



Marianne Rahikka

qPCR-laitteen käyttöönotto ja validointi *salmonellan* kvalitatiiviseen määrittämiseen rypsi- ja rapsipuristeista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

10.1.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Marianne Rahikka
Otsikko:	qPCR-laitteen käyttöönotto ja validointi <i>salmonellan</i> kvalitatiiviseen määrittämiseen rypsi- ja rapsipuristeista
Sivumäärä:	39 sivua + 3 liitettä
Aika:	10.1.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Laatupäällikkö Arja Ojaranta Lehtori Tiina Soininen

Enterobakteereihin kuuluva *salmonella* on globaalisti yksi yleisimmistä gastroenteritiin aiheuttajista. Tuotantoeläimille syötettävissä rehuissa ei Suomen lain mukaan saa esiintyä *salmonellaa*, joten rehun tuottajan on tutkittava tuotteensa *salmonellan* varalta. Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja, Avena Kantvik Oy, tuottaa puristusprosessissaan rypsi- ja rapsiöljyn lisäksi valkuaispitoista puristetta rehuteollisuuden raaka-aineeksi. Avenan laadunvarmistuslaboratorio analysoi *salmonellaa* tuotantoprosessin lopputuotteiden vuorokausinäytteistä, lastauksen aikana kerätyistä sekä prosessiympäristöstä kerätyistä puristenäytteistä. Määrittämiseen laboratorio käyttää ISO/IEC 17025 -standardin mukaista kvalitatiivista qPCR-menetelmää.

Työn tavoitteena oli käyttöönottaa ja validoida uusi QuantStudio™ 5 qPCR-laite *salmonellan* kvalitatiiviseen määrittämiseen rypsi-/rapsipuristeista. Eryyisenä tavoitteena oli tutkia myös kolloidisen matriisin vaikutusta qPCR-reaktion onnistumiseen. Reaktiion onnistumista seurattiin sisäisen positiivisen kontrollin (IPC) monistumisen avulla. Sakkaisen näytteen tiedettiin ajoittain inhiboivan IPC:n monistumista. Inhibitiota voi kuitenkin ehkäistä näytteen laimentamisella.

qPCR-laitteelle tehtiin asennustarkastus ja toiminnallinen tarkastus. Laitteen suorituskykyä testaavat validointinäytteet olivat prosessin vuorokausinäytteitä sekä lastaus- ja ympäristönäytteitä. Esirikastettujen näytteiden soluhajotukseen ja qPCR-reaktioseoksen valmistukseen käytettiin SureTect™ *Salmonella species* PCR Assay -kitiä. Näytteet ajettiin QS5:llä, referenssimenetelmänä käytettiin PikoReal-laitetta. Ajotulokset (negatiiviset tai positiiviset) käsiteltiin RapidFinder Analysis -ohjelmalla.

qPCR-ajojen perusteella 1:5-laimennos osoittautui toimivaksi: IPC-signaali oli tasaisempi ja eksponentiaalinen vaihe oli selkeä. Tärkeintä oli kuitenkin laitteen kyky luotettavasti löytää *salmonella* näytteestä. Validoinnin aikana laite antoi 2 virhenegatiivista tulosta aidosti positiivisia näytteitä analysoitaessa, mikä vähentää laitteen herkkyttä. PikoRealiin verrattaessa uuden laitteen herkkydeksi saatiin 80 %, spesifisyydeksi 100 % ja suhteelliseksi tarkkuudeksi 91 %. Cohenin kappa K_0 oli 0,81 ($>0,80$, erittäin yhtäpitävät menetelmät) ja χ^2 -testi tuotti arvon 0,5 ($<3,84$, todellisesti ja oletettujen positiivisten tulosten välillä ei tilastollisesti merkitsevää eroa).

Avainsanat: *Salmonella*, qPCR, kvalitatiivinen validointi

Abstract

Author: Marianne Rahikka
Title: Installation and Validation of a qPCR Instrument for Qualitative Analysis of *Salmonella* from Rapeseed Expellers
Number of Pages: 39 pages + 3 appendices
Date: 10 January 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Supervisors: Arja Ojaranta, Quality Manager
Tiina Soininen, Senior Lecturer

This thesis study was conducted at Avena Kantvik Oy, a company producing high-quality oil from rapeseed. By-products from this oil-pressing process are protein-rich rapeseed expellers used as raw material in the animal feed industry. Avena's expellers are analysed in their quality control laboratory using qPCR. The aim of this study was to install and validate a new, 96-well qPCR instrument for qualitative analysis of *Salmonella* from rapeseed expellers. One of the goals was to investigate, how a colloidal matrix influences the qPCR reaction in terms of affecting (inhibiting) the amplification of internal positive control, IPC. Most of the validation samples were the end-products of oil-pressing process and more homogenic than the samples collected from the facility environment, or during the loading of expellers. This heterogenic matrix was known to occasionally cause failure in IPC amplification, which could be avoided by diluting the sample.

QuantStudio™ 5 successfully passed the installation qualification (IQ), operational qualification (OQ) and performance qualification (PQ) procedures. Validation samples of expellers were enriched in buffered peptone water, incubated, aliquoted, lysed, and analysed by QuantStudio™ 5 using a SureTect™ *Salmonella* species PCR Assay kit (Thermo Scientific). The results (negative or positive) were interpreted by RapidFinder Analysis Software. 24-well PikoReal (Thermo Scientific) qPCR instrument was used as a reference method.

As a result of several qPCR runs, diluting a colloidal sample in ratio of 1:5 provided a good IPC signal. Most important validation parameter was the instrument's capability to reliably detect *Salmonella* from the sample. The instrument gave 2 false negative results from truly positive samples, decreasing the sensitivity. When referred to PikoReal, the sensitivity of QS5 was 80% and specificity 100%. Relative accuracy was 91%, Cohen's kappa κ_0 was 0.81 (good agreement between methods, >0.80) and χ^2 was 0.5 (<3.84 , no statistically significant difference between obtained and expected positive results).

Keywords: *Salmonella*, qPCR, qualitative validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto ja työn tavoite	1
2	Teoria	2
2.1	<i>Salmonella</i>	2
2.2	qPCR-analytiikka	4
2.3	qPCR-reaktion vaiheet ja laitteiston toimintaperiaate	5
2.4	Puristematriisin vaikutus qPCR-reaktioon	9
3	Validoinnin suoritus käytännössä	10
3.1	Laitteen asentaminen ja käyttöönotto	11
3.2	Näytematriisit ja näytteiden käsittely	15
3.2.1	Puristenäytteiden valmistus ja inkubointi	15
3.2.2	Soluhajotus ja qPCR-reaktioseoksen valmistus	17
3.3	qPCR-analyysi	18
3.4	Positiivisen näytteen varmistaminen maljamenetelmillä ja lateksiagglutinaatiotestillä	18
4	Tulokset ja johtopäätökset	19
4.1	qPCR-kuvaajien tarkastelua	19
4.1.1	Onnistuneet qPCR-ajot	19
4.1.2	Ongelmalliset qPCR-ajot	25
4.2	Validointinäytteiden C _q -arvot	29
4.3	qPCR-laitteen validointiparametrien tilastollinen tarkastelu	32
4.3.1	Suhteellinen tarkkuus ja odotettu tarkkuus	34
4.3.2	Cohenin kappa, κ ₀	34
4.3.3	Suhteellinen herkkyys ja suhteellinen spesifisyys	34
4.3.4	χ ² -testi	35
5	Yhteenveto ja pohdintaa	35
	Lähteet	39

Liitteet

Liite 1: QS5-laitteen pikakäyttöopas

Liite 2: Laimennusohje lastaus- ja ympäristönäytteille

Liite 3: qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut C_q-arvot, ΔR_n-arvot ja niiden keskiarvot

Lyhenteet

- AGE: Agaroosigeelielektroforeesi (*agarose gel electrophoresis*). Nukleiinihappojen erotteluun ja karakterisointiin käytetty geelimenetelmä, jossa negatiivisesti varautuneet nukleiinihapot liikkuvat sähkökentässä molekyylipainonsa perusteella.
- Cq: (*cycle of quantification*) Sykli, jossa määrittäjä ylittyy eli näytteen fluoresenssi erottuu taustan fluoresenssista ja eksponentiaalinen kasvuvaihe alkaa. Cq:n synonyymeinä käytetään joskus myös Ct- ja Cp-arvoja.
- dNTP: deoksinukleosiditriposfaatti (*deoxynucleosidetriphosphate*). Typpi- toinen emäs (N = A, T, C, G), joka on sitoutunut deoksiriboosiin ja fosfaattiosaan. DNA:n peruskomponentti.
- ΔR_n : Normalisoitu fluoresoivan reportterin arvo, ts. näytteen fluoresenssi- intensiteetti, josta on poistettu taustan signaali.
- dsDNA: Kaksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo (*double-stranded deoxyri- bonucleic acid*). Nukleiinihappo, joka koostuu deoksiriboosista, fos- faatista ja vetysidoksin toisiinsa liittyneistä typpiemäksistä.
- FRET: (*fluorescence (Förster) resonance energy transfer*). Fysikaalinen prosessi, jossa virittyneen luovuttajamolekyylin energia siirtyy vas- taanottajamolekyylille.
- gDNA: Genominen DNA (*genomic DNA*).
- IPC: Sisäinen positiivinen kontrolli (*internal positive control*). qPCR-reak- tioseoksessa oleva DNA-segmentti, joka toimii reaktion onnistumi- sen indikaattorina.
- IQ: Asennustarkastus (*installation qualification*).

- MGB: (*minor-groove binder*). Koettimessa oleva, selektiivisesti DNA:n kaapeampaan päähän kiinnittyvä molekyyli.
- OQ: Toimintatarkastus (*operational qualification*).
- pmy: Pesäkkeen muodostava yksikkö (*cfu, colony-forming unit*). Maljalta tms. näkyvä pesäke, joka sisältää miljardeja bakteerisoluja.
- PQ: Suorituskyvyn testaus (*performance qualification*).
- qPCR: Kvantitatiivinen PCR (*quantitative PCR, real-time PCR*). Menetelmä, jossa amplikonin monistumista voidaan seurata lähes reaaliajassa ja jonka tuloksena saadaan eksponentiaalinen kuvaaja.
- SLM: Lyhenne *salmonellaspesifiselle* sekvenssille.
- ssDNA: Yksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo (*single-stranded deoxyribonucleic acid*).

1 Johdanto ja työn tavoite

Suolistoperäinen *salmonellabakteeri* on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä gastroenteritiitin (ruokamyrkytyksen) aiheuttajista. *Salmonellalla* tiedetään yli 2 500 serotyyppiä, ja näistä *S. enteritidis* ja *S. typhimurium* ovat yleisimpiä salmonelloosin aiheuttajia Suomessa [1]. Koska *salmonella* leviää pääasiassa bakteeria kantavien ihmisten tai eläinten ulosteella saastuneiden elintarvikkeiden välityksellä, on Suomen lainsäädännössä kiinnitetty erityistä huomiota tuotantoeläimille syötettävien rehujen laadunvalvontaan.

Työn toimeksiantaja, Apetit Oyj -konserniin kuuluva Avena Kantvik Oy, tuottaa korkealaatuisen ruokaöljyn lisäksi myös öljynpuristusprosessissa syntynyttä, valkuaispitoista rypsi- ja rapsipohjaista puristetta rehuteollisuuden raaka-aineksi. Ruokaviraston arvioimana *salmonellan* omavalvontalaboratoriona (ISO/IEC 17025) Avenan laboratorio analysoi *salmonellaa* omista tuotantonäyteistään sekä Avenalle toimitetuista tuontieristä. Laadunvalvontaprosessi kattaa myös esimerkiksi tuotantoympäristöstä tai laivan/auton lastauksen aikana kerättyjen puristeiden *salmonella*-analyysit.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli käyttöönottaa ja validoida uusi qPCR-laitte *salmonellabakteerin* kvalitatiiviseen määrittämiseen rypsi-/rapsipuristeista (jatkossa ”puriste”). Tätä varten laitteelle tuli määrittää tiettyjä kvalifointiparametrejä (IQ, OQ ja PQ), joilla varmistettiin laitteen asianmukainen toiminta aina asennusvaiheesta *salmonellan* luotettavaan molekyylibiologiseen määrittämiseen rehunäytteistä. Validoinnissa tarkasteltiin uuden qPCR-laitteen spesifisyyttä, herkkyyttä ja luotettavuutta käyttäen apuna tilastollisia menetelmiä.

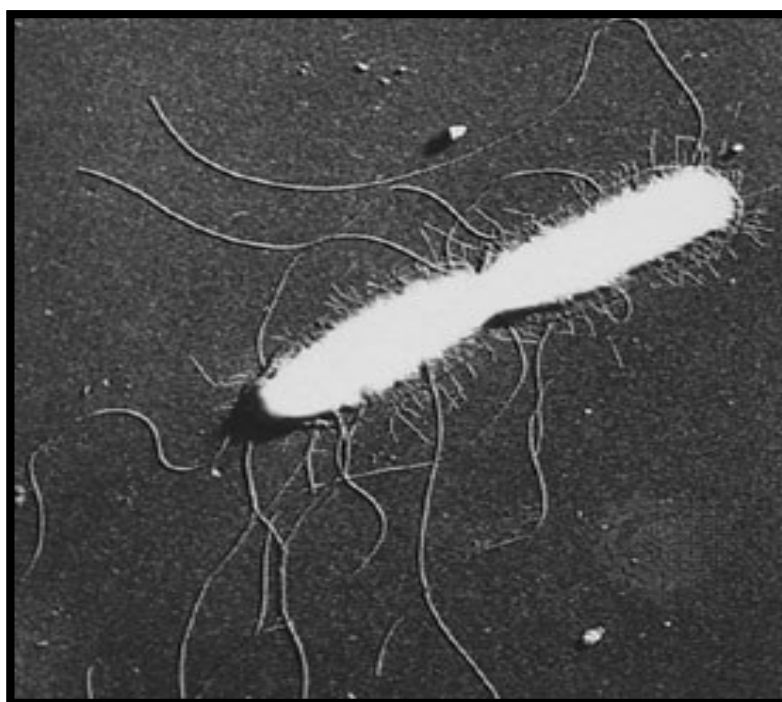
Validointiprosessi haluttiin kytkeä laboratorion rutiinikäytäntöihin alusta alkaen: QuantStudio™ 5 -laitteella (jatkossa ”QS5”) ajettiin rinnakkain samoja puristeenäytteitä kuin laboratoriossa käytössä olleella, niin ikään qPCR-tekniikkaan perustuvalla PikoReal-laitteella. Tavoitteena oli todentaa, että uusi laite kykenee

luotettavasti ja riittäväällä tarkkuudella detektoimaan *salmonellan* puristenäytteistä käyttäen muuten laboratorion vakiintuneita näytteenkäsittely- ja analyysimenetelmiä.

2 Teoria

2.1 *Salmonella*

Salmonellat ovat *Enterobacteriaceae*-sukuun kuuluvia gramnegatiivisia, fakultaatiivisesti anaerobisia, yleensä motiileja sauvabakteereita (kuva 1), joiden tyypillinen pituus on 2–5 µm ja leveys 0,5–1,5 µm. Erilaisia serotyyppejä tunnetaan yhteensä noin 2 500, joista lähinnä *S. enterica* -alalajiin kuuluvien lajien (serotyyppejä noin 1 300) [2, s. 568] aiheuttamia infektoita tavataan ihmisillä ja tuotantoeläimillä.



Kuva 1. Elektronimikroskooppikuva (7800-kertainen suurennos) *Salmonella enterica* Typhistä. Solu on sauvamainen ja liikkuu flagellan avulla. Lisäksi solulla on lyhyempiä, tarttumista helpottavia fimbrioita [3].

Eri serotyypeillä on vaihtelevaa biokemiallista aktiivisuutta esimerkiksi entsyymi-toimintaan liittyen. Taulukossa 1 on esitetty *salmonelloille* tyypillisiä biokemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia sekä niitä mittaavia testejä. Esimerkiksi rikkivedyn H₂S tuotto on heikkoa *Salmonella* ser. Typhillä, muilla serotyypeillä kyky tuottaa rikkivetyä on vaihtelevaa, eikä Paratyphi A tuota sitä ollenkaan. Kaikki *salmonellat* kahta serotyyppiä lukuun ottamatta ovat motiileja. Indolireaktio on kaikilla lajeilla negatiivinen.

Taulukko 1. *Salmonellabakteerien* biokemiallinen aktiivisuus. Eri *salmonellala-*jien välillä voi olla eroavaisuuksia esimerkiksi hiilihydraattifermentaatioissa ja rikkivedyn tuotossa. [4.]

