseen. (Theel, Carpenter & Binnicker 2015, 92.) Yksinkertaisessa ELISA-testissä kiinteään alustaan on kiinnitetty esimerkiksi tuntematon määrä antigeeniä. Antigeenin päälle lisätään vasta-ainetta, joka sitoutuu antigeeniin. Vasta-aineeseen on sidottu entsyymi, joka saa substraatin lisäyksen jälkeen aikaan havaittavan signaalin, useimmiten värinmuutoksen. (Sino Biological Inc.)

### 4.4 Kolorimetria

Kolorimetrialla tutkitaan liuoksissa olevien värillisten yhdisteiden tai reaktioissa värillisiä yhdisteitä muodostavien yhdisteiden pitoisuuksia. Kolorimetrisissä menetelmissä mitataan näyteliuoksen läpi kulkevan valon absorptiota liuokseen. (Keinänen 2012, 9.) Kolorimetrisissä menetelmissä absorbanssin mittaaminen tapahtuu tavallisesti aallonpituuksilla, jotka ovat ultraviolettisäteilyn, näkyvän valon tai infrapunasäteilyn alueella. Aallonpituudet vaihtelevat ultraviolettisäteilyn ja infrapunasäteilyn välissä 185 nm:stä 15 000 nm:iin. Tapauksissa, joissa absorbanssin sijaan mitataan siroavaa säteilyä, olisi syytä käyttää absorbanssin sijaan termiä optinen tiheys. Tällainen tapaus on esimerkiksi, kun biomassan konsentraatio määritetään sameuden perusteella. (Poole & Kalnenieks 2000, 1, 4.)

### 4.5 Luminesenssi

Bioluminesenssi on ilmiö, jossa kemiallinen reaktio vapauttaa energian valoksi. Bioluminesenssiin liittyy kaksi komponenttia, jotka ovat lusiferaasi ja lusiferiini. Lusiferaasi on entsyymi, joka katalysoi lusiferiinia, joka tuottaa valoa. Lusiferaasi on normaalisti sitoutunut ATP:hen ja sen vapautuminen ATP:stä johtaa bioluminesenssiin. Lusiferaasi saa lusiferiinin reagoimaan hapen kanssa, jolloin muodostuu virittynyttä oksilusiferiinia. Oksilusiferiinin virityksen purkautuminen johtaa näkyvän valon syntymiseen. Oksilusiferiinin muodostumisessa ATP muuttuu AMP:ksi ja samalla vapautuu difosfaattia ja hiilidioksidia. (Liaqat 2011, 97-100.)

## 4.6 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssimikroskopia perustuu fluoresoivan aineen eli fluorokromin kykyyn absorboida UV-valoa ja emittoida valo matalampi energisinä näkyvän valon aallonpituuksina eteenpäin. Fluoresenssimikroskopiassa hyödynnetään fluorokromeja, jotka viritetään tietyllä valon aallonpituudella, jolloin fluorokromit emittoivat valoa. Tämän takia käytetään suodattimia, joilla valitaan lampun tuottamasta valosta vain halutut aallonpituudet. (Wiedbrauk 2015, 10.)

Fluoresenssimikroskoopeissa käytetään eksitaatio- ja emissiosuodattimia. Eksitaatio-suodatinta käytetään suodattamaan tietty aallonpituusalue, joka on sopiva kyseessä olevalle fluorokromille. Emissiosuodattimen tarkoitus on estää näytteestä tulevia lyhyempiä aallonpituuksia pääsemästä lävitse ja päästää vain pidemmät emittoituneet aallonpituudet suodattimen läpi. Emissiosuodattimet poistavat lampun tuottaman voimakkaan valon, joka voisi muuten peittää himmeämmän emittoidun valon. Emissiosuodatin estää myös UV-valon pääsyn silmään, jossa UV-valo voisi aiheuttaa esimerkiksi vaurioita verkkokalvossa. (Wiedbrauk 2015, 10.)

## 5 TYÖN SUORITUS

### 5.1 Näytteet ja näytteenkäsittely

Näytteiksi kerättiin soluviljelyistä supernatanttia, ei itse soluja. Näytteet kerättiin viljelyistä, jotka olivat 90-100 % konfluentteja. Supernatanttia kerättiin 10 ml, jotta näytettä riitti kaikille seitsemälle eri testille. Osa näytteistä kerättiin viljelmistä, joissa supernatanttia on alle 10 ml. Tällöin näytteisiin oli yhdistetty supernatanttia useammasta eri viljelystä, jotta näytettä saatiin tarvittava määrä. Taulukossa 1 on esitetty näytteenkäsittely ja -säilytys kullekin eri testille. Supernatantti jaettiin jokaista testiä varten omiin näyteputkiin ja käsiteltiin kunkin kitin ohjeen mukaan. Näyteputket säilytettiin +4 °C:ssa, -20 °C:ssa tai -80 °C:ssa testikitistä riippuen.

TAULUKKO 1. Näytteenkäsittely kunkin kitin mukaan

Testikitti	Näytteenkäsittely	Näytteen-säilytys
MycoAlert™	Sentrifugoi 2 ml näytettä 200 x g 10 min. ja siirrä supernatantti uuteen putkeen.	-80 °C
MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit	Sentrifugoi 3 ml näytettä 1300 x g 10 min. ja jaa supernatantti kahteen uuteen putkeen.	-20°C
Mycoplasma PCR ELISA	Sentrifugoi 2 ml näytettä 200 x g 10 min. ja jaa supernatantti kahteen uuteen putkeen. Lisää kumpaankin putkeen 250 µl glyserolia.	-20°C
MycoProbe™	Lisää 33 µl:aan näytettä 297 µl lyysausreagenssia ja vorteksoi.	-20°C
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Siirrä 100 µl näytettä uuteen putkeen.	-20°C
PlasmoTest™	Siirrä 500 µl näytettä kahteen uuteen putkeen (yhteensä 1 ml).	+4 °C
Venor® GeM Classic	Siirrä 500 µl näytettä uuteen putkeen ja lämmitä 95 °C:ssa 10 min. Sentrifugoi lämmitetty näyte maksiminopeudella n. 15 s.	-20°C

## 5.2 PCR-menetelmät

Vertailuun otettiin mukaan kolme erilaista PCR-menetelmään perustuvaa mykoplasma-testikittiä, jotka olivat PromoKine:n PCR Mycoplasma Test Kit I/C, Minerva Biolabs:n Venor®GeM Classic ja Roche:n Mycoplasma PCR ELISA. PromoKine:n ja Minerva Biolabs:n kitit olivat melko samankaltaisia testejä, joissa molemmissa tehtiin PCR-ajo ja sen jälkeen suoritettiin agarosigeelielektroforeesi. Roche:n Mycoplasma PCR ELISA:ssa sen sijaan tehtiin PCR-ajon jälkeen ELISA-testi. Kunkin kitin PCR-ajon eri vaiheiden reaktiolämpötilat on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. PCR-kittien ajo-ohjelmat

Sykli	Vaihe	PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Venor®GeM Classic	Mycoplasma PCR ELISA
Sykli 1		95 °C, 2 min.	94 °C, 2 min.	95 °C, 5 min.
Sykli 2-40	Denaturointi	94 °C, 30 s.	94 °C, 30 s.	94 °C, 30 s.
	Annealing	55 °C, 30 s.	55 °C, 30 s.	62 °C, 30 s.
	Ekstensio	72 °C, 40 s.	72 °C, 30 s.	72 °C, 1 min.
Sykli 41		-	-	72 °C, 10 min.
	Jäähdytys	8 °C	8 °C	8 °C

Sekä PromoKine:n PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitin, että Minerva Biolabs:n Venor®GeM Classic -kitin kanssa elektroforeesissa käytetty kokostandardi oli Thermo Scientific:n GeneRuler 50 bp DNA Ladder. GeneRuler 50 bp DNA Ladder koostuu kolmesta DNA-fragmentista, jotka ovat kooltaan 50 – 1000 bp:n välillä (Thermo Fisher Scientific Inc 2016).

### 5.2.1 PCR Mycoplasma Test Kit I/C

PromoKine:n PCR Mycoplasma Test Kit I/C -testikitti perustuu mykoplasman genomin 16S rRNA:n havaitsemiseen. Kitti ei havaitse eukaryoottien DNA:ta. PCR-reaktion onnistuminen todetaan bändillä 479 bp:n kohdalla, joka on sisäisen kontrolli-DNA:n aiheuttama. Sisäisen kontrollin aiheuttama bändi tulee näkyä jokaisessa reaktiossa, lukuun ottamatta todella positiivisia reaktioita. Positiivinen kontrolli aiheuttaa bändin 270 bp:n kohdalla. Jos tutkittava näyte on positiivinen, aiheuttaa se bändin 265 – 278 bp:n kohdalla. Kittiin kuului valmiit reaktioputket, jotka sisälsivät kylmäkuivatun Master Mix:n. Master Mix sisälsi alukkeet, nukleotidit, DNA-polymeraasin ja sisäisen kontrolli-DNA:n.

Positiivisille kontrolleille oli omat reaktioputkensa, jotka sisälsivät *Mycoplasma orale*:n genomien DNA-fragmenteja. (PromoKine 2016, 3, 4, 8.)

Pakastetut näytteet sulatettiin huoneenlämmössä ja sen jälkeen lämmitettiin 95 °C:ssa 10 minuuttia. Lämmityksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin nopeasti maksiminopeudella. Reaktioputkien sisältämä Master Mix liuotettiin lisäämällä putkiin 23 µl rehydraatiopuskuria. Kun Master Mix oli täysin liennut, lisättiin PCR-putkiin 2 µl näytettä ja negatiivisten kontrollien putkiin 2 µl steriiliä vettä. Positiivista kontrollia varten lisättiin positiivisten kontrollien reaktioputkiin 23 µl rehydraatiopuskuria ja 2 µl steriiliä vettä. Ennen PCR-ajoa kaikki putket spinnattiin eli sentrifugoitiin lyhyesti, jotta PCR-reaktioseos laskeutui putken pohjalle. Putket vietiin PCR-laitteeseen ja laitteeseen ohjelmoitiin taulukon 2 mukainen ajo-ohjelma PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitille.

PCR-ajon aikana valmistettiin agarosigeeli elektroforeesia varten valmiiksi. Geeli valmistettiin agarosista, 0,5x TBE-puskurista ja Biotium:n GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain -väristä. Agarosia punnittiin puskurin 1,5 % ja agarosin ja puskurin seosta lämmitettiin varovasti mikroaaltouunissa, kunnes kaikki agarosia oli liennut. Tämän jälkeen lisättiin GelRed™-väri ja geeli kaadettiin valumuottiin. Kun PCR-ajo oli valmis ja geeli jähmettynyt, pipetoitiin näytteet geelille. Reaktioputkien Master Mix sisälsi valmiiksi latauspuskurin, joten PCR-tuotteet olivat sellaisenaan valmiita pipetoitavaksi geelille. Näytteiden ja kontrollien lisäksi geelille pipetoitiin GeneRuler 50 bp DNA Ladder -kostandardia. Myös kokostandardi sisälsi valmiiksi latauspuskurin. Kun näytteet oli pipetoitu, geeliä ajettiin noin tunti 100 V:n jännitteellä. Elektroforeesin jälkeen geeli kuvattiin UV-valossa.

Osalle näytteistä kokeiltiin myös toista näytteenkäsittelymenetelmää, jossa mykoplasma konsentroidiin sentrifugoimalla. Näytettä otettiin tällöin 1 ml mikrosentrifugiputkeen ja sitä sentrifugoitiin 500 x g 5 minuuttia, jotta mahdolliset solun rippeet laskeutuivat putken pohjalle. Supernatantti siirrettiin uuteen putkeen ja sitä sentrifugoitiin 14 000 x g 15 minuuttia. Supernatantti poistettiin ja mahdollisesti muodostunut pelletti suspensoitiin 100 µl:aan steriiliä vettä. Tämän jälkeen näytteet kuumennettiin kuten muutkin näytteet.

### 5.2.2 Venor®GeM Classic

Myös Venor®GeM Classic -testi perustuu mykoplasman genomien 16S rRNA:han. Testissä tehty PCR ei havaitse eukaryoottien DNA:ta. Kitissä sisäinen kontrolli näkyy bändinä 191 bp:n kohdalla ja positiivinen kontrolli näkyy bändinä 267 bp:n kohdalla. Onnistuneessa PCR-reaktiossa, sisäisen kontrollin bändin tulee näkyä kaikissa reaktioissa, lukuun ottamatta vahvasti positiivisia näytteitä. (Minerva Biolabs GmbH 2012, 1, 8.) Venor®GeM Classic -kitin mukana ei toimiteta DNA-polymeraasia, joten se tilattiin erikseen. Tilattu polymeraasi oli Minerva Biolabs:n MB TAQ DNA Polymerase, jonka konsentraatio oli 5 U/μl. Muut tarvittavat reagenssit kuuluivat kittiin. Kittiin kuuluivat aluke-nukleotidi-seos, reaktiopuskuri, sisäinen kontrolli-DNA ja PCR-laatuista vettä. Lisäksi kitin mukana tuli positiivinen kontrolli-DNA. Reaktioseos PCR:ää varten sekoitettiin itse, toisin kuin PromoKine:n kitissä.

Näytteet sulatettiin huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin lyhyesti maksiminopeudella. Reaktioseokseen sekoitettiin aluke-nukleotidi-seosta, PCR-laatuista vettä, sisäistä kontrolli-DNA:ta, 10x reaktiopuskuria ja polymeraasia. Reaktioseos tehtiin ensin yhteen putkeen ja valmis seos jaettiin jokaista näytettä ja kontrollia varten erillisiin PCR-putkiin. Yhtä näytettä varten seokseen pipetoitiin 15,3 μl PCR-laatuista vettä, 2,5 μl 10x reaktiopuskuria, 2,5 μl aluke/nukleotidi-seosta, 2,5 μl sisäistä kontrolli-DNA:ta ja 0,2 μl polymeraasia. Kuhunkin PCR-putkeen pipetoitiin 23 μl reaktioseosta ja lisättiin 2 μl näytettä, negatiiviseen kontrolliin 2 μl PCR-laatuista vettä ja positiiviseen kontrolliin 2 μl positiivista kontrolli-DNA:ta. Näytteiden ja kontrollien pipetoinnin jälkeen putket spinattiin ja tehtiin PCR-ajo taulukon 2 ohjelman mukaan.

PCR-ajon aikana tehtiin 1,5 % agarosigeeli valmiiksi, kuten PCR Mycoplasma Test Kit I/C -testissä. PCR-ajon jälkeen PCR-tuotteisiin sekoitettiin latauspuskuri, jotta näytteet laskeutuvat geelin näytekaivoon. Latauspuskurina käytettiin Thermo Scientific:n 6X Orange DNA Loading Dye -puskuri ja sitä sekoitettiin PCR-tuotteisiin suhteessa 1:6. PCR-tuotteet ja kokostandardi (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) pipetoitiin geelille ja geeliä ajettiin noin tunti 100 V:n jännitteellä. Lopuksi geelistä otettiin kuva UV-valossa.



### 5.2.3 Mycoplasma PCR ELISA

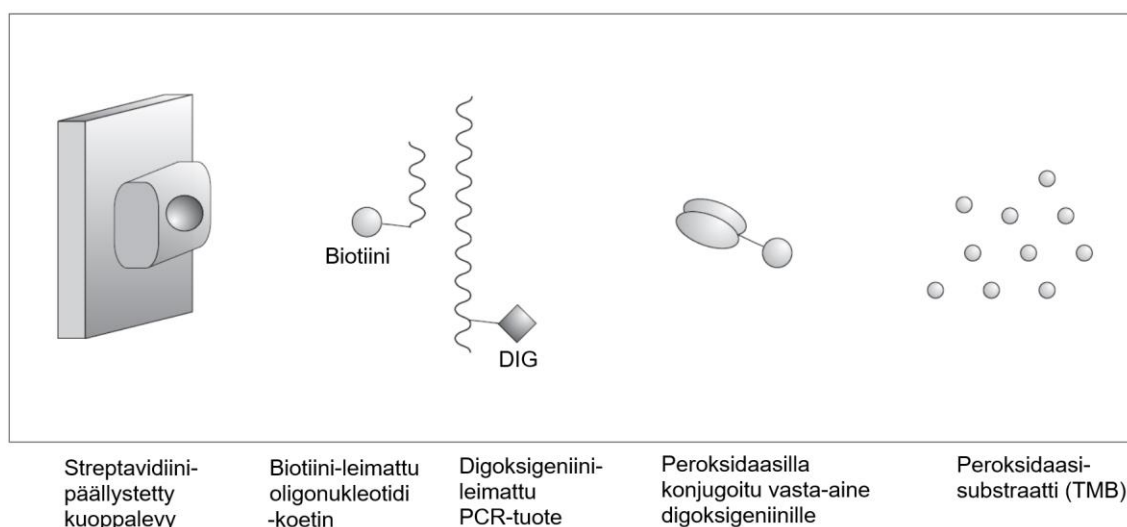
Roche:n Mycoplasma PCR ELISA -kitin mukana toimitettiin kaikki tarvittavat reagenssit sekä PCR:ää, että ELISA-testiä varten. Näytteenkäsittelyä varten kitin mukana tuli lyysaus- ja neutralisointireagenssit. Positiivista kontrollia varten toimitettiin positiivinen kontrolli-DNA. PCR:ää varten toimitettiin PCR Ready-To-Go Mix, joka sisältää nukleotidit, DIG-dUTP:n, mykoplasma-spesifiset alukkeet ja DNA-polymeraasin. ELISA-testiä varten kittiin kuului streptavidini-päällystetty kuoppalevy, denaturointi-reagenssi, biotiini-leimattu oligonukleotidi -koetin, anti-DIG-POD-liuos, TMB-substraatti, pesupuskuri ja pysäytysliuos. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 3-4.)