	Motility	Indole	LDC	Slope	Butt	Black (H ₂ S)	Cracks (Gas)
SHIGELLAE							
<i>Shigella dysenteriae</i>	–	d	–	R	Y	–	–
<i>Shigella flexneri</i>	–	d	–	R	Y	–	– ¹
<i>Shigella boydii</i>	–	d	–	R	Y	–	– ²
<i>Shigella sonnei</i>	–	–	–	R	Y	–	–
SALMONELLAE							
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	+	–	–	R	Y	– ³	+
<i>Salmonella</i> Paratyphi B	+	–	+	R	Y	+	+
<i>Salmonella</i> Paratyphi C	+	–	+	R	Y	+ ⁴	+
<i>Salmonella</i> Typhi	+	–	+	R	Y	+ Weak	–
Other <i>Salmonella</i> serovars	+ ⁵	–	+	R	Y	+ ⁶	d

Key: KIA = Kligler iron agar, LDC = Lysine decarboxylase, d = different strains give different results, R = Red-pink (alkaline reaction), Y = Yellow (acid reaction).

Notes
 1 Some strains of serotype 6 produce gas. 2 Serotypes 13 and 14 produce gas. 3 About 12% of strains produce H₂S weakly. 4 A minority of strains do not produce H₂S. 5 *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* are non-motile. 6 A minority of strains do not produce H₂S.

Salmonella voi kasvaa 5–45 °C:ssa, mutta sen optimaalinen kasvulämpötila on 36 ± 1 °C. Ihanteellinen kasvu-pH *salmonellalle* on noin 7, mutta bakteeri pystyy

kasvamaan pH-alueella 4–9, jotkut jopa alle neljän. Lisäksi *salmonellojen* ”lepo-vaihe” (lag phase) on verrattain lyhyt mahdollistaen bakteerin nopean kasvun. [5.]

Rehut ovat *salmonellalle* otollista kasvumateriaalia. *Salmonella* tuhoutuu herkästi kuumuudessa. Jos rehu on jossakin tuotantoprosessin vaiheessa kontaminoitunut *salmonellalla* eikä rehun kuumennuskäsittely ole riittävä, bakteeri voi kuitenkin jatkaa kasvuaan ja päätyä lopputuotteeseen. *Salmonellat* tuhoutuvat herkästi erilaisten desinfektioaineiden kuten 70-prosenttisen etanolin vaikutuksesta. Jos *salmonellan* kuitenkin annetaan kasvaa ”ylimäärin”, niin tehokkaillaan desinfektioaineilla (natriumhypokloriitti, natriumhydroksidi sekä bentsalkoniumkloridi) ei ole vaikutusta bakteerin tuhoutumiseen biofilmimuodostuksen vuoksi [6].

2.2 qPCR-analytiikka

Rehulaki (muun muassa RL 1263/2020, 6 §) vaatii rehuvalmistajilta omavalvontaa rehuraaka-aineiden *salmonellasta*. *Salmonellaa* voidaan määrittää perinteisillä maljamenetelmillä (esimerkiksi Brilliance-agarilla), mutta spesifisempään tulokseen päästään molekyylibiologisilla menetelmillä, joista tärkein on nukleiinihappomääritykseen perustuva qPCR-analytiikka.

qPCR-menetelmässä hyödynnetään polymeerasiketjureaktiota nukleiinihappojen monistamiseen. Reaktiota seurataan lähes reaaliajassa kohde-DNA:han kiinnittyvän fluoresoivan koettimen emission avulla, mikä mahdollistaa näytteessä olleen alkuperäisen DNA-konsentraation selvittämisen (kvantitatiivinen qPCR). [7, s. 2.] Määrällisen analyysin sijaan laadullisessa qPCR:ssä tutkitaan, onko näytteessä tutkittavan organismin DNA:ta vai ei.

Perinteinen PCR-tekniikka keskittyy monistustuotteen eli amplikonin loppupiste-analyysiin (end point analysis). Näin ollen nukleiinihapon, esimerkiksi DNA:n, monistuminen havaitaan ja karakterisoidaan vasta jälkeenpäin esimerkiksi elektroforeettisilla menetelmillä, kuten AGE:lla. Perinteisen tekniikan etuna on

mahdollisuus näytteen jatkokäsittelyyn (downstream analysis), esimerkiksi amplikonin postmodifikaatioon. qPCR-menetelmässä AGE:a vastaa amplikonin sulamiskäyräanalyysi, jossa amplikonin sulamispiste, T_m , voidaan määrittää. Sulamispisteen määrittäminen onnistuu vain, jos käytetään epäspesifisesti kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia värimolekyylejä. Avenan laboratoriossa ei käytetä tällaista tekniikkaa, joten tässä opinnäytetyössä ei tehty sulamispisteanalyysiä.

2.3 qPCR-reaktion vaiheet ja laitteiston toimintaperiaate

qPCR-reaktio koostuu tavallisesti kolmesta eri vaiheesta:

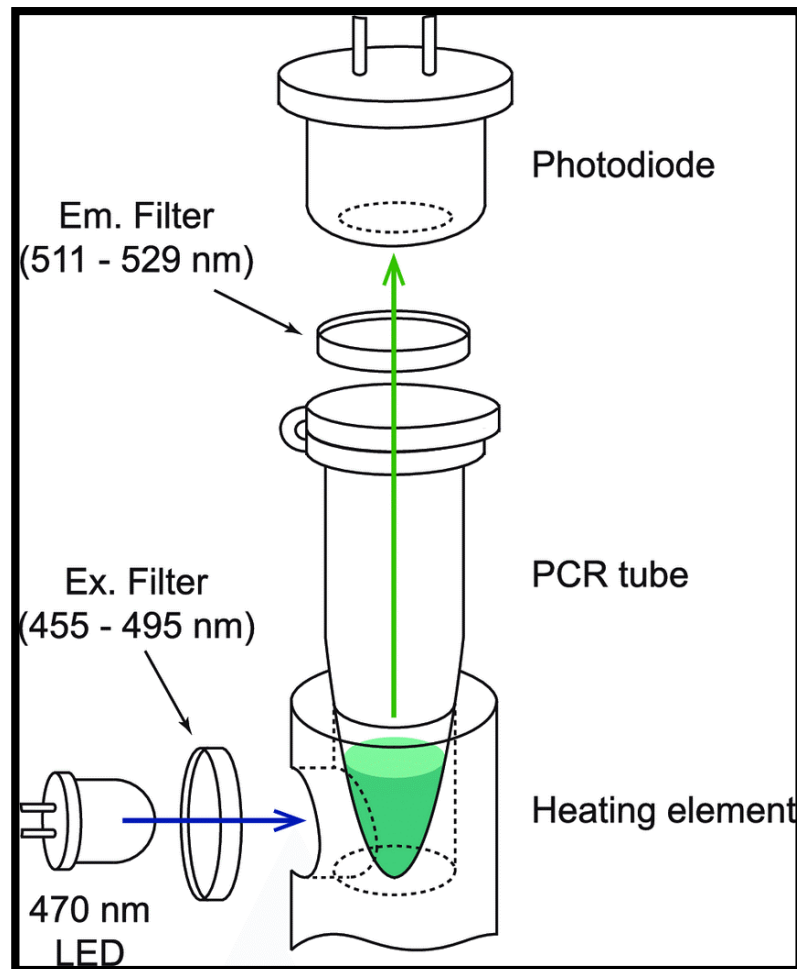
1. *denaturaatiovaiheesta*, jossa templaatti-DNA:n kaksoisheliksi avautuu vetysidosten katketessa eli juosteet irtoavat toisistaan (dsDNA → ssDNA)
2. *annealing-vaiheesta*, jossa reaktioseoksessa olevat, kohdespesifiset alukkeet (primerit) kiinnittyvät (hybridisoituvat) emäsparisäännön mukaisesti 5'-päistään denaturaatiossa erottuneiden ssDNA-juosteiden 3'-päihin
3. *ekstensiovaiheesta*, jossa polymeerasientsyymi rakentaa nukleosiditriphosfaateista (dNTP) templaatille komplementaarisen juosteen eli syntetisoi uutta dsDNA:ta [8, s. 7–8].

Vaiheet muodostavat yhden syklin, jota toistetaan tyypillisesti 30–50 kertaa. Nukleiinihapon monistukselle on tärkeää, että reaktiovaiheiden lämpötilat ovat eksakteja eikä eri kaivojen välillä ole merkittävää vaihtelua niin lämpötilassa kuin reaktiovaiheiden kestossa.

Polymeerasiketjureaktion eri vaiheiden lämpötilat ovat erilaisia. Denaturaatiolämpötila on tavallisesti 94–95 °C, annealing-lämpötila noin 60 °C ja ekstensiolämpötila yleensä 72 °C. Toisaalta, jos amplikoni on sekvenssiltään lyhyt, annealing- ja ekstensiovaiheet voidaan yhdistää, jolloin PCR-reaktiosta tulee

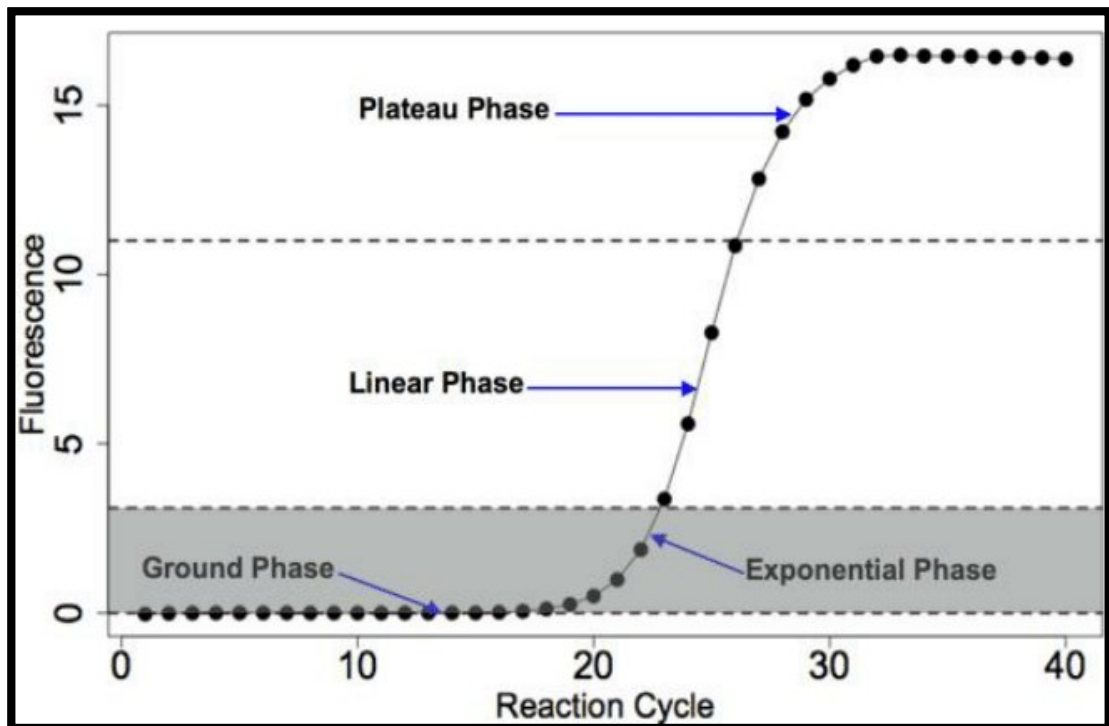
kaksivaiheinen [7, s. 3]. Esimerkiksi liian pitkä aika liian korkeassa denaturaatiolämpötilassa voi inaktivoida polymeraasientsyymien toimintaa ja tällä tavoin estää monistumisen tapahtumisen jo ennen määritysrajan saavuttamista. Toisaalta annealing- eli hybridisaatiovaiheen lämpötila on kriittinen reaktion onnistumiselle, koska ongelmat tässä vaiheessa voivat johtaa epäspesifisyyteen tai huonoon saantoon. [9, s. 105.]

Koska qPCR perustuu fluoresenssin mittaamiseen amplikonikonsentraation funktiona, qPCR-reaktioseoksessa on oltava templaatin, dNTP:n, suolojen (erityisesti $MgCl_2$), polymeraasientsyymien sekä alukkeiden lisäksi myös jokin fluoresoiva komponentti eli koetin, joka sitoutuessaan spesifisesti tiettyyn kohtaan DNA:ta fluoresoi eli emittoi valoa tietyllä aallonpituudella. qPCR-laitteistossa on siksi oltava lämpöblokin lisäksi valonlähde ja detektori [10, s. 12–13] (kuva 2).



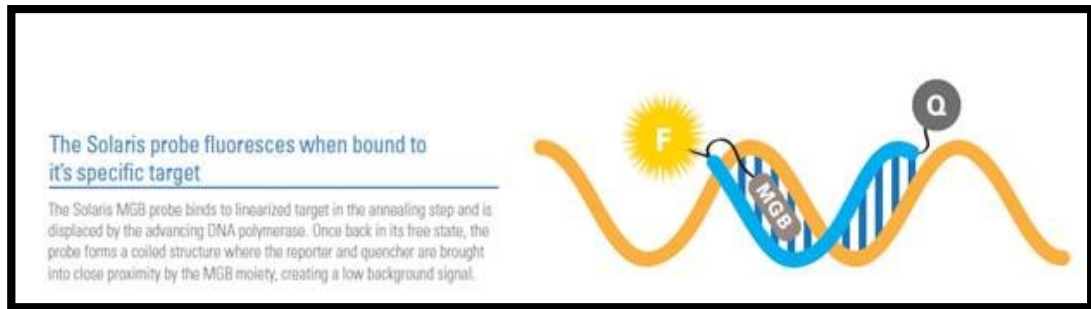
Kuva 2. Esimerkki qPCR-laitteen optiikasta. LED-lampusta lähtevä viritysvälo ohjataan suodattimen läpi PCR-reaktioseokseen (näytteeseen). Virittyneiden reportterimolekyylien fluoresenssi kulkeutuu emissiosuodattimen läpi päätyen lopulta fotodiodidetektorille [11], joka muuntaa fotonin energian sähköiseksi signaaliksi.

Jatkuvan fluoresenssin mittaamisen vuoksi qPCR-reaktiota monitoroidaan reaaliajassa ja tuloksena syntyy kuvan 3 kaltainen eksponenttikuvaaja. Ideaalitilanteessa (100 %:n tehokkuudessa) joka syklillä kaksinkertaistuva DNA-konsentraatio noudattaa likimain yhtälöä $f(x) = 2^x$, mutta ei kasva rajattomasti. Eksponentiaalinen kasvu loppuu plateau-vaiheeseen ja reportterin fluoresenssi ΔR_n pysyy vakiona, koska qPCR-reaktion lähtöaineiden loppuessa myös reaktiotuotteen muodostus pysähtyy.



Kuva 3. qPCR-reaktion monistuskuvaja [12]. x-akselilla on syklien lukumäärä ja y-akselilla mitattu fluoresenssi (ΔR_n). Fluoresenssin taso on pitkään nollan tuntumassa, kunnes ylittää tietyn syklin jälkeen määritysrajan, kasvaa eksponentiaalisesti ja loppuu plateau-vaiheeseen.

Tässä työssä käytetty kitti sisältää Solaris™-teknologiaan perustuvan koettimen (kuva 4), joka on spesifinen eli sitoutuu tiettyyn kohtaan DNA-templaattia. Koettimen 5'-päässä on reportterina toimiva molekyyli (niin sanottu luovuttaja, donor) ja 3'-päässä vastaanottajamolekyyli (quencher), joka vaimentaa reportterin fluoresenssia, jos koetin ei vielä ole kiinnittynyt kohdesekvenssiin tai jos koetin on ”ehjä”. [13.]



Kuva 4. Solaris-koettimen toimintaperiaate (Thermo Scientific). Kohdesekvenssiin sitoutumattomassa koettimessa reportteri- ja vastaanottajamolekyylit ovat lähellä toisiaan eikä fluoresenssi eroa taustakohinasta. Kun reaktio etenee ja koetin hybridisoituu kohdesekvenssiin, niin ekstensiovaiheessa reportterin ja vastaanottajan välinen etäisyys kasvaa vapauttaen samalla reportterin fluoresenssin (FRET-ilmiö) [14, s. 6].