Mycoplasma PCR ELISA -testissä huoneenlämmössä sulatetut näytteet sentrifugoitiin 13000 x g +8 °C:ssa 10 minuuttia ja sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin. Näyteputkiin lisättiin 10 µl steriiliä vettä ja 10 µl lyysausreagenssia, johon sentrifugoinnissa mahdollisesti muodostunut pelletti suspensoitiin. Vesi ja lyysausreagenssi lisättiin kaikkiin putkiin joka tapauksessa, vaikka näkyvää pellettiä ei olisi muodostunut. Negatiivista kontrollia varten sekoitettiin 10 µl steriiliä vettä ja 10 µl lyysausreagenssia, positiivista kontrollia varten 10 µl positiivista kontrolli-DNA:ta ja 10 µl lyysausreagenssia. Tämän jälkeen näytteitä ja kontrolleja inkuboitiin tunti 37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen näytteisiin ja kontrolleihin lisättiin 30 µl neutralisointireagenssia. Jokaista näytettä ja kontrollia varten sekoitettiin PCR Ready-To-Go Mix:ä ja steriiliä vettä keskenään ja seos jaettiin PCR-putkiin. Yhtä näytettä varten seokseen pipetoitiin 25 µl PCR Ready-To-Go Mix:ä ja 15 µl steriiliä vettä ja tätä seosta pipetoitiin 40 µl kuhunkin PCR-putkeen. PCR Ready-To-Go Mix:n DIG-dUTP tekee PCR:ssä syntyvästä DNA:sta digoksigeniini-leimattua. PCR-putkiin lisättiin 10 µl näytettä tai kontrollia ja tehtiin PCR-ajo taulukon 2 mukaisella ohjelmalla.

PCR-ajon jälkeen, seuraavana päivänä, tehtiin ELISA-testi PCR-tuotteille. 10 µl:aan kutakin PCR-tuotetta sekoitettiin 40 µl denaturointi-reagenssia ja seosta inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä. Seokseen lisättiin 450 µl hybridisaatioreagenssia, joka sisältää biotiini-leimattuja oligonukleotidejä. Hybridisaatioseoksessa biotiini-leimatut oligonukleotidi-koettimet sitoutuivat positiivisissa näytteissä mykoplasman DNA-sekvenssiin. Hybridisaatioseosta pipetoitiin 200 µl streptavidini-päällystetylle kuoppalevyille. Kuoppalevyllä biotiini sitoutui streptavidinin kanssa ja mykoplasma-positiivisissa näytteissä myös digoksigeniinilla leimattu PCR-tuote sitoutui koettimen välityksellä. Kuoppalevyä

inkuboitiin 3 tuntia 37 °C:ssa välillä pyörivin liikkein levyä sekoittaen. Inkuboinnin jälkeen hybridisaatioseos poistettiin levyltä ja levy pestiin kolmesti pesupuskurilla.

Seuraavaksi kuoppiin lisättiin 200 µl peroksidaasilla konjugoitua vasta-ainetta digoksigeniinille (Anti-DIG-POD), jolloin vasta-aine sitoutui digoksigeniini-leimatus PCR-tuotteen kanssa. Kuoppalevyä inkuboitiin huoneenlämmössä puoli tuntia tasoravistelijassa nopeudella 300 rpm. Inkuboinnin jälkeen vasta-aine poistettiin levyltä ja levy pestiin viidesti pesupuskurilla. Levylle pipetoitiin 100 µl TMB-substraattia, joka peroksidaasin vaikutuksesta värjäsi positiivisen näytteen siniseksi. Levyä inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuuttia tasoravistelijassa nopeudella 300 rpm. Inkuboinnin jälkeen substraatin päälle lisättiin 100 µl pysäytysliuosta ja absorbanssi mitattiin kuoppalevynlukijalla. Viimeiseksi lisätty pysäytysliuos muutti sinisen värin keltaiseksi. Kuviossa 4 on esitetty ELISA-testin periaate.



KUVIO 4. Mycoplasma PCR ELISA -kitin ELISA-testin periaate (Roche Diagnostics GmbH 2012, 17, muokattu)

### 5.3 Kolorimetriset menetelmät

#### 5.3.1 Plasmotest™

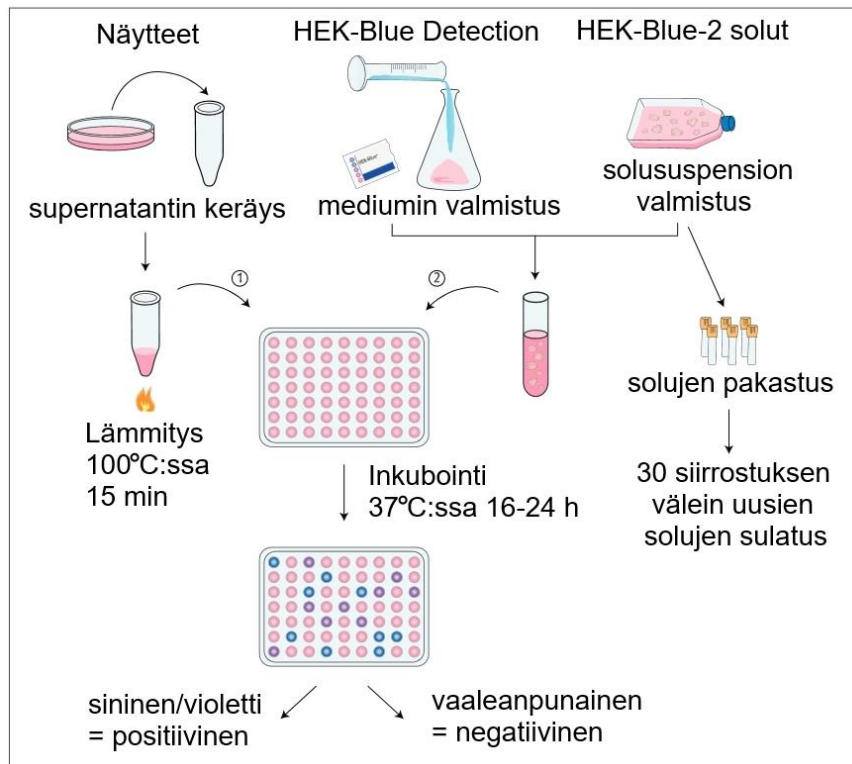
InvivoGen:n Plasmotest™ on soluihin perustuva testi, joka tehtiin 96-kuoppalevyllä. Menetelmässä käytettiin HEK-Blue-2 –soluja, joiden pinnalla oleva toll-like reseptori 2 (TLR2) pystyy havaitsemaan mykoplasman. (InvivoGen, 4, 6.) Toll-like-reseptorit ovat molekyylijä, jotka toimivat sensoreina myös immuunivasteessa mikrobeja vastaan

(Wang, Miyahara & Wang 2008, 181). Mykoplasman havaittuaan TLR2 aktivoi transkriptiotekijöitä, kuten NF- $\kappa$ B:n ja AP-1:n, mikä saa aikaan alkalisen fosfataasin, sAP:n, erityksen. SAP on reportteriproteiini, joka pystytään helposti havaitsemaan sinisenä tai violettina värinä HEK-Blue Detection -mediumissa. (InvivoGen, 4-5.)

Kitin mukana toimitettiin HEK-Blue-2 -solut, HEK-Blue Detection -medium, HEK-Blue -vettä, positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä antibiootteja HEK-Blue-2 -solujen viljelyä varten. HEK-Blue-2 -solut toimitettiin pakastettuina ja niistä valmistettiin aluksi omat kryoputket, jotka pakastettiin nestetyypitankkiin. HEK-Blue-2 -soluja viljeltiin petriimaljoilla DMEM-mediumissa, johon oli lisätty FBS:ää, Pen/Strep:iä, L-glutamiinia sekä kitin mukana toimitettuja antibiootteja, eli HEK-Blue-Selection:ia ja Normocin:ia. Jatkossa kittiä voi tilata myös ilman HEK-Blue-2 -soluja. Soluja voi käyttää mykoplasma-testissä passageen 30 asti, jonka jälkeen sulatetaan nestetyypitankista uudet solut (InvivoGen, 11).

Kuviossa 5 on esitetty PlasmoTest™ -kitin suoritus kaaviokuvana. Mykoplasma-testiä varten valmistettiin HEK-Blue Detection-medium, liuottamalla HEK-Blue Detection -jauhe 50 ml:aan HEK-Blue -vettä. Detection-medium suodatettiin 0,2  $\mu$ m suodattimella ja se jaettiin alieriin ja pakastettiin -20 °C:ssa. Myös negatiivinen ja positiivinen kontrolli liuotettiin lisäämällä kumpaankin 1 ml HEK-Blue -vettä. Näistä kontrolliliuoksista tehtiin vielä testiä varten 100  $\mu$ l kumpaakin kontrollia laimentamalla 1:10.

Testi aloitettiin kumentamalla näytteitä 100 °C:ssa 15 minuuttia. Jäähdyneet näytteet sekoitettiin vorteksoimalla ja pipetoitiin kutakin näytettä ja kontrollia 50  $\mu$ l kuoppalevyille. Seuraavaksi valmistettiin HEK-Blue-2 solususpensio niin, että 200  $\mu$ l:ssa suspensiota olisi noin 50 000 HEK-Blue-2 -solua. Petriimaljalta kerätyistä soluista tehtiin Bürkerin kammiolla solulasku ja laskun perusteella suspensio laimennettiin sopivaksi HEK-Blue Detection -mediumilla. Kuoppiin lisättiin 200  $\mu$ l HEK-Blue-2 solususpensiota. Kun HEK-Blue-2 solut oli lisätty kuoppiin, inkuboitiin levyä 37 °C:ssa seuraavaan päivään. Tulokset tarkistettiin silmämääräisesti ja lisäksi mitattiin absorbanssi kuoppalevynlukijalla. Silmämääräisesti tarkasteltuna sininen tai violetti väri tarkoitti, että tulos oli positiivinen ja vaaleanpunainen, että tulos oli negatiivinen.