2.4 Puristematriisin vaikutus qPCR-reaktioon

Näytematriisin haastavuus vaikuttaa olennaisesti herkkään qPCR-reaktioon esimerkiksi inhiboimalla sitä, joten puristeen qPCR-analyysissä on otettava huomioon näytteenkäsittelyn erityispiirteet: puriste on esirikastettava sekoittamalla se viljelypussissa elatusliemeen (tässä työssä peptoniveteen). Viljelypussissa on sivufilteri, jonka peptonivesi ja mahdollinen *salmonella* läpäisevät, mutta suuremmat puristepartikkelit eivät. Suodos, josta analysoitava näyte lopulta otetaan, voi kuitenkin edelleen sisältää DNA-monistusta inhiboivia partikkeleita. Suodoksen kolloidisuus voi lisätä myös qPCR-reaktioseoksen sameutta, erityisesti valon sironnan vuoksi. Valon sironta voi häiritä fluoresenssin luotettavaa mittaamista, vaikka itse monistustapahtuma onnistuisikin.

Avenan laboratoriossa analysoitavien ja tässä validoinnissa tutkittujen näytteiden enemmistön muodostavat tuotantoprosessista saatavien lopputuotteiden vuorokausinäytteet, jotka ovat laadunvarmistuksen kannalta kriittisiä indikaattoreita. Näiden näytteiden koostumus on kaikista puristenäytteistä homogeenisin,

ja ne sisältävät qPCR-analytiikkaa ajatellen vähiten potentiaalisen *salmonellan* monistumista inhihoivia tekijöitä.

Lastattu puriste eroaa lopputuotenyhteistä siten, että se on kerätty nimenomaan puristeen lastauksen aikana, ja voi sisältää ympäristötekijöistä johtuvia epäpuhtauksia, kuten pölyä, muita epämääräisiä partikkeleita ja erilaisia mikroorganismeja. Lastatun puristeen tiedettiin tuottavan MacConkey no 3 -maljaviljelmillä systemaattisesti lähes aina enterokasvustoa, vaikka niissä ei *salmonellaa* olisi ollutkaan.

Ympäristönäytteet eli prosessiympäristön tiloista kerätyt näytteet muodostavat vähemmistön tutkittavista näytteistä. Lastatun puristeen tapaan ne voivat sisältää enemmän *salmonellamääritystä* häiritseviä partikkeleita, koska qPCR-analyysissä käytetyt näytteet kerättiin esimerkiksi tuotanto- ja lastaustilojen kauhista, suppiloista, seinistä tai lattialta.

3 Validoinnin suoritus käytännössä

Uuden laitteen referenssimenetelmänä käytettiin validoitua 24-paikkaista Piko-Real-laitetta. Molemmilla laitteilla käytettiin Suretect™ Salmonella species PCR Assay -kittiä (Thermo Scientific). Laitteet eivät kuitenkaan olleet absoluuttisesti vertailukelpoisia erilaisten ohjelmistojensa takia, eikä esimerkiksi Cq-arvoja ollut mielekäästä verrata laitteiden välillä. *Salmonellan* määrittämissä käytetyssä kitissä oli ≥ 1 pmy/ml. Näytteet oli esirikastettava ennen qPCR-analyysiä. Esirikastuksen, soluhajotuksen ja qPCR-analyysin ohjeena käytettiin SureTect-kitin käyttöopasta ja lisäksi NMKL:n 71-standardia [15;16].

3.1 Laitteen asentaminen ja käyttöönotto

Asennustarkastus (IQ)

Käytännön työ aloitettiin riisumalla laite pakkauksestaan ja tarkistamalla, että kaikki mukana tulleet komponentit olivat tallella ja ehjiä vastaten tilauksen sisältöä. Lähetyksen mukana tulleet dokumentit tarkistettiin ja talletettiin. Laitteen mukana tulleet virtajohdot, kaapelit, muuntajat, muistitikut ja laitteen hallintaan käytettävä tietokone tarkistettiin ja asennettiin valmistajan ohjeen mukaan. Komponenttien sarjanumerot ja muut tunnistetiedot dokumentoitiin. Laite sijoitettiin paikkaan, jossa sen operoiminen oli luontevaa ja laboratorion muiden laitteiden (lämpökaapit, uuttolaitteistot, vetokaapit) tuulettimet tai ympäristön lämpötilaa nostava vaikutus eivät vaikuttaisi sensitiiviseen qPCR-reaktioon (kuva 5).



Kuva 5. Vasemmassa kuvassa on QS5-laite ja oikeassa kuvassa on laitteelle suunniteltu paikka, heti SimpliAmp-laitteen vieressä.

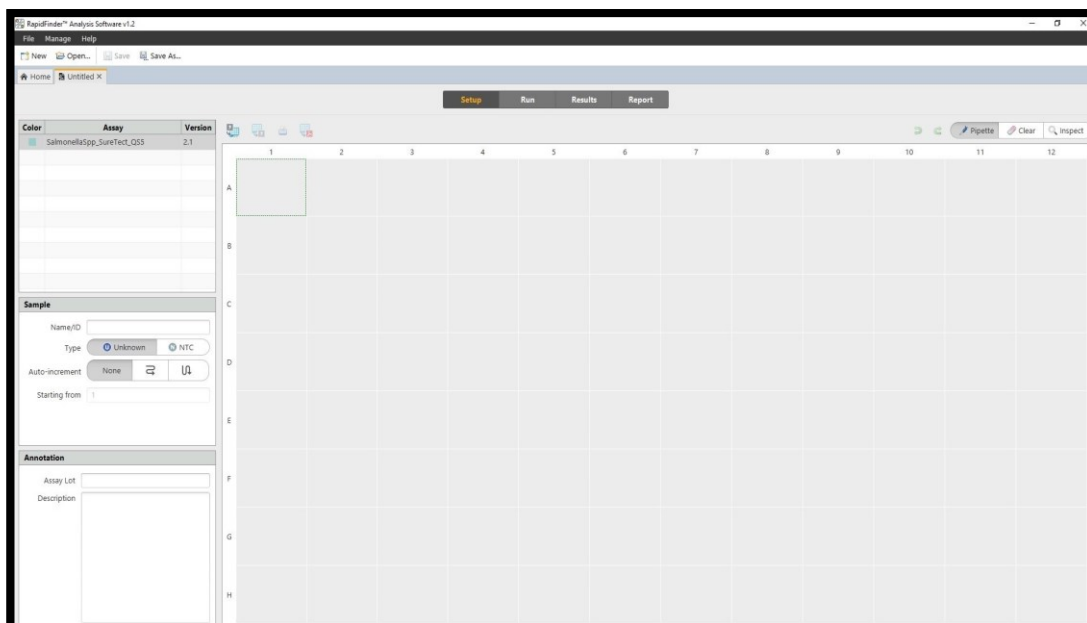
Toiminnallinen tarkastus (OQ)

Toiminnallinen tarkastus käsitti perustoiminnot, kuten virran kytkemisen qPCR-laitteeseen. Laitteelle määritettiin myös perusasetukset, kuten käyttäjätilit ja PIN-koodit, aika ja päivämäärä, sekä laitteen nimi (projektin aikana "QS5qPCR").

Seuraavaksi varmistettiin, että laitteen komponentit (lämpöblokki, tuuletin, optiikka ja liikkuvat osat) toimivat oikein valitsemalla laitteen ylläpitovalikosta ”Self-verification test”, jossa laite käy läpi mekaniikkansa toimivuuden. Tämä varmistustesti oli hyvä suorittaa ennen verifikaatiokitin ajamista.

Laitteen valmistajan toimittamassa lämpöblokin suorituskykyyn liittyvästä analyysitodistuksesta selvisi, että lämpöblokin kaikki alueet ovat yhteneväisiä (temperature uniformity): lämpötilan laskeminen (95 °C → 60 °C) tai nostaminen (60 °C → 95 °C) 30 sekunnin intervallissa oli <0,50 °C molemmissa tapauksissa. Toisin sanoen laite kykeni säätelemään kaikkien 96 kaivon lämpötilaa niin, että eri kaivojen välinen lämpötilaero oli korkeintaan 0,50 °C.

Tietokoneelle asennettiin laitteen operoimiseen ja tulosten käsittelyyn tarkoitettu v.1.2 -ohjelmisto valmistajan (Applied Biosystems) ohjeiden mukaan. Aluksi QS5 rekisteröitiin ohjelmistoon. Seuraavaksi softaan ladattiin analyysissä käytettävän kitin (SureTect™ Salmonella species PCR Assay) tiedostopaketti, joka automaattisesti loi valmiin, *salmonellan* tutkimiseen sopivan qPCR-ajo-ohjelman (kuva 6). Liitteessä 1 on esitetty laitteelle laadittu pikakäyttöopas.



Kuva 6. RapidFinder Analysis -ohjelman näkymä. Näytetarjotin (plate layout) luodaan klikkaamalla haluttua näytepaikkaa (kuvassa korostettuna A1). Vasemmassa laidassa on näytetietojen valinta.

Suorituskyvyn testaus (PQ)

Laitteen mukana tullut ja sen suorituskykyä (polymeraasiketjureaktion onnistumista) mittaava, kertakäyttöinen TaqMan™ RNase P Plate -verifikaatiotesti (Applied Biosystems™) epäonnistui ensimmäisellä yrittämällä. Syynä oli ilmeisesti se, ettei kitin näytelevyä sekoitettu kunnolla ennen ajoa. Valmistajan toimittamassa uudessa testikitissä kaikki 96 näytettä tuottivat asianmukaisen vasteen. Kitillä oli tarkoitus varmistaa, että laite toimii oikein, eikä tehtyä verifikaatiotestiä tarvitse välttämättä suorittaa uudelleen. Verifikaatioanalyysin jälkeen laite oli valmis Avenan laboratorion validointinäytteiden tutkimiseen. Näytteenkäsittely- ja analyysiprosessi on esitetty tarkemmin luvuissa 3.2 ja 3.3.

3.2 Näytematriisit ja näytteiden käsittely

3.2.1 Puristenäytteiden valmistus ja inkubointi

Puristenäytteet valmistettiin punnitsemalla 25 grammaa näytettä, joka sekoitettiin 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä (Oxoid™ BPW, pH = 7,0 ± 0,2). Kasvatusalustana käytettiin muovisia, sivufilterillisiä viljelypusseja (BlenderBag).

Näytteet valmistettiin DiluFlux-laitteella, jossa on sisään integroitu vaaka ja joka automaattisesti annostelee punnitun massan perusteella sopivan määrän peptonivettä (tässä menetelmässä 1:10). Valmis viljelypusseja suljettiin ja ravisteltiin napakasti, jotta näyte olisi mahdollisimman homogeeninen. Viljelypusseja laitettiin lämpökaappiin inkuboitumaan $+37 \pm 1$ °C:seen 21–24 tunniksi.

Näytteiden laimentaminen

Esirikastuksen jälkeen viljelypusseja ravisteltiin vielä kertaalleen. Sakan annettiin laskeutua noin 10 min, minkä jälkeen pusseista pipetoitiin automaattipipetillä (Finnpipette) 1 ml suodatettua näytettä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin. Lastatusta puristeesta tehtiin kittitoimittajan ohjeen mukaiset 1:5- ja 1:10-laimennokset pipetoimalla 1:5-laimennoksessa 100 µl näytettä ja 400 µl peptonivettä. 1:10-laimennoksessa pipetoitiin 100 µl näytettä ja 900 µl peptonivettä. Laimentamisesta kirjoitettiin työohje (liite 2).

Positiivisen kontrollin valmistus

Positiivisen kontrollinäytteen valmistukseen käytettiin kvalitatiivista KwikStik *Salmonella enterica* Tranoroa -kanta (NCTC 10252 THL, 01087K). Kertakäyttöinen muoviputki puristeltiin huolellisesti läpikotaisin, jotta bakteeripelletti murskaantuisi ja sekoittuisi putkessa olevaan nesteeseen muodostaen homogeenisen suspension. Tämän jälkeen kanta siirrostettiin KwikStik-puikolla kahdelle Brilliance-maljalle (Oxoid™). Siirrostuksen jälkeen Brilliance-maljat inkuboitiin lämpökaapissa 20–24 h ($+37 \pm 1$ °C). *Salmonellat* kasvoivat Brilliance-maljalla erittäin hyvin ja muodostivat purppuranpunaisia pesäkkeitä molemmille maljoille (kuva 7).



Kuva 7. KwikStikillä kahdelle Brilliance-maljalle siirrostettu kvalitatiivinen *salmonellakanta* *S. enterica* Tranoroa tuotti *salmonellalle* karakteristisia purppuranpunaisia, pistemäisiä pesäkkeitä.

Maljalta siirrostettiin yksi pieni pesäke kahteen *salmonellanegatiiviseksi* tiedettyyn viljelypussiin (näytteen valmistus on esitetty luvussa 3.2.1). Siirrostetut viljelypussit inkuboitiin lämpökaapissa (20 h, $+37 \pm 1$ °C). Positiivisten kontrollikantojen käsittely toteutettiin kokonaisuudessaan laminaarikaapissa huolehtien siitä, että kaikki työssä käytetyt välineet ja näytteet steriloidtiin jälkeinpäin autoklaavissa (sterilointivaihe 15 min, $+121$ °C) *salmonellan* leviämisen riskin minimoimiseksi. Laminaarikaappi desinfioitiin nukleiinihappoja pilkkovalla aineella ja 70-prosenttisella etanolilla.

3.2.2 Soluhajotus ja qPCR-reaktioseoksen valmistus

Esirikastetuista viljelypusseista pipetoitiin 1 ml suodatettua näytettä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin. SureTect-kitissä oli mukana soluhajotusputket 8 putken liuskoissa sisältäen valmiiksi soluhajotukseen tarvittavat reagenssit. Näihin putkiin pipetoitiin ensin 10 µl proteinaasi K -entsyymiä. Proteinaasi K:n lisäämisen jälkeen putkiin pipetoitiin 10 µl näytettä. Sen jälkeen putket asetettiin lämpöblokkiin (SimpliAmp Thermal Cycler) käyttäen valmista ohjelmaa (taulukko 2). Proteinaasi K hydrolysoi peptidisidoksia optimaalisesti 37 °C:ssa, mutta tuhoutuu kun lämpötila nostetaan 95 °C:seen.

Taulukko 2. SimpliAmp-laitteen soluhajotusohjelman vaiheiden lämpötilat ja kestot.

Lämpötila (°C)	Aika (min)
37 ± 1	10
95 ± 1	5
10 ± 1	2
4 ± 1	∞

Soluhajotuksen jälkeen neliasteisiksi jäähtyneet näytteet otettiin pois lämpöblokkista ja annettiin temperoitua huoneenlämpöiseksi. SureTect-kitissä myös qPCR-putket sisältävät valmiiksi PCR-reaktioon tarvittavat reagenssit lyofilisoidussa muodossa. qPCR-putkiin pipetoitiin monikanavapipetillä (Thermo Scientific) 20 µl näytettä/putki. Valkea pelletti muodosti sinisen lyaattiliuoksen kanssa vihertävän seoksen. Reagenssien sekoittuminen ja pelletin täydellinen liukeneminen varmistettiin sekoittamalla putkia noin 10 sekuntia juuri ennen qPCR-ajoa.

3.3 qPCR-analyysi

Suurin osa analysoiduista näytteistä oli tuotantoprosessin vuorokausinäytteitä. Jokaisessa ajossa ajettiin aina kaksi negatiivista kontrollia. Negatiivinen kontrolli oli *salmonella*negatiiviseksi todettu koontinäyte eri vuorokausinäytteistä. Positiivisia kontrolleja analysoitiin silloin, kun haluttiin testata esimerkiksi uuden peptonivesierän tai kittierän toimivuutta. Yhden qPCR-ajon kesto on noin 1 h 20 min (PikoReal). QS5:ssä ajon kesto on noin 1 h 18 min. Sekä ajon kesto että olosuhteet määräytyivät laitteen RapidFinder™ Analysis Software -ohjelmistoon ladatun kittitiedoston perusteella, eli validoinnissa ei tarvinnut kiinnittää huomiota niiden säätämiseen. QS5-laitteessa lämpötilaohjelma oli kaksiportainen: denaturaatiolämpötila 95 °C, annealing- ja ekstensiolämpötilat 60 °C. Kaikki näytteet analysoitiin rinnakkain PikoRealilla, käyttäen molemmissa tapauksissa samoja näytteenkäsittely- ja analyysimenetelmiä.

3.4 Positiivisen näytteen varmistaminen maljamenetelmillä ja lateksiagglutinaatiotestillä

qPCR:llä positiiviseksi osoittautunut näyte tulee Avenan laboratorion laatustandardien mukaan käsitellä edelleen viljelemällä se Brilliance-agarille ja MacConkey no 3 -agarille, tarvittaessa myös Müller-Kauffmannin tetrationsaattiputkiin ja viimesijassa Nutrient agar -maljoille. Avenan laboratorio ei tee tarkempia tutkimuksia mahdollisen *salmonellan* kannasta, vaan positiivinen näyte lähetetään Ruokavirastoon serotyypitykseen. Maljauksen lisäksi positiivinen tulos tulisi konfirmoida lateksiagglutinaatiotestillä. Tässä validointiprosessissa ei kuitenkaan tullut kertaakaan ”oikeaa” positiivista tulosta, joka olisi vaatinut tällaisia lisätoimenpiteitä.

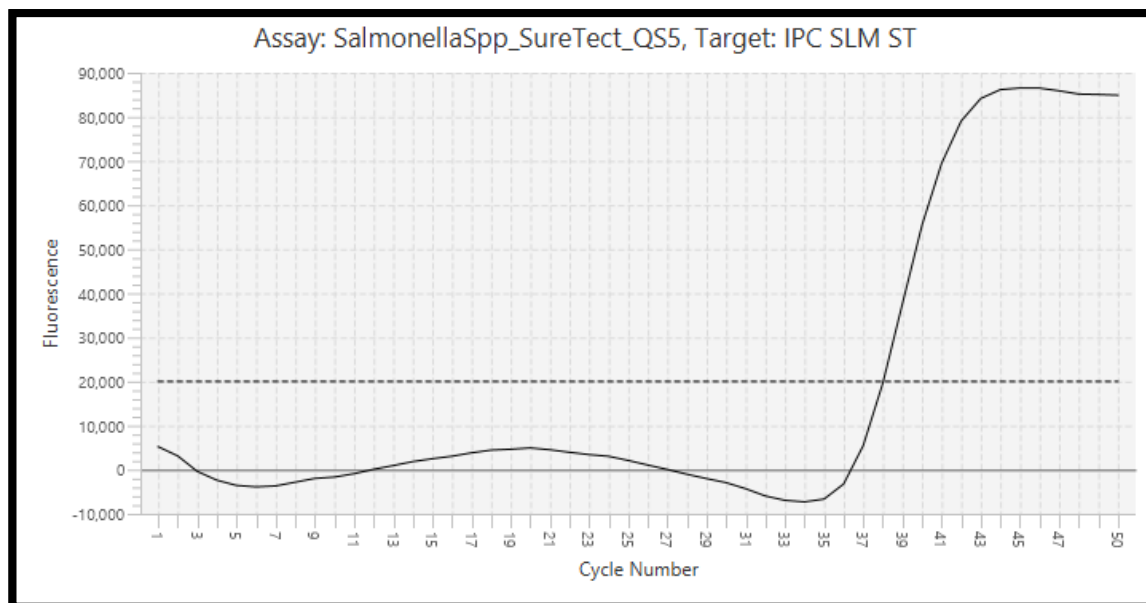
4 Tulokset ja johtopäätökset

4.1 qPCR-kuvaajien tarkastelua

Avenan laboratoriossa qPCR-analyysin onnistumista seurattiin erityisesti IPC-kuvaajien tutkimisen avulla. IPC:n ansiosta jokaisessa ajossa ei tarvitse olla mukana positiivista *salmonella*kontrollia, mikä vähentää huomattavasti paitsi työvaiheiden määrää, myös patogeenin leviämiskäskyä. qPCR-ajot uusittiin, mikäli näytteen IPC ei monistunut eli antoi tulosvaroituksen, joka laitteen ohjelmistossa näkyi huutomerkkisymbolina.

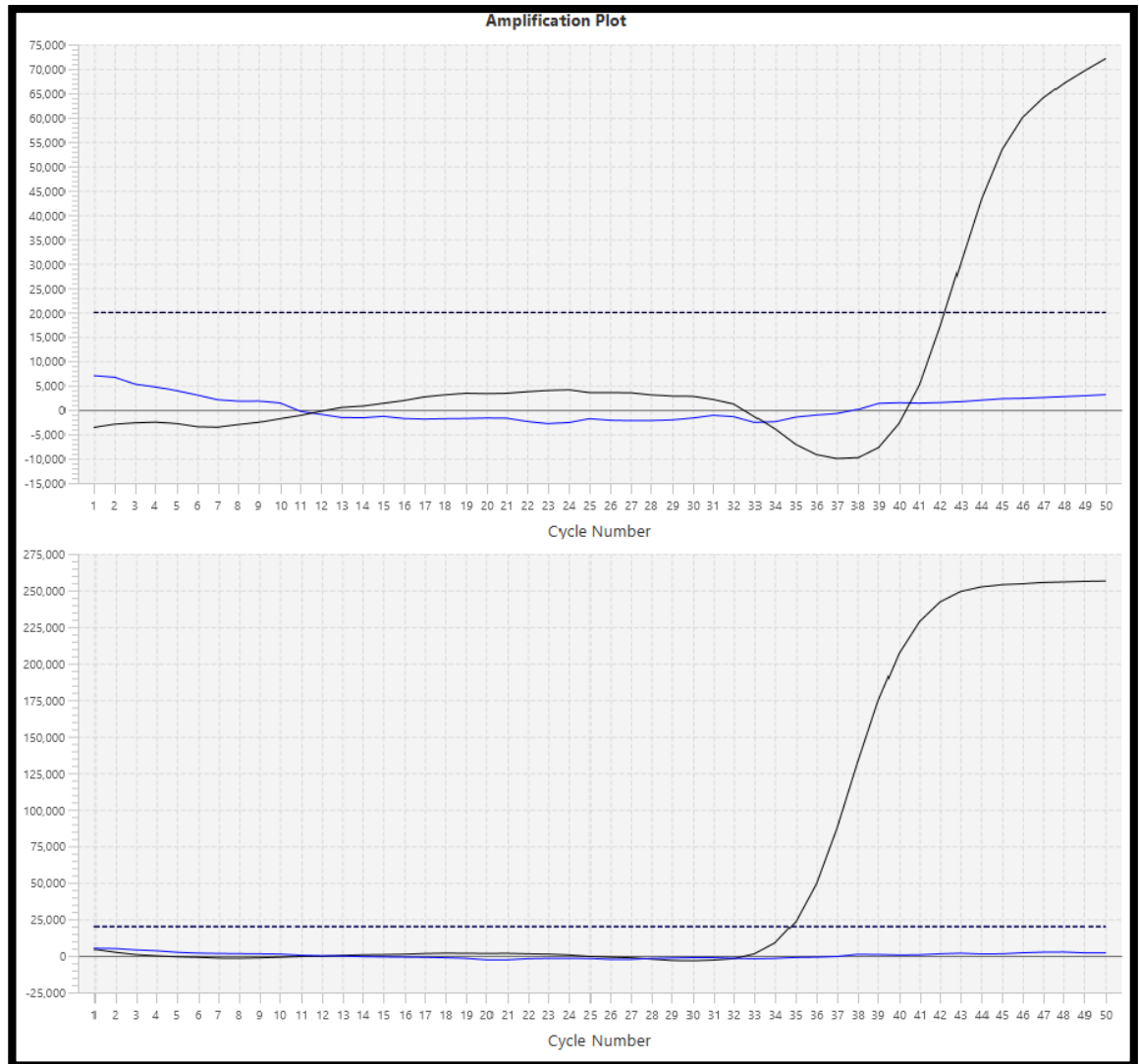
4.1.1 Onnistuneet qPCR-ajot

Onnistuneiksi qPCR-ajoiksi luokiteltiin sellaiset tulokset, joista ei tullut virhesignaalia. Toisaalta onnistuneidenkin analyysien monistuskäskyä tulee tarkistaa tulosten käsittelyn yhteydessä, koska kuvaajien tulkinta voi antaa tärkeitä vihjeitä esimerkiksi inhibition vaikutuksesta eri näytematriiseissa (esimerkiksi kuvat 8 ja 9).



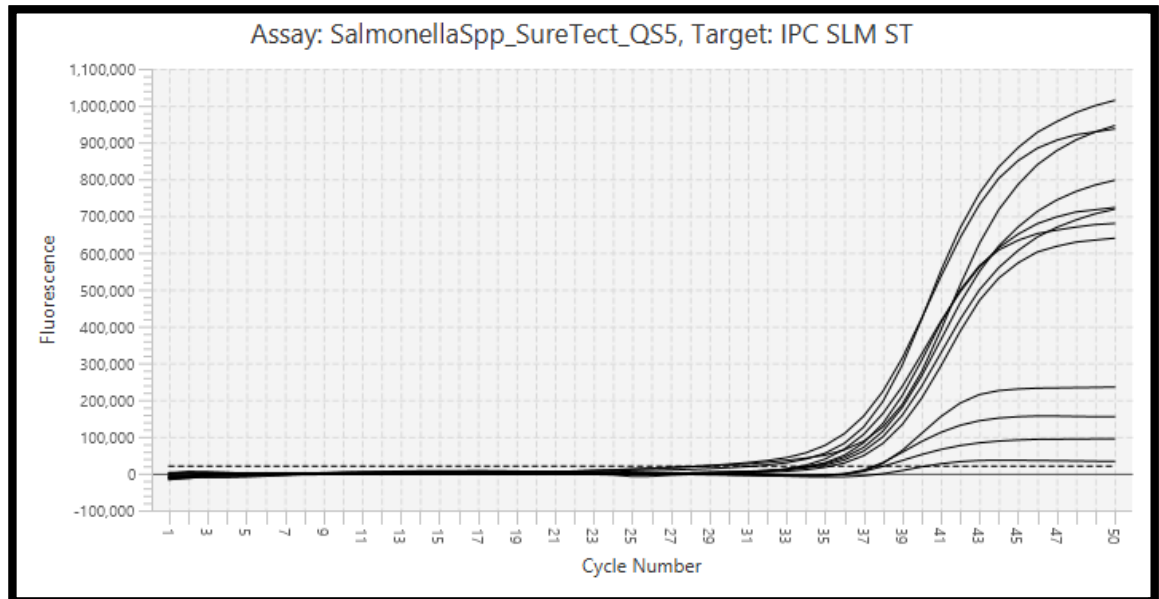
Kuva 8. Tyypillinen (laimentamattoman) lastatun puristeen onnistunut ajo, jonka IPC-kuvaajan (musta viiva) ΔR_n on kuitenkin alhainen (alle 100 000). Katkoviiva kuvaa reaktion määritysrajaa.

Kuvan 8 monistusreaktio on onnistunut ja laitteen ohjelmisto katsoi ajon hyväksytyksi, mutta sen kuvaajaa tarkastellessa huomataan kolloidisen näytematriisin vaikutus fluoresenssin tasoon. Pohjaviiva ei ole tasainen, vaan signaalissa on havaittavissa putoaminen nollian alapuolelle juuri ennen eksponentiaalista vaihetta. Kolloidien määrää voidaan vähentää laimentamalla, mikä näkyy välittömästi parempana vasteena. Kuvassa 9 on esitetty toisen lastausnäytteen IPC-kuvaajat, joissa laimentaminen on tuottanut selvästi paremman signaalin.



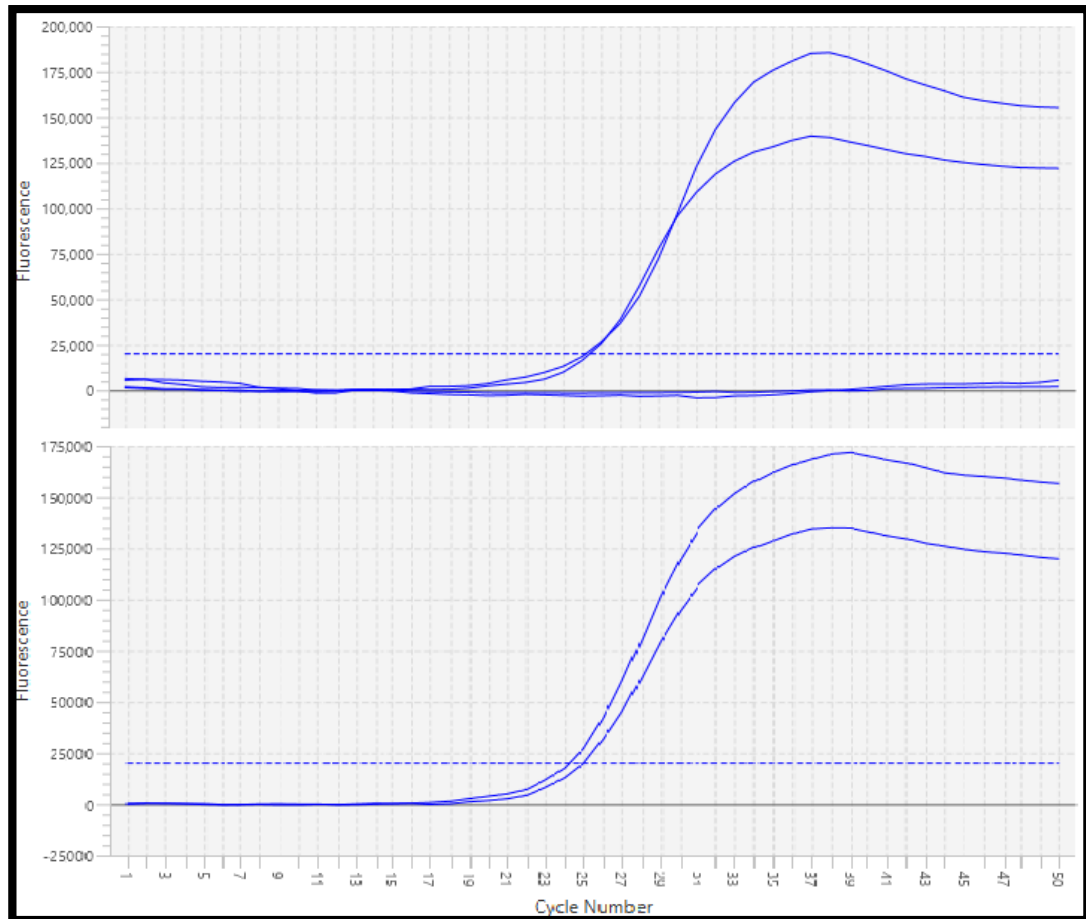
Kuva 9. Esimerkki laimentamisen vaikutuksesta lastausnäytteen IPC:n (musta viiva) monistumiseen. Ylhäällä laimentamaton ja alhaalla 1:5:een laimennettu näyte. Reaktion määrittäjäraja on molemmissa tapauksissa noin 20 000 yksikköä, mutta laimentamattoman näytteen signaali aaltoilee nollan molemmin puolin ja putoaa negatiivisen puolelle juuri ennen eksponentiaalista nousua (myös ΔR_n on jäänyt alhaiseksi, alle 75 000:een).

Kuvassa 10 on esitetty yhden rutiininäytesarjan IPC-kuvaajat, jossa on havaittavissa selkeä ero homogeenisten ja heterogeenisten näytteiden kuvaajien signaaleissa: tasalaatuisempien vuorokausinäytteiden Cq-arvot ovat pienemmät ja ΔR_n myös selvästi korkeampi kuin lastaus- ja ympäristönäytteiden.