KUVIO 5. Plasmotest™ -kitin suoritus (InvivoGen, 6)

### 5.3.2 MycoProbe™

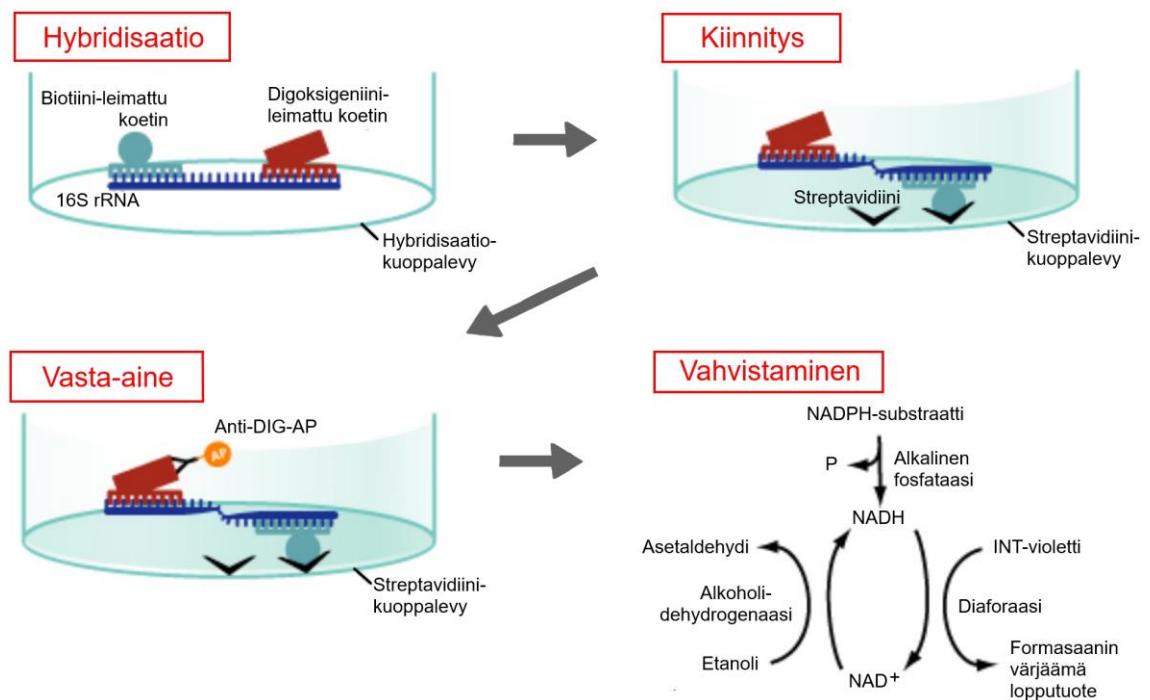
R&D Systems:n MycoProbe™ -testi tehdään 96-kuoppalevyllä ja se havaitsee mykoplasman genomin 16S rRNA:n. Kitin mukana toimitettiin streptavidini-päällystetty kuoppalevy, hybridisaatiokuoppalevy, koettimet, lyysausreagenssi, anti-DIG-AP, substraatti, vahvistaja, pesupuskuri, pysäytysliuos ja positiivinen kontrolli. (R&D Systems, Inc 2016, 2, 4.)

MycoProbe™ -testiä varten valmistettiin substraattiliuos liuottamalla kylmäkuivattu pelletti 6 ml:aan substraattiliuotinta ja vahvistajaliuos vastaavasti liuottamalla kylmäkuivattu pelletti 6 ml:aan vahvistajaliuotinta. Sekä substraatti että vahvistajaliuos jaettiin alieriin ja pakastettiin -80 °C:ssa. Näytteet laimennettiin valmiiksi kittiin kuuluvalla lyysausreagenssilla ennen pakastusta, joten näytteet olivat sulatuksen jälkeen valmiita lisättäväksi kuoppalevyille. Sekä näytteet että kontrollit tehtiin duplikaatteina, kitin ohjeistuksen mukaan.

Testi aloitettiin pesemällä hybridisaatiokuoppalevy kahdesti pesupuskurilla. Kuoppalevyille lisättiin ensimmäisenä 50 µl koetin-seosta ja seuraavaksi 150 µl lyysattuja näytteitä

sekä kontrolleja. Tällöin lyysattu näyte hybridisoitiin biotiini-leimatun koettimen ja digoksigeniini-leimatun koettimen kanssa. Levyä inkuboitiin tunti 65 °C:ssa lämpökaapissa. Streptavidiini-päällystetty kuoppalevy pestiin kahdesti pesupuskurilla ja jokaisesta hybridisaatiolevyn kaivosta siirrettiin 150 µl hybridisaatioseosta streptavidiinilevyille. Hybridisaatioseoksen biotiini-leimattu koetin kiinnittyi streptavidiinilevyille. Levyä inkuboitiin tunnin ajan tasoravistelijassa nopeudella 300 rpm.

Streptavidiinilevy pestiin neljästi, kaivoihin pipetoitiin 200 µl alkalisella fosfataasilla konjugoitua vasta-ainetta digoksigeniinille (Anti-DIG-AP) ja levyä inkuboitiin tunti. Inkuboinnin aikana anti-DIG-AP sitoutui digoksigeniini-leimatun koettimen kanssa. Seuraavaksi levy pestiin kuudesti, levyllä pipetoitiin 50 µl NADPH:ta sisältävää substraattia ja levyä inkuboitiin tunti. Inkuboinnin jälkeen kaivoihin lisättiin 50 µl INT-violettia sisältävää vahvistajaliuosta, jolloin positiiviset näytteet värjäntyivät tummanpunaisiksi. Puolen tunnin inkuboinnin jälkeen levyllä lisättiin 50 µl pysäytysliuosta ja levyllä mitattiin optinen tiheys kuoppalevynlukijalla. Testin periaate on esitetty kuviossa 6.



KUVIO 6. MycoProbe™ -testin periaate (R&D systems, muokattu)

## 5.4 Luminesenssimenetelmä

### 5.4.1 MycoAlert™

Luminesenssiin perustuvana menetelmänä käytössä oli Lonza:n MycoAlert™ kitti. Testi tehtiin 96- kuoppalevyllä. Kitin mukana toimitettiin MycoAlert-reagenssi ja MycoAlert-substraatti. Positiivinen kontrolli tilattiin erikseen. Testiä varten MycoAlert-reagenssi- ja -substraattipelletit liuotettiin 10 ml:aan MycoAlert-puskuria. Näytteet sentrifugoitiin ennen pakastamista, joten sulatuksen jälkeen näytteet olivat valmiita testattavaksi.

Kuoppalevyllä pipetoitiin 100 µl näytteitä, yhteen kuoppaan positiivista kontrollia ja yhteen kuoppaan negatiiviseksi kontrolliksi steriiliä vettä. Kuoppalevyllä näytteet pipetoitiin jättäen väliin tyhjiä kaivoja, sillä positiivinen kontrolli aiheutti hieman signaalia myös viereisissä tyhjiissä kaivoissa. Näytteisiin ja kontrolleihin lisättiin 100 µl MycoAlert-reagenssia ja 5 minuutin kuluttua mitattiin luminesenssi kuoppalevynlukijalla. Seuraavaksi kaivoihin lisättiin 100 µl MycoAlert substraattia ja mitattiin luminesenssi uudestaan 10 minuutin kuluttua. Mittaustuloksista laskettiin jälkikäteen jälkimmäisen ja ensimmäisen mittauksen suhde ja suhdeluvusta katsottiin, oliko tulos negatiivinen vai positiivinen.

MycoAlert-reagenssi sisältää lyysayspuskuria, lusiferaasia ja lusiferiinia. MycoAlert-substraatti on mykoplasmojen entsyymeille spesifistä substraattia. Ensimmäinen mittaus suoritetaan MycoAlert-reagenssin lisäämisen jälkeen, jolloin mitataan ATP:n taustataso, eli solujen tuottama ATP. MycoAlert-substraatin lisäämisen jälkeen mitataan toinen mittaus. Jos näytteessä on mykoplasmaa, ATP-taso on noussut ja toinen mittaus antaa korkeamman luminesenssi-arvon kuin ensimmäinen mittaus. (Lonza 2016.) Kitin periaate on esitetty kuviossa 7.



KUVIO 7. MycoAlert™ -kitin periaate (Lonza 2016, muokattu)

## 5.5 Mikroskopointimenetelmä

### 5.5.1 MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit

Fluoresenssimikroskopiaan perustuvana testinä käytössä oli Molecular Probes:n MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit. Kitin mukana toimitettiin MycoFluor-reagenssi, mykoplasma MORFS (microscopic optical replicas for fluorescence assays) -liuos ja peitinlasi tiivistysaine. Lisäksi kitin mukana tuli esimerkkikuvia, joiden tarkoitus on helpottaa mykoplasman tunnistamista mikroskoipoitaessa.

Mykoplasma MORFS on liuos, jota käytetään positiivisena kontrollina, sillä se matkii MycoFluor-reagenssilla värjätyin mykoplasman kokoa, muotoa ja fluoresenssin voimakkuutta fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltuna. MORFS-liuos sisältää halkaisijaltaan 0,1 µm ja 0,3 µm olevia partikkeleita. Näytteitä mikroskoipoitaessa fluoresenssimikroskoopissa käytetään noin 365 nm:n eksitaatiosuodatinta ja noin 450 nm:n emissiosuodatinta. Objektiivina käytetään 100 x suurentavaa öljyimmersio-objektiivia. (Molecular Probes, Inc 2001, 1, 3.)