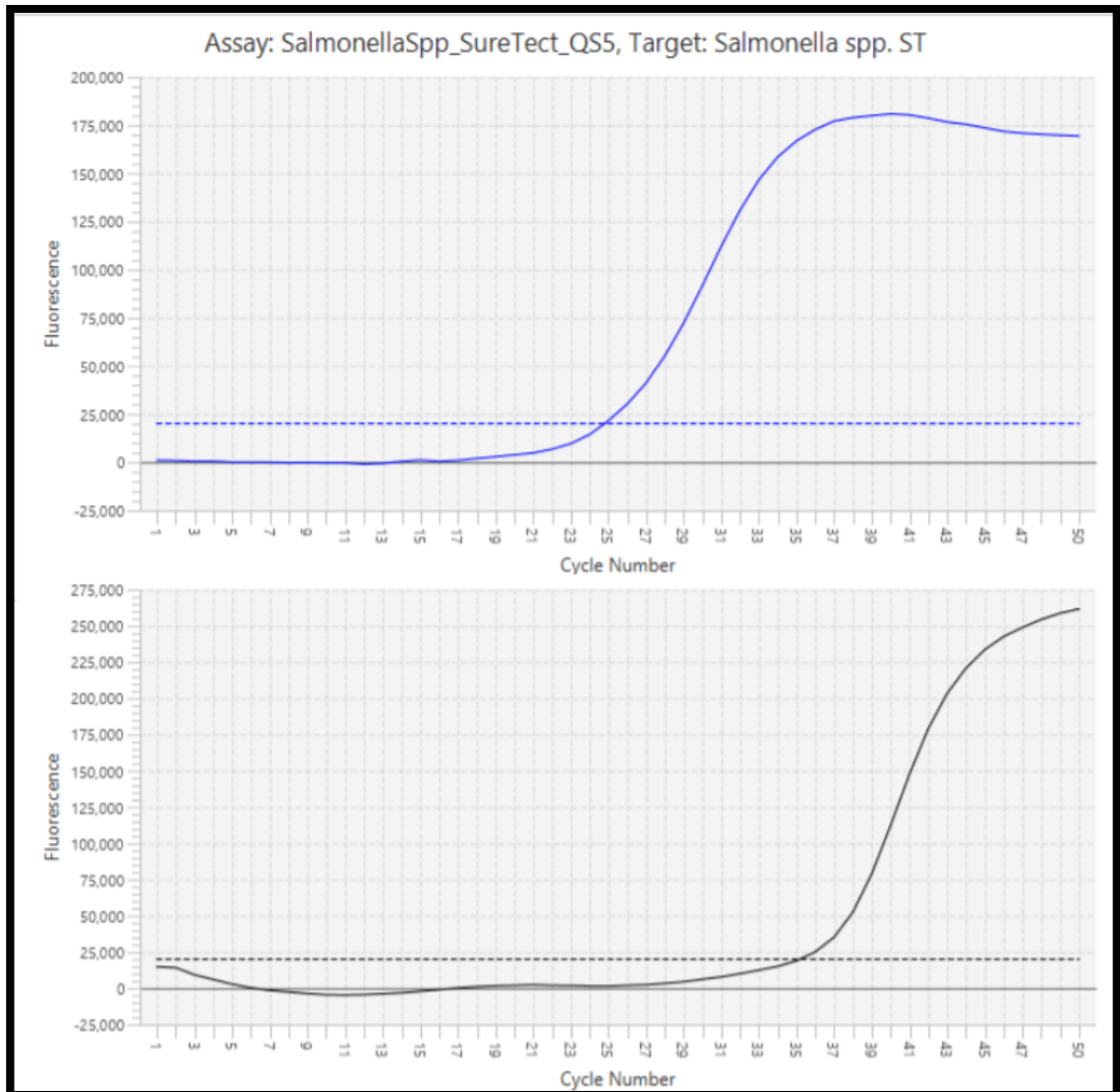
Kuva 10. IPC-kuvaajat 12 näytteen sarjasta: Laimentamattomat hankalan matriisin (lastaus- ja ympäristönäytteet) näytteet antavat systemaattisesti selvästi alhaisempia signaaleja kuin homogeenisemmat tuotantonäytteet. Yksi näytteistä ylittää määrittämyksen ylärajaa juuri ja juuri.

Laimentamisen vaikutus voidaan havaita myös *salmonellan* monistuskuvajia tarkastellessa. Kuvassa 11 esitellyissä kahdessa eri ajossa analysoiduissa, laimentamattomien *S. enterica* Tranoroa -näytteiden kohdesekvenssien (SLM) monistuskuvajat. IPC:hen nähden *salmonellakuvaajien* C_q-arvo sijoittuu noin syklin 26 paikkeille.



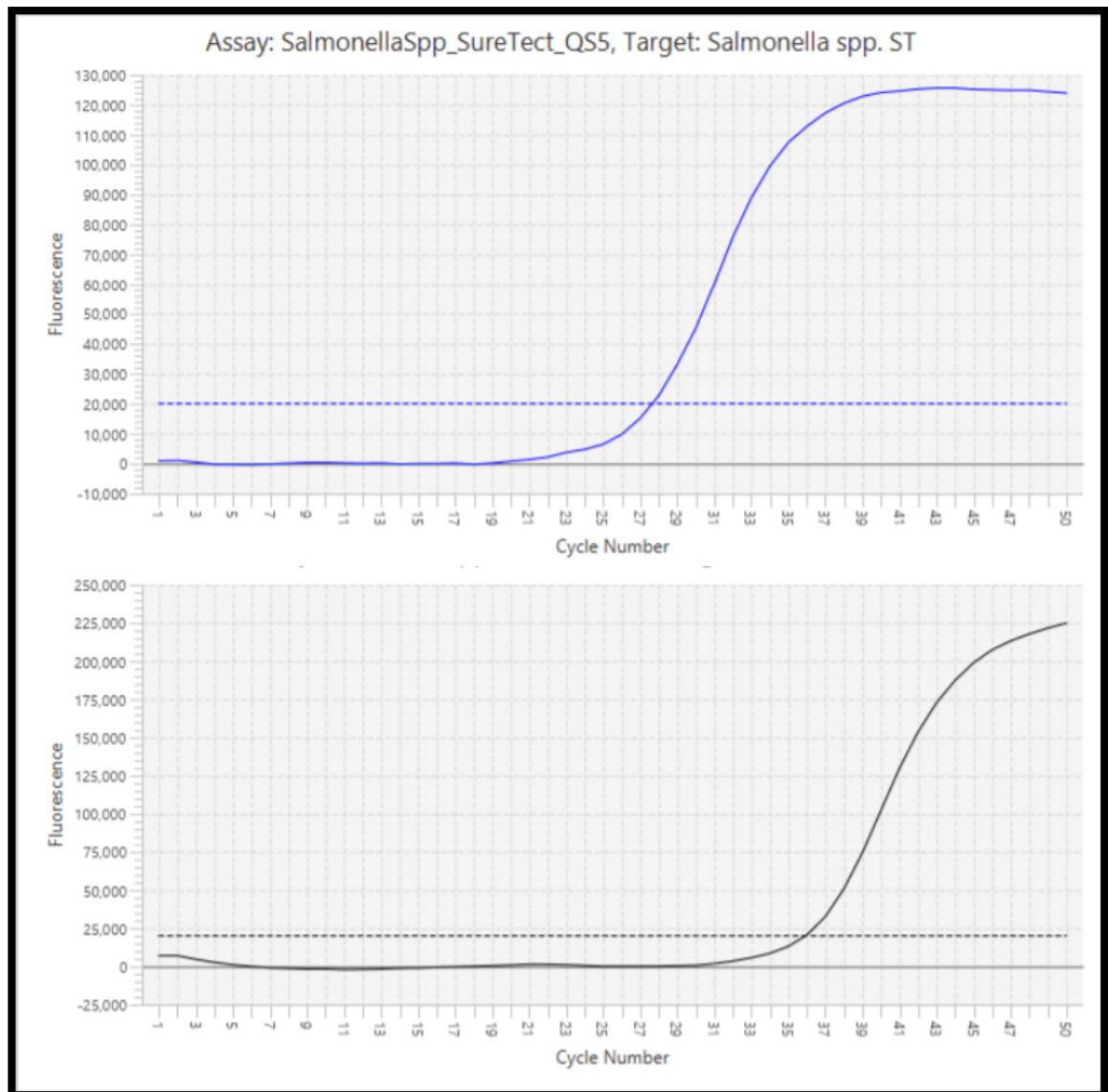
Kuva 11. Siniset käyrät: *salmonellaspesifisten* sekvenssien monistuminen kahdessa eri ajossa (molemmassa kuvissa 2 näytettä). Katkoviiva kuvaa määrittärajaa, joka on noin 20 000 ΔRn . Näytteitä ei ollut laimennettu.

Kuvassa 12 on esitetty *S. enterica* Tranoroa -näytteen *salmonellaspesifinen* kuvaaja sekä saman näytteen IPC-kuvaaja, jossa niiden C_q -arvojen erot ja myös kuvaajien muodot tulevat hyvin esiin. Määrittärajaa tässäkin reaktiossa oli noin 20 000 yksikköä. Positiivisen kontrollin IPC-kuvaajassa havaitaan signaalin käymistä nollan alapuolella.



Kuva 12. Laimentamaton *S. enterica* Tranoroa -näyte (ylempi kuvaaja) antoi selvän vasteen ja monistuskuvaajassa on selvä lineaarinen vaihe määrittysrajan ylittymisen ja eksponentiaalisen nousun jälkeen. Alla saman näytteen IPC-kuvaaja, jossa on havaittavissa pohjakohinaa ja signaalin käymistä nollan alapuolella (katkoviiva kuvaa määrittysrajaa).

Laitteen herkkyyden vuoksi Thermo Fisherin mikrobiologian teknisestä tuesta neuvottiin laimentamaan erityisesti vahvempia *salmonellakantoja* (kuten Tranoroaa). Laimentaminen näkyy tasaisempuna IPC-signaalina ja toisaalta *salmonellan* qPCR-kuvaajan lineaarisuutena (kuva 13).

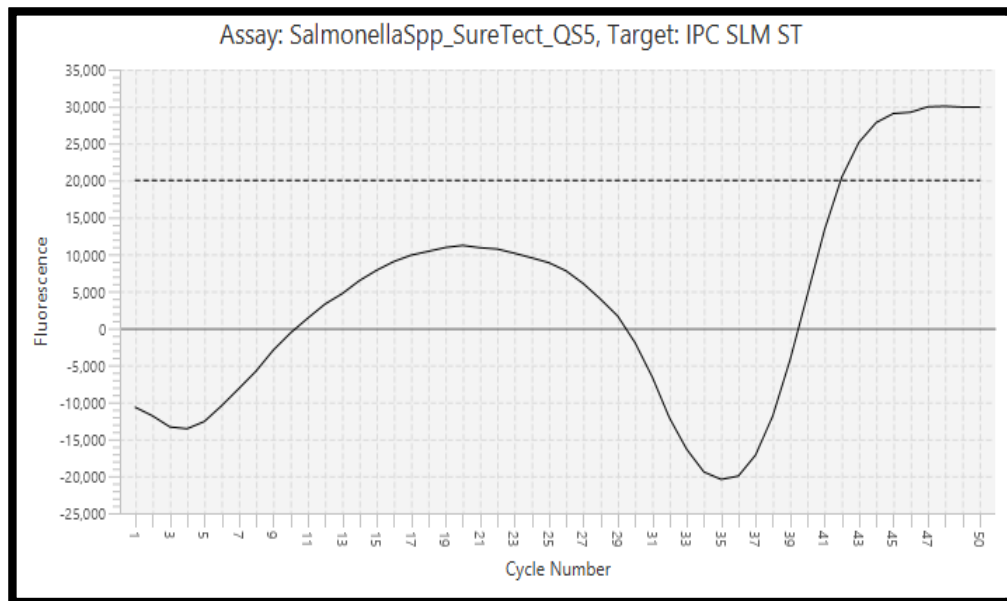


Kuva 13. Kymmenkertaisesti laimennettu *S. enterica* Tranoroa antoi paremman ja häiriöttömämmän vasteen kuin laimentamaton näyte, vaikka ΔR_n onkin laimennetulla näytteellä jäänyt alhaisemmaksi (ylempi kuvaaja). Katkoviiva kuvaa määrittärajaa.

4.1.2 Ongelmalliset qPCR-ajot

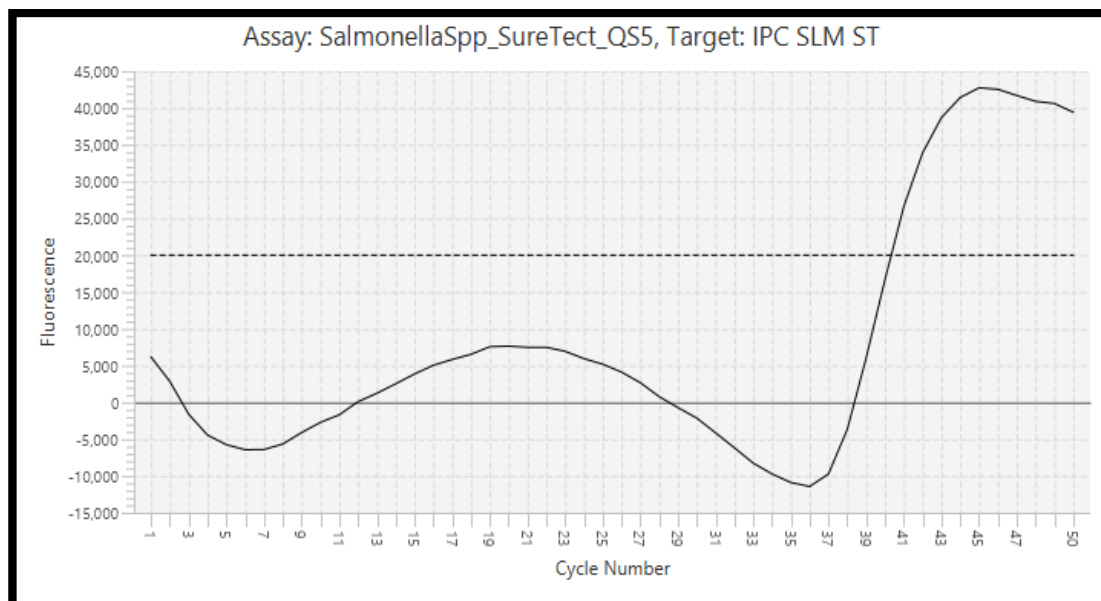
Lastausnäytteet ja ympäristönäytteet antoivat muita näytematriiseja useammin tulosvaroituksen eli IPC ei monistunut lainkaan tai sen monistuminen tapahtui

liian suurilla Cq-arvoilla, tuottaen usein myös alhaisen fluoresenssin tai muuten omituisia signaalien intensiteettivaihteluita (esimerkiksi kuva 14). Validointiprosessin aikana *salmonellaa* ei löytynyt yhdestäkään näytteestä, mutta QS5-laite antoi kerran kaksi (väärää) negatiivista tulosta positiivisia kontrollinäytteitä analysoitaessa.



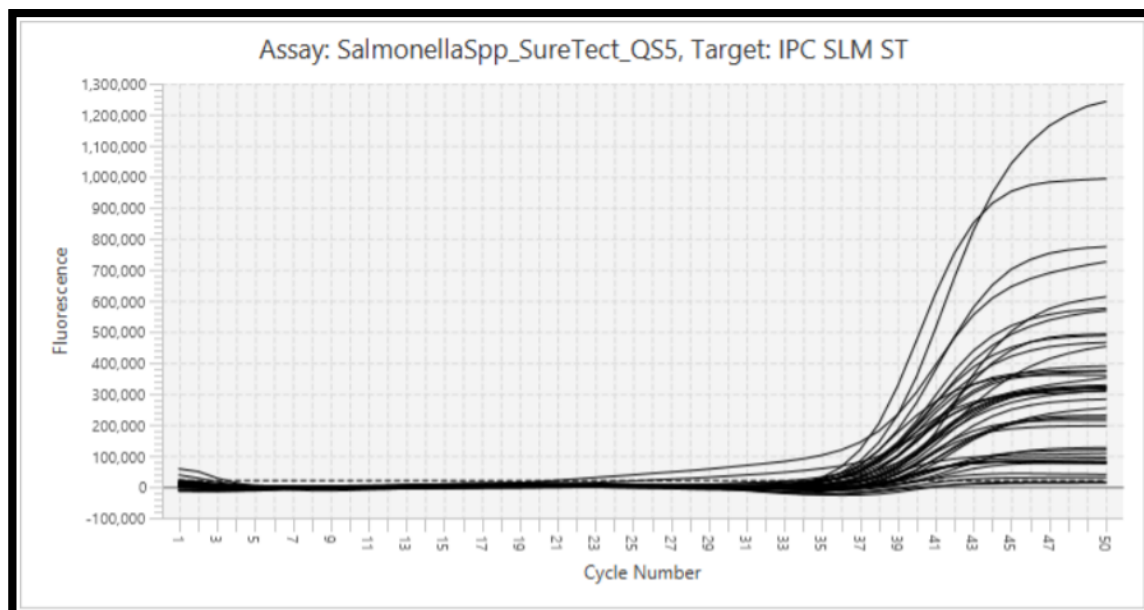
Kuva 14. Ympäristönäytteen IPC-kuvaaja. ΔR_n on todella alhainen, pohjavivassa on havaittavissa epämääräistä nousua ja laskua ($\Delta R_n = -20\,000$), määrittäysraja ylittyy vasta syklin 40 jälkeen eikä varsinaista monistusta pääse kunnolla tapahtumaan.

Tulosvaroituksen antoi helposti myös lastauksen aikana otettu puristenäyte. Kuvassa 15 reaktio on selvästi inhiboitunut, koska näytteen IPC-kuvaajassa on nähtävissä signaalien intensiteettivaihteluita fluoresenssin ollessa koko reaktion ajan erittäin heikon. Tässäkin analyysissä määrittäysraja ylittyi melko myöhäisillä sykleillä eikä senkään jälkeen ole selvää eksponentiaalista kasvua.