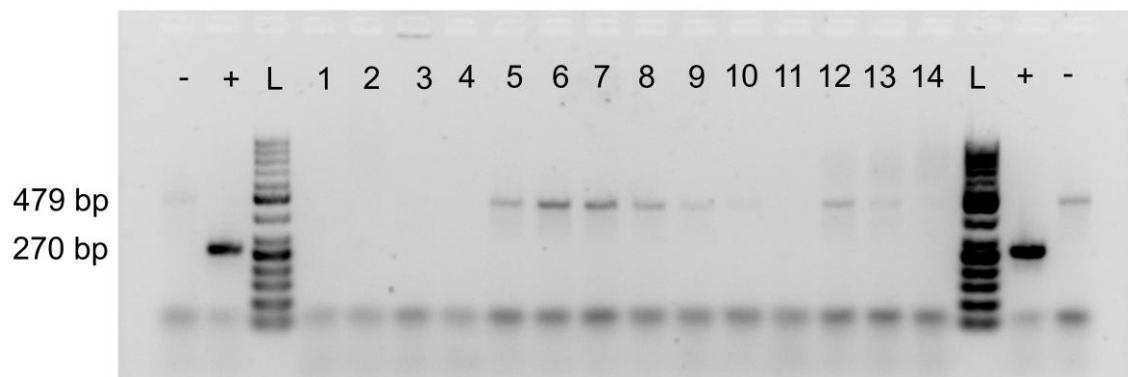
MycoFluor™ –kittiä varten kutakin näytettä tehtiin kaksi näyteputkea, joista toinen pakastettiin ja toinen analysoitiin heti, sillä näytteiden säilyvyydestä ei ollut tietoa saatavilla. Näytteenkäsittelyvaiheessa sekä pakastettavat, että heti analysoitavat näytteet sentrifugoitiin kertaalleen nopeudella 1300 x g. Kun näytteet testattiin (heti näytteenkäsittelyn jälkeen tai sulatettuna pakastuksen jälkeen) ne sentrifugoitiin uudestaan nopeudella 12500 x g 15 minuuttia. Supernatanttia poistettiin niin, että sitä jätettiin putkeen noin 0,5 ml. Sentrifugoinnin aikana mahdollisesti muodostunut pelletti suspensioitiin jätettyyn supernatanttiin.

0,5 ml:aan näytettä lisättiin 26 µl MycoFluor-reagenssia ja seosta pipetoitiin objektilasille 10 µl. Näytteen päälle asetettiin peitinlasi, joka kiinnitettiin kuumassa vedessä sulatetulla tiivistysaineella. Positiivinen kontrolli valmistettiin käyttämällä jotakin näytteistä ja MORFS-liuosta. Objektilasille pipetoitiin 5 µl MORFS-liuosta ja 5 µl näytettä, johon oli lisätty MycoFluor-reagenssi. Mikroskoipoitaessa käytettiin DAPI-suodatinta eli eksitaatiosuodattimen aallonpituus oli 365 nm ja emissiosuodattimen 445 nm. Ensin mikroskoipoitiin positiivinen kontrolli ja tutkittavia näytteitä verrattiin kontrollinäytteeseen. Lisäksi näytteitä verrattiin kitin mukana toimitettuihin esimerkkikuviiin.

## 6 TULOKSET

### 6.1 PCR-menetelmät

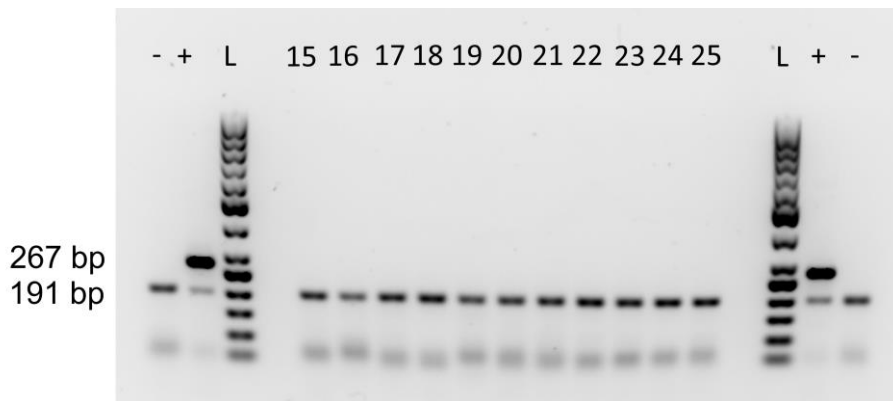
PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitissä sisäisen kontrolli-DNA:n aiheuttama bändi ei aina näkynyt näytteissä eikä negatiivisissa kontrolleissa. Sisäinen kontrolli tulisi näkyä kaikissa näytteissä sekä negatiivisissa kontrolleissa, jotta tiedetään, että PCR-reaktio on onnistunut. Kuvasta 2 nähdään, että näytteissä 1-4, 11 ja 14 ei ole havaittavissa sisäisen kontrolli-DNA:n bändiä kohdassa 479 bp. Sisäinen kontrolli näkyy toisessa negatiivisessa kontrollissa vain hyvin himmeästi, samoin näytteissä 10 ja 13. Näytteissä voi joskus olla PCR-reaktiota inhiboivia aineita, mutta se ei selitä, miksi negatiiviset kontrollit eivät aina onnistuneet. Lisäksi kun osa näytteistä testattiin uudestaan, esimerkiksi näytteissä 5 ja 6 ei näkynyt sisäistä kontrollia, vaikka ensimmäisellä testauskerralla sisäinen kontrolli näkyi näissä näytteissä selvästi. Myöskään näytteiden konsentroiduilla ei havaittu olevan vaikutusta ongelmiin, sillä myös konsentroiduissa näytteissä sisäisen kontrollin toimivuus vaihteli.



KUVA 2. PCR Mycoplasma Test Kit I/C -testin PCR-tuotteet agarosigeelillä. Geelillä on näytteet 1-14, kokostandardi on merkattu L-kirjaimella ja kontrollit +/-.

Venor®GeM -kitillä kaikista näytteistä saatiin negatiiviset tulokset. Tulokset olivat selkeät ja sisäisen kontrollin kanssa ei ollut vastaavia ongelmia kuin PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitin kanssa. Kuvasta 3 nähdään, että Venor®GeM -testissä sisäisen kontrolli-DNA:n bändi näkyi tummana ja selkeänä sekä näytteissä, että negatiivisissa kontrolleissa. Myös positiivisissa kontrolleissa näkyi hieman heikompana sisäisen kontrolli-DNA:n bändi.





KUVA 3. Venor®GeM -testin PCR-tuotteet agarosigeelillä. Geelillä on näytteet 15-25, kokostandardi on merkattu L-kirjaimella ja kontrollit +/-.

Myös Mycoplasma PCR ELISA -kitillä tulokset olivat negatiivisia kaikille näytteille. Positiiviset kontrollit pystyttiin havaitsemaan silmämääräisesti positiivisiksi, sillä ne värjäytyivät TMB-substraatin lisäyksen jälkeen sinisiksi ja pysäytysliuoksen lisäyksen jälkeen keltaisiksi. Absorbanssin mittauksen jälkeen tulokset olivat selkeät eli negatiiviset näytteet ja kontrollit alittivat selvästi negatiivisen tuloksen rajan, kun taas positiiviset kontrollit ylittivät tarvittavan positiivisen tuloksen rajan. Kuvassa 4 on Mycoplasma PCR ELISA -testi TMB-substraatin lisäyksen ja pysäytysliuoksen lisäyksen jälkeen.

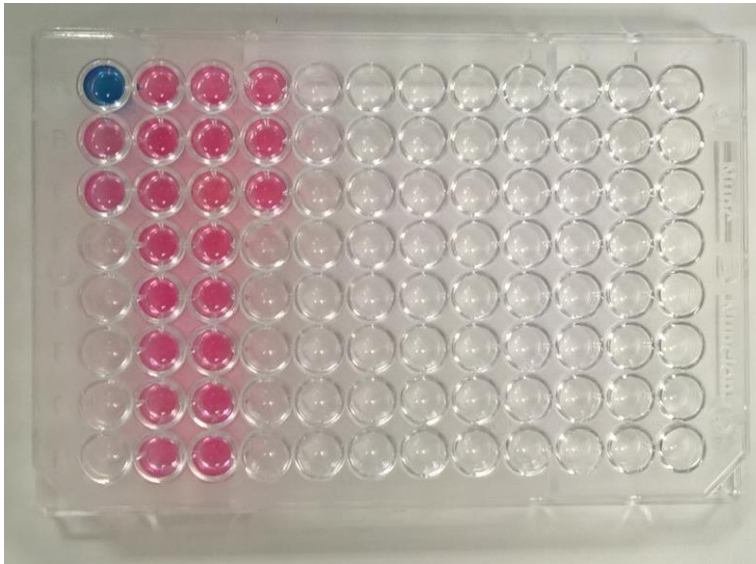


KUVA 4. Mycoplasma PCR ELISA -testi näytteille 26-33. Kuoppalevyllä lisäksi kaksi positiivista kontrollia ja kaksi negatiivista kontrollia.