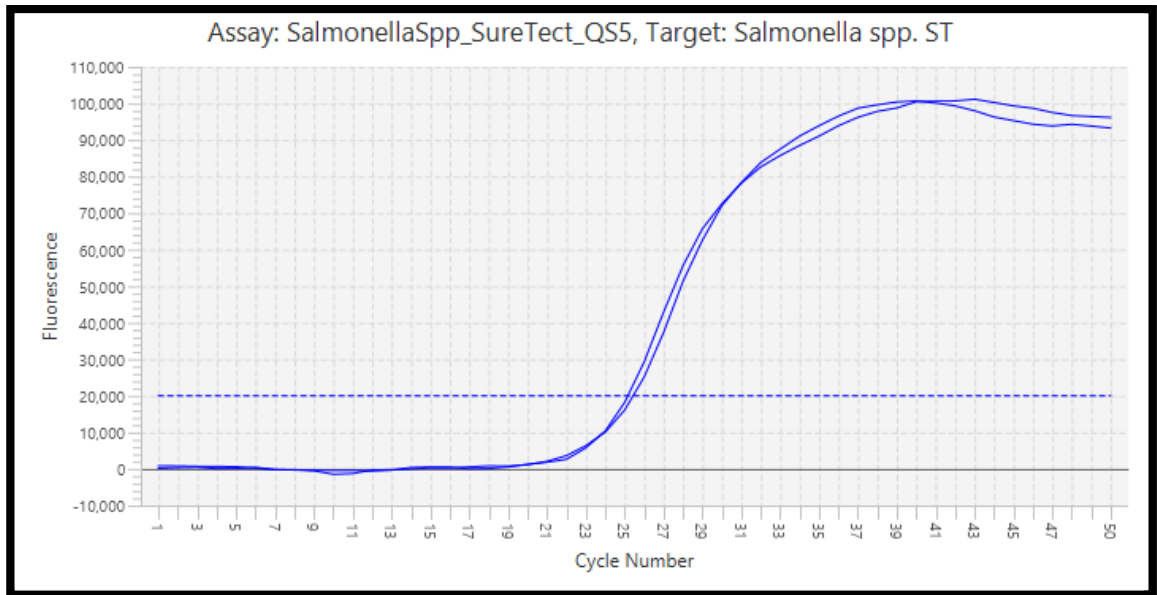
Kuva 15. Laimentamattoman lastatun puristeen kuvaaja, joka antoi tulosvaroituksen IPC:n monistumisen osalta. Kuvaajan pohjaviiva aaltoilee nollan molemmiin puolin ollen alhaisin ($\Delta R_n = -10\,000$) juuri ennen eksponentiaalista nousua. Vaste on heikko ja reaktio selvästi inhiboitunut.

Analysoitaessa tuotanto-, ympäristö- ja lastausnäytteistä koostuvaa näytesarjaa (kuva 16) laitteen ohjelmisto antoi neljän näytteen kohdalla IPC-tulosvaroituksen, mutta muut 38 näytettä antoivat hyväksytyyn vasteen. Kolme varoituksen antaneista näytteistä oli ympäristökierrosnäytteitä ja yksi lastauksen aikana kerätty näyte. Näytteitä ei ollut laimennettu.



Kuva 16. Rutiininäytesarjan (n = 42) IPC-kuvaajat. Ympäristönäytteistä 3 ja laustausnäytteistä 1 antoivat tulosvaroituksen, eli IPC ei monistunut kunnolla. Näytteitä ei ollut laimennettu.

Validoitava QS5-laite antoi bakteeriviljelyyn käytetyn peptonivesierän verifiointijossa kaksi väärää negatiivista tulosta. Väärät negatiiviset koskivat sekä uutta peptonivesierää että referenssinä käytettyä ”vanhaa” erää. Kuvaajia tarkastellessa (kuva 17) huomattiin kuitenkin, että *salmonellan* kohdesekvenssi on selvästi monistunut, mutta laite ei silti tunnistanut näytettä positiiviseksi. Thermo Fisherin mikrobiologisen tuen mukaan RapidFinder Analysis -ohjelmisto tulkitse selvästi positiiviset näytteet negatiivisiksi, koska näiden näytteiden ΔR_n -arvot olivat jääneet alhaisiksi – tämä on Thermo Fisherin mukaan tyypillistä juuri *salmonella* ser. Tranoroalle ja muille ”vahvoille” *salmonellakannoille*. Tästä syystä valmistaja neuvoi laimentamaan positiiviset kontrollit 1:10–1:50:een. [17.] Tässä työssä käytettiin 1:10-laimennosta.



Kuva 17. Väärät negatiiviset. Monistusta (siniset viivat) tapahtui selvästi, mutta signaalin taso on hiukan normaalia alhaisempi. Laitteen ohjelmisto ei alhaisen ΔRn -arvon (<100 000) perusteella tunnistanut *salmonellaa* kahdesta oikeasti positiivisesta näytteestä.

4.2 Validointinäytteiden Cq-arvot

Kuvaajien tarkastelun lisäksi myös kunkin näytteen Cq-arvo eli se piste (sykli), jossa määrittäysraja ylittyy, antaa tietoa esimerkiksi inhibition vaikutuksesta reaktion onnistumiseen. Vuorokausinäytteiden määrittäysraja IPC:n osalta ylittyi keskimäärin syklin 35,7 kohdalla. Samaa näytematriisia olevien negatiivisten kontrollien keskimääräinen Cq-arvo oli lähellä vuorokausinäytteiden arvoa: noin 35,1. Sen sijaan lastauksen aikana tai tuotantoprosessin ympäristöstä kerättyjen puristenäytteiden Cq-arvot olivat suuremmat, ympäristönäytteillä keskimäärin 39,5. Cq-arvoja ei kuitenkaan tarkasteltu syvemmin, koska tarkalla DNA-pitoisuudella ei tässä kvalitatiivisessa validoinnissa ollut merkitystä. Taulukossa 3 on esitetty kaikkien näytetyyppien kaikissa ajoissa saadut keskimääräiset Cq-arvot IPC:n ja SLM:n monistumisen osalta. Agona-näytteen kohdalla ei ollut tarpeellista laskea keskihajontaa, koska näytteitä oli niin vähän. Siksi niistä on esitetty vain keskiarvot. Liitteessä 3 on esitetty ajokohtaisesti kaikkien näytteiden Cq- ja ΔRn -arvot.

Taulukko 3. IPC- ja SLM-signaalien näytetyyppikohtaiset Cq-keskiarvot. Vuorokausinäytteiden määrittäjä IPC:n osalta ylittyi keskimäärin syklillä 35,7 kun taas ympäristönäytteen keskimääräinen Cq oli noin 39,5. SLM-kuvaajien Cq-arvot ovat selvästi alhaisempia. Eniten hajontaa oli negatiivisten kontrollien Cq-arvoissa ($s = 2,57$) ja hieman yllättävästi vähiten hajontaa oli ympäristönäytteiden Cq-arvoissa ($s = 0,57$). Agona-näytteen kohdalla ei ollut mielekästä laskea keskihajontaa.

Näytetyyppi	qPCR-näytteiden lukumäärä	Keskiarvo (IPC)	Keskihajonta (IPC)	Keskiarvo (SLM)	Keskihajonta (SLM)
Vuorokausinäyte	68	35,66	1,21	N/A	N/A
Lastattu puriste	42	37,05	0,84	N/A	N/A
Ympäristönäyte	8	39,48	0,54	N/A	N/A
Negatiivinen kontrolli	24	35,09	2,57	N/A	N/A
<i>S. enterica</i> Tranoroa (puriste)	10	36,05	0,57	25,45	N/A
<i>S. enterica</i> Agona (liha)	2	35,02	N/A	27,48	N/A

Rutiininäytesarjalla tarkoitetaan tässä yhteydessä sellaista sarjaa, jossa on mukana tuotannon vuorokausinäytteitä, lastauksen aikana kerättyjä sekä prosessiympäristöstä kerättyjä näytteitä. Positiivisia näytteitä analysoitiin yhteensä neljässä ajossa. Avenan laboratorio osallistui syksyllä 2021 *salmonellan* LGC-rengasanalyysiin, jossa analysoitiin lyofilisoitua lihanäytettä *salmonellan* varalta rinnakkain PikoRealilla ja QS5:lla. Validoitava qPCR-laite tunnisti kyllä kohdebakteerin (*Salmonella enterica* Agonan), mutta toisen Agona-näytteen IPC ei monistunut kunnolla.

Tulosvaroitusta IPC:n monistumisen osalta tuli useimmiten sellaisten näytteiden kohdalla, joiden signaalit hädän tuskin ylsivät määrittäjärajaa, eikä ohjelmisto voinut siksi määrittää niille luotettavaa Cq-arvoa (N/A). Pienimmät ohjelmiston

hyväksymät Cq-arvot IPC:n osalta olivat syklin 21 kohdalla. Toisaalta tulosvaroituksen antoivat myös näytteet, jotka ylittivät määrittäysrajan, mutta myöhäisillä sykleillä (Cq >41). Cq-arvojen hajonta ei kuitenkaan näyttänyt liittyvän siihen, millaisesta näytteestä on kyse, vaikka useimmiten juuri sakkaisemmat näytteet (lastaus- ja ympäristönäytteet) antoivat IPC:n osalta virheilmoituksen. Taulukon 4 on koottu kaikki tulosvaroituksen antaneet näytteet.

Taulukko 4. Yhteenveto tulosvaroituksen antaneista näytteistä. Suurin osa varoituksen antaneista puristenäytteistä oli ympäristö- tai lastausnäytteitä. Punaisella on korostettuna *S. enterica* Tranorooa -näytteestä saadut väärät negatiiviset tulokset, joissa ΔR_n on jäänyt hiukan alhaiseksi. Tyypillisessä tulosvaroituksessa oli sekä suuri Cq että alhainen ΔR_n , tai monistuminen oli niin inhiiboitunut, ettei määrittäysraja (ΔR_n noin 20 000) ylittynyt.

Näytetyyppi	Cq (IPC)	ΔR_n (IPC)	Cq (SLM)	ΔR_n (SLM)
LGC (<i>S. enterica</i> Agona)	41,47	33577,345	27,17	222981,28
Lastattu puriste	40,34	39434,045	N/A	N/A
Ympäristönäyte	41,95	29913,705	N/A	N/A
Ympäristönäyte	Alle määrittäysrajan	15534,103	N/A	N/A
Ympäristönäyte	Alle määrittäysrajan	12567,231	N/A	N/A
<i>S. enterica</i> Tranorooa	36,93	325797,55	25,12	96143,147
<i>S. enterica</i> Tranorooa	37,31	279283,6	25,44	93260,716
Lastattu puriste	40,25	33061,107	N/A	N/A
Negatiivinen kontrolli	Alle määrittäysrajan	5858,547	N/A	N/A
Ympäristönäyte	Alle määrittäysrajan	2389,317	N/A	N/A
Ympäristönäyte	43,96	33747,848	N/A	N/A

4.3 qPCR-laitteen validointiparametrien tilastollinen tarkastelu

Validoitavan QS5-laitteen ja referenssimenetelmänä käytetyn PikoRealin performanssin vertailemiseksi koottiin ristiintaulukko (taulukko 5), jossa validoitava laite on antanut joko

- oikean positiivisen
- oikean negatiivisen
- virhenegatiivisen
- virhepositiivisen

tuloksen. Molemmilla laitteilla positiivisiksi osoittautuneet, eli ”oikeat” positiiviset tulokset ovat N_{11} . QS5:llä negatiivisiksi, mutta PikoRealilla positiivisiksi osoittautuneet eli virhenegatiiviset tulokset ovat N_{12} . QS5:llä positiivisiksi, mutta PikoRealilla negatiivisiksi osoittautuneet eli virhepositiiviset tulokset ovat N_{21} . Molemmilla laitteilla negatiivisiksi osoittautuneet, eli ”oikeat” negatiiviset tulokset ovat N_{22} [18., s. 6]. N kuvaa kaikkien analyysitulosten lukumäärää (tässä validoinnissa $N = 22$).

Taulukko 5. Ristiintaulukko [19] kahden eri qPCR-laitteen (QS5 ja PikoReal) kyvystä määrittää luotettavasti *salmonella*-bakteeri puristenäytteestä. Taulukossa $N_{11} = 8$, $N_{12} = 2$, $N_{21} = 0$ ja $N_{22} = 12$. p_0 kuvaa menetelmän tarkkuutta, p_e sen odotettua tarkkuutta sekä κ_0 PikoRealin ja QS5:n antamien tulosten yhteensopivuutta.

		QuantStudio 5		
		+	-	Yhteensä
PikoReal	+	8	2	10
	-	0	12	12
Yhteensä		8	14	22
$p_0 = \frac{N_{11}}{N} + \frac{N_{22}}{N}$		0,91		
$p_e = \frac{(N_{1-} \cdot N_{-1}) + (N_{2-} \cdot N_{-2})}{N \cdot N}$		0,51		
$\kappa_0 = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$		0,81		

Ristiintaulukon perusteella laskettiin validoitavan QS5-laitteen tarkkuus p_0 , odotettu tarkkuus p_e sekä Cohenin kappa, κ_0 , jonka perusteella arvioitiin näiden kahden eri laitteen antamien tulosten yhteensopivuutta. Lisäksi laskettiin laitteen suhteellinen herkkyys ja suhteellinen spesifisyys sekä laitteen antamien väärin negatiivisten ja väärin positiivisten tulosten määrä. Lopuksi PikoRealin ja QS5:n antamia tuloksia vertailtiin MacNemarini eli χ^2 -testin avulla.

4.3.1 Suhteellinen tarkkuus ja odotettu tarkkuus

Suhteellinen tarkkuus kuvaa validoitavan laitteen ja referenssilaitteen tulosten vastaavuutta. Taulukon 6 perusteella QS5-laitteen tarkkuudeksi saatiin kaavan 1 mukaan

$$p_0 = \frac{N_{11}}{N} + \frac{N_{22}}{N} = \frac{(8+12)}{22} \approx 0,91 \quad (1)$$

Odotetuksi tarkkuudeksi (kun $N_{1-} = 10$, $N_{-1} = 8$, $N_{2-} = 12$ ja $N_{-2} = 14$) saatiin kaavan 2 mukaan

$$p_e = \frac{(N_{1-} * N_{-1}) + (N_{2-} * N_{-2})}{N^2} = \frac{(10*8) + (12*14)}{22^2} \approx 0,51 \quad (2)$$

4.3.2 Cohenin kappa, κ_0

Cohenin kappa kuvaa kahden eri menetelmän antamien tulosten yhtäpitävyyttä ja se lasketaan tarkkuuden ja odotetun tarkkuuden avulla kaavan 3 mukaan

$$\kappa_0 = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e} = \frac{(0,91 - 0,51)}{1 - 0,51} \approx 0,81 \quad (3)$$

Cohenin kappa sai tässä validoinnissa arvon 0,81, mikä viittaa siihen, että kahden qPCR-laitteen antamat tulokset ovat linjassa toistensa kanssa. Kapan ollessa $>0,80$ voidaan sanoa kahden eri menetelmän antamien tulosten olevan erittäin hyvin yhtäpitäviä [18, s. 8].

4.3.3 Suhteellinen herkkyys ja suhteellinen spesifisyys

Suhteellinen herkkyys ilmaistaan saatujen positiivisten tulosten suhteena kaikkiin positiivisiin tuloksiin. Suhteellinen herkkyys voidaan laskea kaavan 4 avulla.

$$\text{Suhteellinen herkkyys} = \frac{N_{11}}{N_{1-}} * 100 \% = \frac{8}{10} * 100 \% = 80 \% \quad (4)$$

Validoitavan laitteen herkkyudeksi saatiin 80 %, eli se kykeni validoinnin aikana löytämään ”oikeat” positiiviset tapaukset kaikista positiivisista näytteistä 80 %:n luotettavuudella. Kaksi väärää negatiivista aidosti positiivisista näytteistä alentavat suhteellista herkkyyttä melko paljon. Virhenegatiivisten osuus oli tässä validoinnissa siis 20 %.

Suhteellinen spesifisyys puolestaan kuvaa saatujen negatiivisten tulosten suhdetta kaikkiin negatiivisiin tuloksiin. QS5:n suhteelliseksi spesifisyydeksi saatiin kaavan 5 mukaan

$$\text{Suhteellinen spesifisyys} = \frac{N_{22}}{N_{2-}} * 100 \% = \frac{12}{12} * 100 \% = 100 \%. \quad (5)$$

QS5 ei antanut kertaakaan väärää positiivisia tuloksia, joten virhepositiivisten tulosten osuus oli tässä validoinnissa 0 %.