## 6.2 Kolorimetriset menetelmät

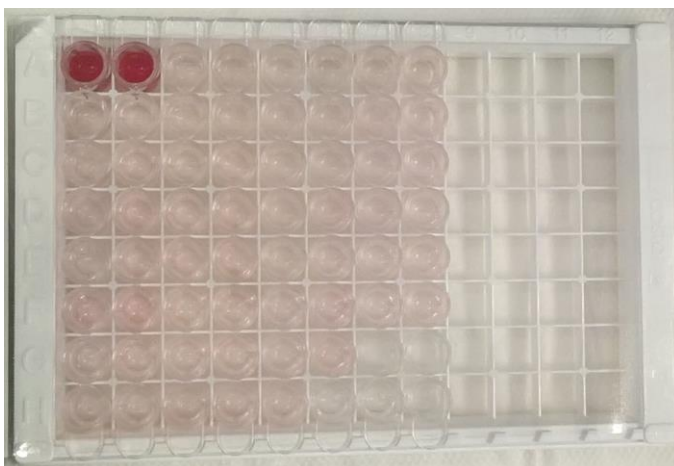
PlasmoTest™ -kitillä saatiin näytteestä 10 positiivinen tulos ja muista näytteistä negatiivinen. PlasmoTest™-kitin tulokset erosivat kyseisen positiivisen näytteen kohdalla muista kiteistä, sillä muilla kiteillä näyte oli negatiivinen. Positiivinen näyte testattiin uudestaan ja molemmilla testikerroilla tulos oli positiivinen. Näytteen 10 solut eivät olleet

enää kasvatuksessa, kun tulokset saatiin, muuten soluista olisi voitu ottaa uusi näyte ja testata se uudestaan kaikilla kiteillä. Kuvassa 5 on tehty testi näytteistä 15-33, positiivinen kontrolli on väriltään sininen, kun negatiivinen kontrolli ja negatiiviset näytteet ovat vaaleanpunaisia.



KUVA 5. PlasmoTest™ -kitillä tehty testi näytteistä 15-33

MycoProbe™ -kitillä saatiin kaikista näytteistä negatiivinen tulos. Tulokset olivat selkeät ja mitatut absorbanssit asettuivat selvästi negatiivisen tulokset puolelle, eikä arvot jääneet kertaakaan negatiivisen ja positiivisen tuloksen rajalle, jolloin näytteet olisi täytynyt testata 2-3 vuorokauden päästä uudestaan. Kuvassa 6 on kuoppalevyllä kontrollit ja näytteet 7-33 duplikaatteina, lisäksi kuoppalevyllä on yksi ylimääräinen näyte, joka ei ollut mukana kittien vertailussa. Positiiviset kontrollit ovat värjäytyneet punaisiksi ja negatiiviset kontrollit ja näytteet olivat vaaleanpunaisia.



KUVA 6. MycoProbe™ -testi näytteistä 7-33

### 6.3 Luminesenssimenetelmä

MycoAlert™ -kitillä yksi näyte jäi epäselväksi, oliko se negatiivinen vai positiivinen. Kaikki muut näytteet osoittautuivat negatiivisiksi. Näytteestä 7 saatiin testissä negatiivisen ja positiivisen tuloksen rajalla oleva tulos, joten sama näyte testattiin uudestaan. Uusinnassa näytteestä saatiin edelleen rajalle jäävä tulos, joten ei ole täyttä varmuutta oliko näyte negatiivinen vai positiivinen. Kyseisistä soluista ei voitu ottaa uutta näytettä, sillä solut eivät olleet enää kasvatuksessa, kun testi tehtiin.

### 6.4 Mikroskopointimenetelmä

MycoFluor™ -testissä tulosten tulkinta oli epäselvää, sillä ohjeessa mainitaan, että muutamien mykoplasman kaltaisen partikkelin esiintymistä näytteessä ei voida pitää vielä merkinä kontaminaatiosta. Lisäksi ohjeen mukaan negatiivinen tulos ei tarkoita täysin varmasti, että näytteessä ei ole mykoplasmaa. Kuvassa 7 on kaksi samalla tavalla, mutta eri kerralla tehtyä positiivista kontrollia ja yksi näyte, joista on otettu mikroskoopilla kuva samalla suurennoksella. Kuvasta nähdään, että positiivisissa kontrolleissa mykoplasmaa matkivien partikkelien määrä vaihteli runsaasti. Osassa näytteissä ei näkynyt lainkaan positiivisten kontrollien kaltaisia partikkeleita, jolloin tulosten tulkinta oli selkeää. Joissain näytteissä, kuten esimerkiksi näytteessä 12, partikkeleita oli kuitenkin useampia, jolloin oli hankalaa tulkita, onko näyte negatiivinen vai positiivinen. Missään näytteessä ei kuitenkaan ollut suuria määriä positiivisten kontrollien kaltaisia partikkeleita, joten kaikki näytteet tulkittiin tällä testillä negatiivisiksi. Eroja pakastettujen ja heti analysoitavien näytteiden välillä ei ollut havaittavissa.



KUVA 7. Mikroskoopilla 100 x suurennuksella otetut kuvat kahdesta eri positiivisesta kontrollista ja näytteestä 12

## 6.5 Menetelmien vertailu

Testattavia näytteitä oli 33 kappaletta ja lähes kaikilla eri kiteillä kaikki näytteet olivat negatiivisia. Ainoastaan yksi näyte oli Plasmotest™-kitillä positiivinen ja MycoAlert™-kitillä saatiin yhdestä näytteestä negatiivisen ja positiivisen tuloksen välillä oleva tulos. Lisäksi PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitillä kaikista näytteistä ei saatu selvyttä, sillä kitin toimivuudessa oli ongelmia. Myös MycoFluor™-kitillä tulosten tulkinta oli epävarmaa. Kaikkien kittien tulokset on taulukoitu liitteessä 1.

Testikittejä vertailtaessa tarkasteltiin kunkin kitin käytettävyyttä, onnistuvuutta, testiin kuluvaa työaikaa ja sitä, kuinka nopeasti tulokset saadaan sekä testauksen hintaa, spesifisyyttä ja herkkyyttä. Käytettävyydellä ja onnistuvuudella tarkoitetaan sitä, miten helpolta testien suorittaminen vaikutti, sisältävätkö testit monia eri vaiheita ja onnistuivatko testit hyvin vai oliko testauksessa ongelmia. Käytettävyyttä ja onnistuvuutta voidaan pitää ominaisuuksista yhtenä tärkeimpänä, sillä erityisesti onnistuvuudella on suuri vaikutus saatuihin tuloksiin.

Aktiivisella työajalla tarkoitetaan sitä aikaa, joka työntekijällä kuluu testin tekemiseen. Nopeudella taas tarkoitetaan, kuinka nopeasti testillä saa tulokset. Eli tulosten saamiseen voi kulua pidempi aika, kuin mitä varsinainen aktiivinen työaika on, sillä joihinkin testeihin kuuluu esimerkiksi pitkiä inkubaatioaikoja. Testikittien hinnat on taulukoitu liitteessä 2. Hintojen vertailua varten laskettiin kuinka paljon yhden näytteen testaaminen maksaa, eli kitin kokonaishinta jaettiin kitin testimäärällä.

Spesifisyyttä (liite 3) ja herkkyyttä tarkasteltaessa vertailtiin valmistajien ilmoittamia tietoja. Spesifisyydellä tarkoitetaan kitin kykyä tunnistaa eri mykoplasmaalajeja ja herkkyydellä taas sitä, kuinka pieniä määriä mykoplasmaa kitit havaitsevat. Joissain kiteissä luettiin kaikki havaittavat mykoplasmaalajit, joissain luoteltiin esimerkkilajeja ja todettiin, että lisäksi kitti tunnistaa myös monia muita lajeja. Joissain kiteissä ilmoitettiin, että kitti tunnistaa kaikki mykoplasmaalajit, joiden tiedetään olevan soluviljelyjä kontaminoivia. Kitistä riippuen herkkyys oli ilmoitettu joko joillekin tietyille mykoplasmaalajeille tai yleisesti kaikille lajeille. MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit -kitistä ei ilmoitettu spesifisyyttä eikä herkkyyttä.

Taulukossa 3 on kittien eri ominaisuudet pisteytetty tähdin niin, että viisi tähteä on paras mahdollinen ja yksi tähti huonoin. Venor®GeM Classic oli ainoa kitti, joka sai kaikista ominaisuuksista vähintään kolme tähteä. MycoAlert™-testi sai vertailluista testeistä eniten viiden tähden pisteytyksiä, mutta yhdestä ominaisuudesta se sai vain yhden tähden. Eniten yhden tähden pisteytyksiä taas sai Mycoplasma PCR ELISA-kitti.

TAULUKKO 3. Testikittien ominaisuuksien vertailu

Testikitti	Käytettävyys & onnistuvuus	Aktiivinen työaika	Nopeus	Hinta	Spesifisyys	Herkkyys
MycoAlert™	****	*****	*****	*	*****	*****
MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit	**	*****	*****	****	ei ilmoitettu kitissä	ei ilmoitettu kitissä
Mycoplasma PCR ELISA	***	*	*	*	****	****
MycoProbe™	***	**	**	**	****	****
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	*	***	***	**	*****	****
PlasmoTest™	****	***	*	*****	*****	****
Venor®GeM Classic	*****	***	***	***	****	*****

## 7 POHDINTA

Tällä hetkellä Tampereen yliopiston soluviljelyosaston eri ryhmillä on käytössään erilaisia mykoplasmamääritysmenetelmiä. Opinnäytetyön tavoitteena oli soluviljelyosastolle sopivimman määritysmenetelmän valitseminen. Tarkoituksena oli testata erilaisia mykoplasma-testikittejä soluviljelyistä otetuilla näytteillä. Saatuja tuloksia ja kittien käyttöohjeiden tietoja oli tarkoitus verrata keskenään. Vertailun perusteella voitaisiin soluviljelyosastolle valita yksi yhteinen menetelmä, jota kaikki tutkimusryhmät käyttäisivät.

Työssä vertailtiin seitsemää erilaista kittiä, joista osa osoittautui hyvin toimiviksi ja helpokäyttöisiksi, kun taas osassa kiteissä oli ongelmia toimivuudessa tai ne olivat haastavampia toteuttaa. Kaikki kitit, joissa tiedot ilmoitettiin, olivat spesifisyydeltään ja herkkyydeltään hyviä ja saivat vertailussa vähintään neljä tähteä. MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit -testin käyttöohjeessa ei erikseen ilmoitettu spesifisyyttä eikä herkkyyttä. Muissa ominaisuuksissa oli enemmän vaihtelua kittien välillä.

Minerva Biolabs:n Venor®GeM Classic oli tasalaatuinen testi, jossa oli paljon hyviä puolia, eikä ollenkaan suuria heikkouksia. Venor®GeM Classic osoittautui kaikissa vertailtavissa ominaisuuksissa hyväksi ja sai kaikista ominaisuuksista vähintään kolme tähteä. Erityisen hyvä kitti oli käytettävyydeltään ja onnistuvuudeltaan sekä herkkyydeltään. Venor®GeM Classic olisi testatuista kiteistä Tampereen yliopiston Laboratoriopalvelutyksikölle sopivin, koska se oli helppokäyttöinen, PCR-reaktiot onnistuivat jokaisella testikerralla, testi oli kohtuullisen nopea suorittaa ja kitti oli hinnaltaan testatuista kiteistä kolmanneksi halvin. Yhtenä tärkeimpänä perusteluna kitin valinnalle voidaan pitää kitin antamien tulosten selkeyttä eli sitä, että ne eivät jääneet tulkinnan varaan. Lisäksi Pen/Strep:n käytöllä ei ole huomattu olevan vaikutusta testin herkkyyteen, mitä voidaan pitää kitin yhtenä etuna, sillä Pen/Strep on myös Tampereen yliopistolla soluviljelyissä paljon käytetty antibiootti.

InvivoGen:n Plasmotest™ oli myös yksi vertailun parhaista kiteistä. Se oli vertailun halvin kitti ja myös helppokäyttöinen. Huonoimpana puolena Plasmotest™ -kitissä oli, että tulosten saaminen oli toisiin testeihin nähden hidasta, sillä tulokset sai vasta seuraavana päivänä testin suorittamisesta. Tosin siitä ei ole olennaisesti haittaa, että tuloksen saa

vasta seuraavana päivänä testin suorituksesta. Testin suorittamisen lisäksi Plasmotest™ vaatii HEK-Blue-2 -solujen ylläpitoa, mikä osaltaan lisää testiin kuluva työaika.

Yksi näyte oli Plasmotest™ -kitillä positiivinen ja muilla kiteillä se oli negatiivinen. Ei ole varmuutta, oliko näyte positiivinen ja muut kitit eivät sitä tunnistanee, vai antoiko Plasmotest™ väärän positiivisen tuloksen. Kitin käyttöohjeen mukaan positiivinen tulos vahvistaa, että näytteessä on soluseinällisen bakteerin aiheuttama kontaminaatio, jos soluja on kasvatettu ilman antibiootteja ja siinä on näkyviä merkkejä kontaminaatiosta. Jos taas näkyviä merkkejä kontaminaatiosta ei ole, tällöin olisi kyse mykoplasmakontaminaatiosta. Kyseisen positiivisen näytteen kasvatuksessa ei käytetty antibiootteja, eikä myöskään merkkejä kontaminaatiosta ollut. Kitti voi siis antaa positiivisen tuloksen muistakin bakteerikontaminaatioista, kuin mykoplasmakontaminaatiosta. Voi siis olla, että näytteessä oli muu kuin mykoplasmakontaminaatio, minkä takia muut kitit eivät antaneet positiivista tulosta. Jos näytteessä oli todella mykoplasmakontaminaatio, antaisi se kitille lisäarvoa, jos se tunnistaisi sellaisia mykoplasmakontaminaatioita, joita muut kitit eivät pystyneet tunnistamaan.

Lonza:n MycoAlert™ -kitti oli monelta ominaisuudeltaan erittäin hyvä, mutta kitti oli vertailuista kiteistä kallein. Kitti oli todella helppokäyttöinen ja myös erittäin nopea. Kitin käytettävyyttä ja onnistuvuutta kuitenkin hieman laskee mahdollisuus tuloksiin, jotka ovat negatiivisen ja positiivisen tuloksen rajalla. Kitin käyttöohjeessa lueteltiin yli neljäkymmentä mykoplasmaalajia, jotka kitti tunnistaa, joten se oli spesifisyydeltään hyvä. Kitti tunnistaa vain elävän mykoplasman, toisin kuin esimerkiksi PCR-menetelmät, jotka voivat tunnistaa näytteistä myös kuolleen mykoplasman (Lonza 2016, 12-13). MycoAlert™ -kittiä voisi suositella pikatestiksi, jos olisi tarvetta saada testattua yksittäisiä näytteitä nopeasti. Rutiinitestiksi se olisi kuitenkin reilusti kalliimpi kuin esimerkiksi Venor®GeM Classic ja lisäksi se voi antaa epämääräisiä tuloksia, jotka ovat negatiivisen ja positiivisen rajalla.

R&D Systems:n MycoProbe™ oli ominaisuuksiltaan keskinkertainen, joistain vertailtavista ominaisuuksista se sai neljä tai kolme tähteä, mutta osasta vain kaksi tähteä. Testi sisälsi monia eri vaiheita, joiden välissä oli puolesta tunnista tuntiin kestäviä inkubaatio-aikoja. Testin tekemiseen kului melko paljon aikaa ja lyhyehköt inkuboinnit tekivät työskentelystä rikkonaista. Kuoppalevyn pesemiseen ja reagenssien lisäykseen ei tarvinnut varata paljoa aikaa, mutta inkubointien aikana ei ollut kovin pitkää yhtenäistä aikaa hoitaa muita työtehtäviä, jolloin työskentely ei tuntunut yhtä sujuvalta kuin muiden kittien kohdalla.

Roche:n Mycoplasma PCR ELISA oli spesifisyydeltään sekä herkkyydeltään hyvä ja käytettävyydeltään ja onnistuvuudeltaan keskinkertainen, mutta testi vei paljon aikaa ja oli vertailuista kiteistä toiseksi kallein. Mycoplasma PCR ELISA -kitti oli selvästi hitain, sillä siinä tehtiin sekä PCR-ajo, että ELISA-testi. ELISA-testissä oli kuitenkin järkevämät inkubaatioajat kuin MycoProbe™ -testissä, sillä ensimmäinen inkubointi kesti kolme tuntia ja tämän jälkeen oli vain kaksi lyhyempää inkubointia. Ensimmäisen inkuboinnin aikana oli hyvin aikaa keskittyä muihinkin työtehtäviin.

Molecular Probes:n MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit oli nopea testi ja yksi edullisimmista kiteistä. Testin tulosten tulkinta oli kuitenkin epäselvää, eikä kitin käyttöohjeenkaan mukaan negatiivinen tulos täysin varmasti poissulje mykoplasmakontaminaatiota. Lisäksi muutamaa positiivisen kontrollin kaltaista partikkelia näytteessä ei voitu vielä tulkita positiiviseksi näytteeksi. Näin ollen positiivisen ja negatiivisen tuloksen raja oli häilyvä, eikä tuloksia voida tällöin pitää luotettavina.

PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitissä oli ongelmia kontrollien toimivuudessa sekä näytteiden PCR-reaktioiden inhiboitumisessa. Näytteiden PCR-reaktioissa esiintyi inhiboitumista sekä konsentroimattomissa, että konsentroiduissa näytteissä. PCR Mycoplasma Test Kit I/C -kitti oli muilta ominaisuuksiltaan hyvä ja testi oli todella helppokäyttöinen, mutta koska testin onnistuvuudessa oli suuria ongelmia, se ei pärjää vertailussa muille testeille.



## LÄHTEET

Doyle, A. & Griffiths, J. B. 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Drexler, H. & Uphoff, C. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology 39 (2), 75–90.

Freshney, R. I. 2016. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 7. painos. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

InvivoGen. Plasmotest™. Mycoplasma Detection Kit. Käyttöohje

Keinänen, P. 2012. Analyttinen spektroskopia lukion kemian oppimäärässä. Itä-Suomen yliopisto. Kemian laitos. Pro gradu -tutkielma.

Liaqat, I. 2011. Bioluminescence: Characteristics, Adaptations and Biotechnology. Teoksessa Rodgerson, D. (ed.) Bioluminescence: Characteristics, Adaptations and Biotechnology. New York: Nova Science Publisher, Inc. 97-114.