4.3.4 χ^2 -testi

χ^2 -testillä voidaan arvioida väärin positiivisten ja väärin negatiivisten tulosten suhdetta. Laitteen antamien virhepositiivisten ja virhenegatiivisten tulosten määrällä ei tulisi olla tilastollisesti merkitsevää eroa (95 %:n luottamusvälillä) [18, s. 7.] Kaavassa 6 N_{12} edustaa virhenegatiivisia (yhteensä 2) ja N_{21} virhepositiivisia (yhteensä 0) tuloksia.

$$\chi^2 = \frac{(|N_{12} - N_{21}| - 1)^2}{N_{12} + N_{21}} = \frac{(|2 - 0| - 1)^2}{2 + 0} = \frac{1}{2} \quad (6)$$

Saatu tulos $\chi^2 = 0,5 < 3,84$ eli todellisten positiivisten tulosten määrä ei eroa kaikista positiivisista tuloksista tilastollisesti merkitsevästi 95 %:n luottamusvälillä.

5 Yhteenveto ja pohdintaa

Tämän opinnäytetyön keskiössä oli Avena Kantvikin laboratorioon hankittu uusi QuantStudio 5 qPCR-laite, jolla haluttiin korvata aiemmin käytössä ollut 24-paik-

kainen PikoReal-laite. Syy korvaamiselle oli vanhan laitteen jääminen liian pieneksi laboratorioissa analysoitavaan näytemäärään nähden ja toisaalta PikoRealin huoltosopimuksen päättyminen. Uudelle, 96-paikkaiselle qPCR-laitteelle tehtiin asennustarkastus (IQ) ja toiminnallinen testaus (OQ). Perusasetusten (kuten käyttäjätilien luomisen) jälkeen laitteen mukana tulleelle tietokoneelle asennettiin RapidFinder Analysis -ohjelmisto. Ohjelmaan ladattiin *salmonella*-analyyseissä käytetyn SureTect-kitin tiedot. PQ-vaiheessa laitteen suorituskykyä eli kykyä monistaa ja tunnistaa tutkittavan organismin DNA:ta testattiin TaqMan™ RNase P Plate -verifikaatiokitillä ja myöhemmin puristenäytteillä.

Projektissa haluttiin ottaa huomioon sellaisia seikkoja, jotka voisivat parantaa laadunvalvontaprosessia entisestään. Avenan laboratorioissa oli jo pidempään pohdittu yhden näytetyypin ongelmallisuutta: lastauksen aikana kerättyjen sekä tuotantoprosessin ympäristöstä kerättyjen puristenäytteiden kohdalla qPCR-laite antoi muita näytteitä useammin virheilmoituksen, myös referenssimenetelmänä toimineella PikoReal-laitteella. Monistuskuvaaajia tutkittaessa sisäisen kontrollin (IPC) osalta huomattiin, että sen monistuminen on jollain tavalla estynyt: monistusta ei joko tapahdu ollenkaan tai se tapahtuu liian myöhäisillä sykyleillä (Cq-arvo poikkeaa liikaa muiden näytteiden ja erityisesti negatiivisen kontrollin Cq-arvoista, tai fluoresenssin intensiteetti ΔR_n on liian alhainen). Tämän näytematriisin haastavuus loi tarpeen löytää keinoja tuottaa parempia qPCR-tuloksia esimerkiksi optimaalisella laimentamisella, noudattaen ISO/IEC 17025 -standardia, NMKL 71 -standardia sekä kittitoimittajan ohjeita.

Työllä oli monenlaisia virhelähteitä edustavan näytteen valmistuksesta genomisen DNA:n eristykseen sekä laitteen ja sen ohjelmiston toimivuuteen. Jos alkuperäinen puristenäyte ei ole riittävän edustava, ei tulokseenkaan voi täydellisesti luottaa. Hyvin pienten tilavuuksien (tässä työssä 10–20 μ l) pipetoiminen tekee analyysiin aina satunnaisvirhettä. Analyysi voi epäonnistua jo soluhajotusvaiheessa, jos pipetoidut määrät eivät vastaa todellisuutta. Esimerkiksi heilahtelut proteinaasi K:n konsentraatiossa voivat johtaa vaillinaiseen soluhajotukseen eikä gDNA:n eristäminen onnistu. Toisaalta erilaiset kondensaatiopisarot qPCR-

putken korkissa voivat johtaa reaktion epäonnistumiseen, koska reaktion seuraaminen perustuu näytteestä lähtevän fluoresenssin mittaamiseen. Myös qPCR-laitteen kyky säädellä näytekaivojen lämpötilaa riittävällä tarkkuudella vaikuttaa eri näytteiden tuloksiin, minkä vuoksi eri näytekaivojen lämpötilojen on oltava yhteneväiset (tässä laitteessa hajonta kaivojen välillä oli $<0,50$ °C).

Validoinnin ja erityisesti tuoteturvallisuuden kannalta merkittävin analyysituloks on vääräksi negatiiviseksi osoittautunut, todellisuudessa positiivinen näyte. qPCR on menetelmänä erittäin herkkä, koska se perustuu nukleiinihappojen määrittämiseen näytteestä. Thermo Fisherin mikrobiologian teknisen tuen mukaan etenkin *S. enterica* Tranorooa -kanta voi antaa herkästi virhesignaalia, jos näytettä ei ole laimennettu [17].

Validointiprojektissa uuden laitteen herkkyudeksi, eli kyvyksi löytää aidosti positiiviset tapaukset kaikkien positiivisten joukosta, saatiin 80 %. Suhteellista herkkyyttä alentaa validoinnin aikana saadut kaksi väärää negatiivista tulosta. Virhenegatiivisista tuloksista huolimatta laitteen suoriutuminen *salmonellan* määrittämisestä on riittävän luotettavaa, koska PikoRealin ja QS5:n antamien tulosten yhdenpitävyyttä kuvaava κ_0 oli 0,81. Validoitavan laitteen spesifisyys oli 100 % eikä virhepositiivisia tuloksia tullut tämän opinnäytetyön aikana lainkaan. Virhepositiivisten ja virhenegatiivisten tulosten suhdetta kuvaava χ^2 oli 0,5, eli todellisten ja oletetusti positiivisten tulosten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (kun $p = 0,05$). Taulukossa 6 on esitetty vielä yhteenveto tarkastelluista validointiparametreista.

Taulukko 6. Validointiparametrien yhteenveto.

Validointiparametrit	Laskukaava	Tulokset
Tarkkuus, p_o	$\frac{N_{11}}{N} + \frac{N_{22}}{N} * 100 \%$	0,91
Odotettu tarkkuus, p_e	$\frac{(N_{1-} * N_{-1}) + (N_{2-} * N_{-2})}{N^2}$	0,51
Cohenin kappa, κ_o	$\frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$	0,81 (>0,80)
Suhteellinen herkkyys	$\frac{N_{11}}{N_{1-}} * 100 \%$	80 %
Suhteellinen spesifisyys	$\frac{N_{22}}{N_{2-}} * 100 \%$	100 %
Virhenegatiivisuus	$1 - \frac{N_{11}}{N_{1-}} * 100 \%$	20 %
χ^2 -testi	$\frac{(N_{12} - N_{21} - 1)^2}{N_{12} + N_{21}}$	0,5 (<3,84)

Jatkossa on kuitenkin kiinnitettävä huomiota siihen, että tämä qPCR-laite ja etenkin RapidFinder Analysis -ohjelmisto ovat PikoReal-laitetta ja sen SureTect-ohjelmistoa herkempi ΔR_n -vaihteluille. Koska ΔR_n -arvoon vaikuttaa olennaisesti näytetyyppi (kolloidisten matriisien, kuten lastaus- ja ympäristönäytteiden fluoresenssisignaalia heikentävä vaikutus), tällaisten näytteiden laimentaminen tulosvaroituksen jälkeen selvästi edesauttaa qPCR-reaktion onnistumista. Myös *salmonella*kontrollit tulisi laimentaa, varsinkin, jos käytössä on "vahvoja" kantoja. PikoReal korvataan uudella QS5-laitteella sen jälkeen, kun FINAS on sen auditoinut.

Lähteet

- 1 Salmonella. 2019. Verkkoaineisto. Terveystieteiden tutkimuskeskus ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/salmonella>> Luettu 29.8.2021.
- 2 Harris, B. Jason; Brooks & Abdullah W. 2013. Typhoid and Paratyphoid Enteric Fever. Harris, B. Jason; Brooks, Abdullah W. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. Elsevier inc. 9. painos.
- 3 Salmonella enterica serovar Typhi. Verkkoaineisto. Encyclopaedia Britannica. <<https://www.britannica.com/science/Salmonella-enterica-serovar-Typhi>> Luettu 1.1.2022.
- 4 Standard Operating Procedure for Identification of Salmonella by Biochemical testing. Verkkoaineisto. National Institute of Health. <<https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2019/01/SOP-Aerobic-Gram-Negative-Bacilli-Salmonella.pdf>> Luettu 4.1.2022.
- 5 Mehrdad, Tajkarimi. 2007. Verkkoaineisto. Salmonella spp. <https://www.cdfa.ca.gov/ahfss/Animal_Health/PHR250/2007/25007Sal.pdf> Luettu 1.9.2021.
- 6 Zuraw, Lydia. 2014. Salmonella Biofilms Extremely Resistant to Disinfectants. Verkkoaineisto. <<https://www.foodsafetynews.com/2014/01/salmonella-biofilms-extremely-resistant-to-disinfectants/>> 23.1.2014. Luettu 20.9.2021.
- 7 Real-time PCR handbook. 2014. Verkkoaineisto. Life Technologies (Thermo Fisher Scientific). <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/rea-time-pcr-handbook.pdf>> Luettu 1.10.2021.
- 8 Nolan, Tania (ed.). 2014. PCR Technologies - A Technical Guide. Sigma Aldrich.
- 9 Nolan, Tania & Bustin, Stephen A (toim.), 2013. PCR Technology. Current Innovations. Taylor & Francis Group.
- 10 Dorak, Tefik M (toim.), 2007. Real-time PCR. 1. Uudistettu painos. Taylor & Francis Group.
- 11 Mulberry, Geoffrey; White, Kevin A. et al. 2017. Verkkoaineisto. 3D printing and milling a real-time PCR device for infectious disease diagnosis.

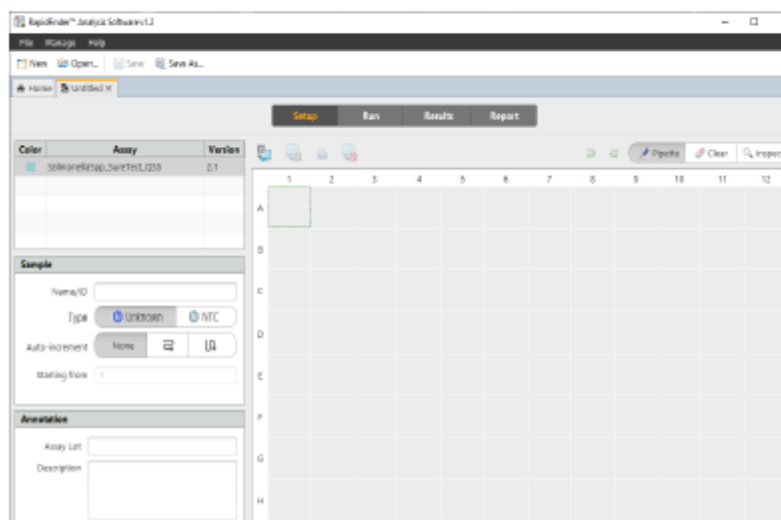
tics<https://www.researchgate.net/figure/Optical-design-of-real-time-fluorescence-measurement-for-qPCR-The-blue-LED-470-nm_fig2_317631919> Luettu 15.11.21.

- 12 Page, Robert B. & Stromberg, Arnold J. 2011. Verkkoaineisto. Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments. <https://www.researchgate.net/publication/51521501_Linear_Methods_for_Analysis_and_Quality_Control_of_Relative_Expression_Ratios_from_Quantitative_Real-Time_Polymerase_Chain_Reaction_Experiments> The Scientific World Journal 11:1383-93. Luettu 1.10.2021
- 13 Jani Holopainen. 2013. Koulutusmateriaali. Thermo Fischer Scientific. SureTect™ Real-Time PCR elintarvikepatogeenien tunnistamisessa. Vantaa.
- 14 Solaris qPCR Gene Expression Assays. 2009. Thermo Scientific.
- 15 SureTect™ Salmonella species PCR Assay. Lysis and real-time PCR detection of *Salmonella* species and environmental samples. 2021. Thermo Fisher Scientific.
- 16 Salmonella. Osoittaminen elintarvikkeista. 1999. NMKL. NMKL 71, 5. painos.
- 17 Sorri, Virpi. 2021. Technical Support Advisor (Microbiology). Thermo Fisher Scientific, Vantaa. Keskustelu 27.9.2021.
- 18 Evaluation of Results for Qualitative Methods. 2007. NMKL. NMKL Procedure, No 20 (versio 1).
- 19 Excel - NMKL Procedure No 20. NMKL. Verkkoaineisto. <<https://www.nmkl.org/index.php/en/publications/item/evaluating-av-resultater-fra-kvalitative-metoder-2>> Luettu 10.1.2022.

QS5 -laitteen pikakäyttöopas

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™) – pikakäyttöopas

1. Kytke virta tietokoneeseen (Dell), paina ctrl + alt + del ja kirjaudu sisään. Käyttäjätunnus: [REDACTED] ja salasana [REDACTED]
2. Kytke virta qPCR-laitteeseen (painike on laitteen takana, alavasemmassa).
3. Laite käynnistyy parissa minuutissa. Kun laite on käynnistynyt, voidaan sitä operoida kosketusnäytöltä. Laitteen vasemmassa alakulmassa on "Sign in" -toiminto, mutta laitetta voi käyttää myös kirjautumatta sisään.
4. Avaa RapidFinder Analysis -ohjelmisto työpöydältä.
5. Klikkaa ohjelmiston vasemmasta yläkulmasta "New", jolloin aukeaa seuraava näkymä:

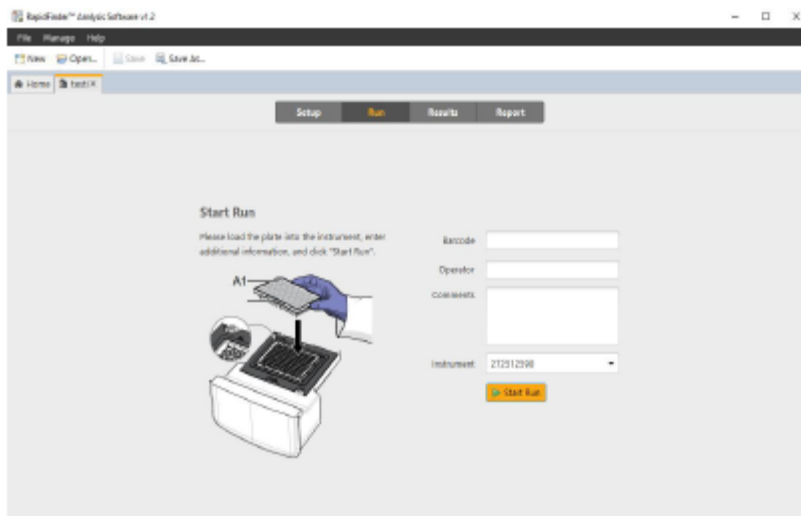


6. Kirjoita vasemmalla puolella olevaan "Description"-kenttään omat nimikirjaimesi, esim. "MR". "Assay lot" -kohtaan kirjoitetaan käytetyn kitin ja peptonivesierän tiedot, esimerkiksi 0020002941/91. Näytetyypiksi valitaan joko "Unknown" tai "NTC" (negatiivinen kontrolli). "Name/ID" -kohtaan kirjoitetaan näyte numero, esimerkiksi "LP15".
7. Kun tiedot on kirjattu, näytetarjotin tallennetaan klikkaamalla ylhäällä olevaa painiketta "Save as". Tiedosto nimetään sen päivämäärän mukaan, jolloin näytteet ajetaan, esimerkiksi "20210621" (muotona vv.kk.pp).

8. Avaa laitteen luukku painamalla avaussymbolia laitteen kosketusnäytön oikeasta yläkulmasta. **(HUOM! Katso, että luukku pääsee vapaasti aukeamaan!)** Aseta näytteet mustalle "näytelevylle" (plate adapter) siinä järjestyksessä kuin olet näytetarjottimen luonut. Huomaa, että putket eivät mene ihan pohjaan asti. Adapteria ei tarvitse käyttää, mikäli kaikki 96 näytepaikkaa ovat käytössä. Paina uudelleen avaussymbolia niin luukku menee kiinni.