Life Technologies Corporation. 2012. Cell Culture Basics Handbook.

Lonza. 2016. Mycoplasma – Uncover the Hidden Enemy in Cell Culture. Tulostettu 31.01.2017. <http://www.lonza.com/mycoplasma-testing-webinar>

Meriläinen, L. 2015. Characterization and Immunological Aspects of *Borrelia burgdorferi* Pleomorphic Round Bodies. Jyväskylän yliopisto. Bio- ja ympäristötieteiden laitos. Väitöskirja.

Minerva Biolabs GmbH. 2012. Venor®GeM Classic. Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR. Käyttöohje.

Mishra, S. & Agrawal, D. 2013. A Concise Manual of Pathogenic Microbiology. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Molecular Probes, Inc. 2001. MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit (M-7006). Käyttöohje.

Poole, R. & Kalnienieks, U. 2000. Introduction to light absorption: visible and ultraviolet spectra. Teoksessa Gore, M. (ed.) Spectrophotometry and Spectrofluorimetry. New York: Oxford University Press. 1-32.

Promokine. 2016. PCR Mycoplasma Test Kit I/C. Käyttöohje.

R&D Systems, Inc. 2016. MycoProbe™. Mycoplasma Detection Kit. Käyttöohje.

R&D systems. MycoProbe Assay Principle. Tulostettu 31.01.2017. <https://www.rndsystems.com/resources/technical/mycoprobe-assay-principle>

Roche Diagnostics GmbH. 2012. Mycoplasma PCR ELISA. Käyttöohje.

Rottem, S., Kosower, N. & Kornspan, J. 2012. Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas. Teoksessa Ceccherini-Nelli, L. & Matteoli, B. (ed.) *Biomedical Tissue Culture*. InTech. 35–58.

Sino Biological Inc. What is ELISA. Tulostettu 01.02.2017.  
<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>

Solunetti. 2006. Erilaisia soluviljelyalustoja. Tulostettu 25.01.2017.  
[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/erilaisia\\_soluviljelyalustoja/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/erilaisia_soluviljelyalustoja/)

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen J. 2013. *Geenitekniikka*. 2. painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Theel, E., Carpenter, A. B. & Binnicker, M. 2015. Immunoassays for Diagnosis of infectious Diseases. Teoksessa Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. & Warnock, D. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 11. painos. Washington DC: ASM Press. 91–105.

Thermo Fisher Scientific Inc. 2016. Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder. Käyttöohje. Tulostettu 01.02.2017. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013016\\_GeneRuler\\_50bp\\_DNALadder\\_50ug\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013016_GeneRuler_50bp_DNALadder_50ug_UG.pdf)

Uphoff, C. & Drexler, H. 2005. Eradication of Mycoplasma Contaminations. Teoksessa Helgason, C. & Miller, C. (ed.) *Basic Cell Culture Protocols*. 3. painos. Totowa: Humana Press Inc. 25–34

Waites, K. & Taylor-Robinson, D. 2015. Mycoplasma and Ureaplasma. Teoksessa Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. & Warnock, D. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 11. painos. Washington DC: ASM Press. 1088–1105.

Wang, R-F. Miyahara, Y. & Wang, H. Y. 2008. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*. 27 (2), 181–189.

Wiedbrauk, D. 2015. Microscopy. Teoksessa Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. & Warnock, D. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 11. painos. Washington DC: ASM Press. 5–14.

## LIITTEET

## Liite 1. Mykoplasmamääritysten tulokset

1 (3)

TAULUKKO 4. Mykoplasmamääritysten tulokset (negatiivinen: - ja positiivinen: +)

Näyte	Testikitti						
	Myco-Alert™	MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit	Myco-plasma PCR ELISA	Myco-Probe™	PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Plasmo-Test™	Venor®GeM Classic
1	-	-	-	-	1. testaus: ei sisäistä kontrollia	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia		
					3. testaus: neg / konsentroidu näyte: ei sisäistä kontrollia		
2	-	-	-	-	1. testaus: ei sisäistä kontrollia	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia		
					3. testaus: neg / konsentroidu näyte: ei sisäistä kontrollia		
3	-	-	-	-	1. testaus: ei sisäistä kontrollia	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia		
					3. testaus: ei sisäistä kontrollia / konsentroidu näyte: ei sisäistä kontrollia		
4	-	-	-	-	1. testaus: ei sisäistä kontrollia	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia		
					3. testaus: ei sisäistä kontrollia / konsentroidu näyte: ei sisäistä kontrollia		
5	-	-	-	-	1. testaus: neg	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia / konsentroidu näyte: neg		
6	-	-	-	-	1. testaus: neg	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia / konsentroidu näyte: neg		

Näyte	Testikitti						
	MycAlert™	Mycofluor™ Mycoplasma Detection Kit	Mycoplasma PCR ELISA	Mycoprobe™	PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Plasmo-Test™	Venor® GeM Classic
7	- / +	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	1. testaus: neg	+	-
					2. testaus: neg		
11	-	-	-	-	1. testaus: ei sisäistä kontrollia	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia		
					3. testaus: ei sisäistä kontrollia / kon-sentroidu näyte: neg		
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	1. testaus: ei sisäistä kontrollia	-	-
					2. testaus: ei sisäistä kontrollia		
					3. testaus: ei sisäistä kontrollia / kon-sentroidu näyte: neg		
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
17	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
18	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-

Näyte	Testikitti						
	Myco-Alert™	MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit	Mycoplasma PCR ELISA	Myco-Probe™	PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Plasmo-Test™	Venor®GeM Classic
19	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
20	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
21	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
22	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
23	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
24	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
29	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
30	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
31	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
32	-	-	-	-	ei sisäistä kontrollia	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-

## Liite 2. Mykoplasma-testikittien hinnat

TAULUKKO 5. Mykoplasma-testikittien hinnat

Testikitti	Hinta (€) / näyte	Kitin kokonais- hinta (€)	Reaktiomäärä (kpl)
MycoAlert™	9,72	972,00	100
MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit	3,35	335,00	100
Mycoplasma PCR ELISA	8,15	782,00	96
MycoProbe™	7,92	380,00	48
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	7,07	679,00	96
PlasmoTest™	1,82	455,00	250
Venor® GeM Classic	4,08	408,00	100
MB TAQ DNA Polymerase	0,87	173,40	200
	yht. 4,95		

TAULUKKO 6. Mykoplasma-testikittien käyttöohjeissa ilmoitetut spesifisyydet. Kuusi yleisintä soluviljelyiden kontaminanttia lihavoitu.

Lajit	Testikitti					
	Myco-Alert™	Myco-plasma PCR ELISA	Myco-Probe™	PCR Myco-plasma Test Kit I/C	Plasmo-Test™	Venor®GeM Classic
<b>Acholeplasma laidlawii</b>	x	x	x	x	x	x
Acholeplasma modicum	x					
Acholeplasma morum	x					
Lactobacillus casei			x			
Mesoplasma entomophilum	x					
Mesoplasma florum	x					
Mycoplasma agussizii	x					
Mycoplasma alkalescens	x					
Mycoplasma alligatoris	x					
<b>Mycoplasma arginini</b>	x	x	x	x	x	x
Mycoplasma arthritis	x					x
Mycoplasma bovis genitalium		x				
Mycoplasma bovirhinis	x					
Mycoplasma bovis	x	x				
Mycoplasma bovoculi	x	x				
Mycoplasma buccale	x					
Mycoplasma californicum	x	x				
Mycoplasma canadense	x					
Mycoplasma cloacale	x					
Mycoplasma conjunctivae	x					
Mycoplasma crocodyli	x					
Mycoplasma equirhinis	x					
Mycoplasma faucium	x					
<b>Mycoplasma fermentans</b>	x	x	x	x	x	x
Mycoplasma gallinacium	x					
Mycoplasma gallisepticum	x					
Mycoplasma genitalium	x					x
<b>Mycoplasma hominis</b>	x		x	x		x
Mycoplasma hyopneumoniae	x	x				
<b>Mycoplasma hyorhinis</b>	x	x	x	x	x	x
Mycoplasma hyosynoviae	x					
Mycoplasma iguanae	x					
Mycoplasma lipophilum	x					
Mycoplasma muris	x					
Mycoplasma neurolyticum	x					
Mycoplasma opalescens	x					
<b>Mycoplasma orale</b>	x	x	x	x	x	x
Mycoplasma penetrans						x

2 (2)

Lajit	Testikitti					
	Myco-Alert™	Myco-plasma PCR ELISA	Myco-Probe™	PCR Myco-plasma Test Kit I/C	Plasmo-Test™	Venor®GeM Classic
M. Pg50 bovine group		x				
Mycoplasma pirum	x		x			
Mycoplasma pneumoniae	x					x
Mycoplasma primum	x					
Mycoplasma pulmonis(human)	x					
Mycoplasma pulmonis(rat)	x					
Mycoplasma salivarium	x		x	x		x
Mycoplasma spermatophilum	x					
Mycoplasma synoviae	x					x
Spiroplasma citri	x					
Ureaplasma urealyticum		x	x			x
Havaitsee kaikki <i>Mycoplasma</i> - ja <i>Acholeplasma</i> -lajit, joiden tiedetään infektoivan soluviljelyjä					x	
HUOMIOITA				Havaitsee lisäksi monia muita lajeja, joita ei ole mainittu nimeltä		