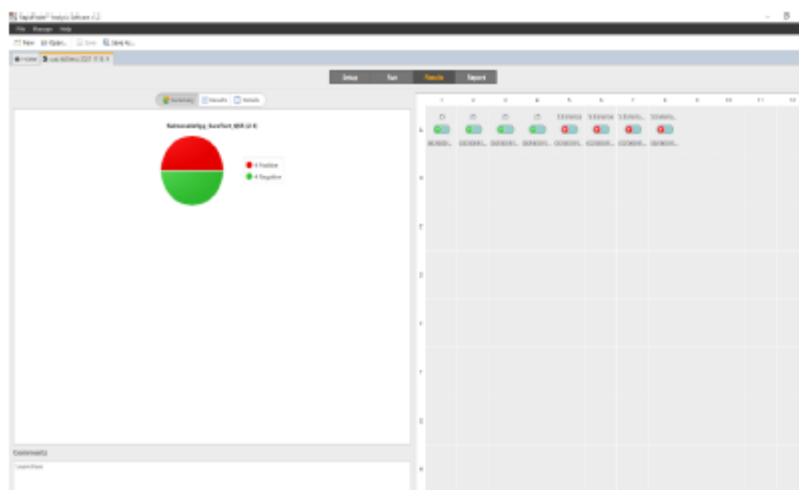


9. Tallentamisen ja näytteen asettamisen jälkeen klikataan "Setup"-kohdan vieressä olevaa "Run"-painiketta:



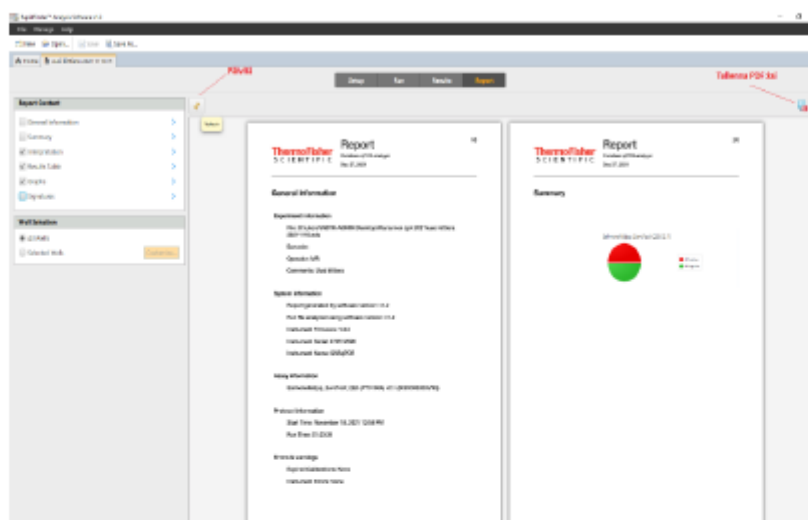
"Barcode"-kohta jätetään tyhjäksi, mutta "Operator"-kohtaan voi kirjoittaa uudestaan omat nimikirjaimensa, esim. "MR". "Comments"-kenttään voi halutessaan kirjoittaa ajon liittyviä kommentteja. "Instrument"-kohtaan tulee automaattisesti "212312398" (QS5-laitteen sarjanumero). Klikkaa lopulta "Start Run" -painiketta. Laitteen ja RapidFinder Analysis -ohjelman näytölle ilmestyy ajon tiedot (ajon kokonaiskesto, ajon eri vaiheiden lämpötilat ja niiden kestot).

10. Ajo kestää noin 80 minuuttia. Kun ajo on valmis, tulokset ovat luettavissa ohjelmiston "Results"-kohdasta. Klikkaa "Results", jolloin avautuu seuraava näkymä:

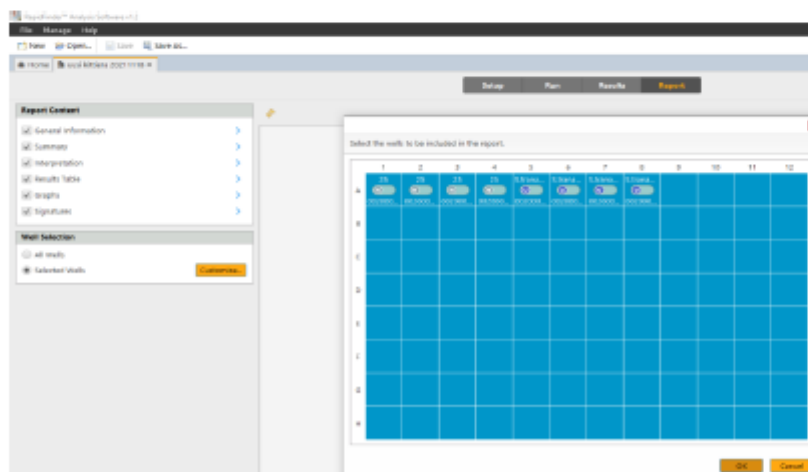


Tulokset näytetään aluksi piirakkakuviona. Tuloksia voi tarkastella tarkemmin klikkaamalla tarkasteltavaa näytettä ja valitsemalla "Details".

- Seuraavaksi klikataan "Report" ja valitaan, mitä raporttiin halutaan. "Interpretation", "Results Table" ja "Graphs" yleensä riittävät. Raporttiin tulee kaikkien näytteiden tiedot, jos valittuna on "All wells".

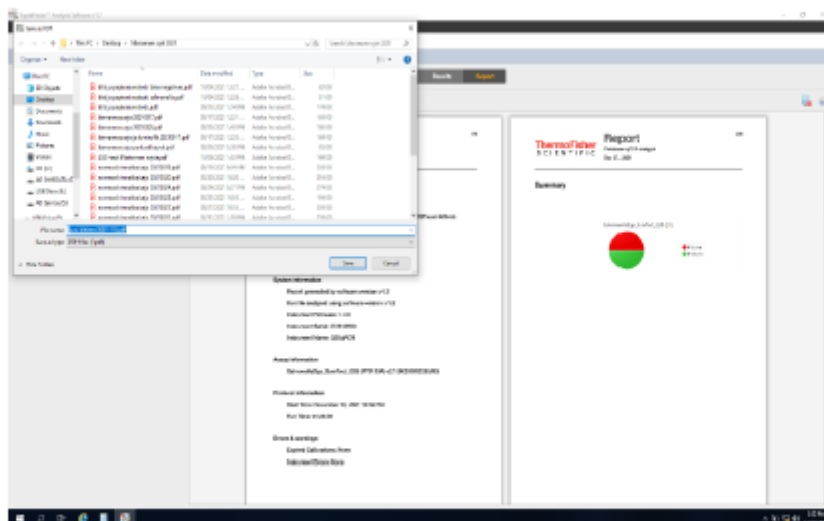


- Jos haluat vain osan näytteistä raporttiin, klikkaa "Selected wells", jolloin avautuu seuraava näkymä:



Klikkaa haluttua näytettä ja paina "OK". Klikkaa myös "Refresh"-symbolia niin tiedot päivittyvät.

13. Tallenna raportti haluttuun kansioon:



14. Avaa QuantStudio 5:n luukku kosketusnäytön yläoikealta ja ota näyttöet pois. Hävitä näyttöet asianmukaisesti.

Laimennusohje lastaus- ja ympäristönäytteille

Lastatun puristeen/ympäristönäytteen laimentaminen ennen qPCR-ajoa

Taustaa

Prosessin lopputuotteiden vuorokausinäytteet ovat yleensä riittävän homogeenisiä, eikä niiden seassa ole ympäristötekijöistä johtuvia vieraita partikkeleita tai muita epäpuhtauksia. Kuitenkin eräät näytematriisit, kuten **lastattu puriste** (tai lastattu laiva) sekä **ympäristöhygienianäytteet**, antavat vuorokausinäytteitä useammin tulosvaroituksen eli ”huutomerkkin” qPCR-ajossa. Jokaisessa näytteessä on mukana sisäinen positiivinen kontrolli (**IPC**), jonka ansiosta qPCR-reaktion onnistumista seurataan ajon aikana varsinaisen *salmonellan* tutkimisen lisäksi. Lastattu puriste (”LP”) tai ympäristönäyte voivat antaa virheilmoituksen nimenomaan IPC:n osalta – monistusta ei tapahdu joko ollenkaan tai määritysraja ylittyy liian myöhäisillä sykleillä.

Tämän ohjeen tarkoituksena on ohjeistaa Avenan laboratoriossa työskenteleviä oikeanlaiseen LP- tai ympäristönäytteen laimentamiseen, jotta ”huutomerkkejä” ei tulisi eikä ajoja tarvitsisi tämän vuoksi uusia. Ohjeen perustana on Thermo Scientificin SureTect™ Salmonella Species PCR Assay -kittiohje, jossa hankalien näytematriisien laimentamista suositellaan. **Kokeellisesti on huomattu, että 1:5-laimennos antaa parhaan vasteen, joten laimentamista suositellaan käytettäväksi jatkossa kaikkiin LP- ja ympäristönäytteisiin.**

Työohje 1:5-laimennoksen valmistamiseen

1. Pipetoi kaikki näytteet normaalisti 21–24 tunnin ajan inkuboituneista viljelypusseista automaattipipetillä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin (”eppareihin”).
2. Avaa peptonivesipullo ja pipetoi siitä suoraan 1 ml peptonivettä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen. Jos LP- tai ympäristönäytteitä on paljon, kannattaa varmuuden vuoksi pipetoida hieman ekstraa tai ottaa useampia putkia.

3. Ota 1 mikrosentrifugiputki yhtä LP- tai ympäristönäytelaimennosta kohti. Esimerkiksi, jos sinulla on vain yksi LP-näyte, pipetoi se normaaliprotokollan mukaisesti 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen.
4. Pipetoi tästä laimentamattomasta LP- tai ympäristönäytteestä automaattipipetillä 100 µl näytettä tyhjään mikrosentrifugiputkeen. Sen jälkeen pipetoi 400 µl peptonivettä, vorteksoi n. 5 sekuntia ja anna mahdollisen sakan laskeutua ennen siirtoa lyysausputkiin.
5. Soluhajotuksen jälkeen pipetoi näytteet normaalisti valkoisiin qPCR-putkiin varoen, ettei sekaan joudu lyysauspartikkeleita.
6. Varsinaiset qPCR-näytteet voi ajaa rinnakkain niin, että puolet näytteistä ovat laimentamattomia ja puolet laimennettuja (lastatussa puristeessa ajetaan aina 4 rinnakkain, ympäristönäytteissä 2 rinnakkain).

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, ΔRn -arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 1				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
Neg. ctrl	36,36	170302,243	N/A	N/A
Neg. ctrl	32,63	548886,728	N/A	N/A
S.Tranoroa	37,58	217125,334	25,46	121959,332
S.Tranoroa	36,09	270397,773	25,22	155332,615
Keskiarvo	35,67	301678,02	25,34	138645,9735

Ajo 2				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
LGC	35,02	202928,011	27,78	288526,975
LGC	41,47	33577,345	27,17	222981,282
Neg. ctrl	36,81	196060,778	N/A	N/A
Neg. ctrl	37,68	161565,7	N/A	N/A
Keskiarvo	37,75	186851,50	27,475	255754,13

Ajo 3				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
LP 1:1	36,35	474485,825	N/A	N/A
LP 1:1	35,53	374026,073	N/A	N/A
LP 1:2	36,40	162036,400	N/A	N/A
LP 1:2	36,64	195903,638	N/A	N/A
LP 1:3	35,46	352213,588	N/A	N/A
LP 1:3	36,06	194377,298	N/A	N/A
LP 1:5	36,55	184691,088	N/A	N/A
LP 1:5	35,97	139196,081	N/A	N/A
Neg. ctrl	32,61	350240,421	N/A	N/A
Neg. ctrl	34,76	805808,481	N/A	N/A
Keskiarvo	35,63	323297,89	N/A	N/A

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, ΔRn -arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 4				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
77	30,34	393254,959	N/A	N/A
77	35,31	233174,404	N/A	N/A
79	35,03	292050,183	N/A	N/A
79	36,27	218757,858	N/A	N/A
80	34,77	271347,153	N/A	N/A
80	31,55	995634,117	N/A	N/A
81	36,31	184373,533	N/A	N/A
81	35,65	275770,147	N/A	N/A
LP82	34,95	431504,688	N/A	N/A
LP82	37,71	189504,12	N/A	N/A
LP82	36,32	274314,24	N/A	N/A
LP82	36,44	314016,525	N/A	N/A
60	37,45	267174,323	N/A	N/A
60	37,38	246863,491	N/A	N/A
Neg. ctrl	36,73	221825,99	N/A	N/A
Neg. ctrl	38,39	241155,614	N/A	N/A
Keskiarvo	35,66	315670,08	N/A	N/A

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, ΔRn -arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 5				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
84	35,88	382707,024	N/A	N/A
84	35,68	560847,089	N/A	N/A
85	35,35	287630,788	N/A	N/A
85	38,02	158968,108	N/A	N/A
86	37,66	305366,933	N/A	N/A
86	35,10	235915,19	N/A	N/A
LP92	37,19	141390,674	N/A	N/A
LP92	37,68	108250,097	N/A	N/A
LP92	36,39	202156,202	N/A	N/A
LP92	36,58	201509,913	N/A	N/A
Neg. ctrl	36,32	179588,292	N/A	N/A
Neg. ctrl	37,58	166454,364	N/A	N/A
MP90	38,18	226604,386	N/A	N/A
MP90	41,60	124520,091	N/A	N/A
MP90	36,89	233478,239	N/A	N/A
MP91	35,81	574226,712	N/A	N/A
MP91	36,96	253473,771	N/A	N/A
MP91	Alle määrittysrajan	6171,189	N/A	N/A
Keskiarvo	36,99	255475,75	N/A	N/A

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, Δ Rn-arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 6				
Näyte	Cq (IPC)	Δ Rn (IPC)	Cq (SLM)	Δ Rn (SLM)
08	33,83	722934,494	N/A	N/A
08	35,36	639523,953	N/A	N/A
09	34,27	679700,809	N/A	N/A
09	34,70	718166,366	N/A	N/A
10	34,36	796808,56	N/A	N/A
10	28,66	945247,096	N/A	N/A
Neg. ctrl	31,34	1013891,346	N/A	N/A
Neg. ctrl	28,53	936446,739	N/A	N/A
LP12	37,66	234909,973	N/A	N/A
LP12	37,51	154640,296	N/A	N/A
LP12	38,03	94337,554	N/A	N/A
LP12	40,25	33061,107	N/A	N/A
Keskiarvo	34,02	630600,65	N/A	N/A

Ajo 7				
Näyte	Cq (IPC)	Δ Rn (IPC)	Cq (SLM)	Δ Rn (SLM)
LP 1:1	40,01	79946,303	N/A	N/A
LP 1:1	42,21	72065,451	N/A	N/A
LP 1:5	35,10	204534,359	N/A	N/A
LP 1:5	34,79	256422,843	N/A	N/A
LP 1:10	35,49	198772,749	N/A	N/A
LP 1:10	32,02	219521,328	N/A	N/A
Neg. ctrl	37,41	210622,919	N/A	N/A
Neg. ctrl	Alle määrittysrajan	5858,547	N/A	N/A
Keskiarvo	36,72	177412,28	N/A	N/A

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, ΔRn -arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 8				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
20	33,99	428711,206	N/A	N/A
20	34,63	507245,332	N/A	N/A
21	37,09	254834,939	N/A	N/A
21	37,21	97931,338	N/A	N/A
22	38,60	176869,629	N/A	N/A
22	37,91	288120,453	N/A	N/A
23	36,20	385384,681	N/A	N/A
23	35,93	303447,209	N/A	N/A
VN07	36,60	286323,085	N/A	N/A
VN07	36,92	256307,664	N/A	N/A
LP25	37,98	84910,222	N/A	N/A
LP25	36,40	183996,171	N/A	N/A
LP25 1:5	35,52	169362,118	N/A	N/A
LP25 1:5	35,60	150515,077	N/A	N/A
Neg. ctrl	38,27	121682,387	N/A	N/A
Neg. ctrl	36,67	217226,337	N/A	N/A
Keskiarvo	36,60	244554,24	N/A	N/A

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, ΔRn -arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 9				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
27	36,52	231925,428	N/A	N/A
27	36,69	347298,295	N/A	N/A
28	37,16	318986,759	N/A	N/A
28	39,45	189215,298	N/A	N/A
29	37,09	372300,426	N/A	N/A
29	36,21	225208,182	N/A	N/A
30	35,46	426684,185	N/A	N/A
30	36,06	334603,314	N/A	N/A
31	39,31	187355,841	N/A	N/A
31	36,34	326075,364	N/A	N/A
32	35,83	295648,879	N/A	N/A
32	30,75	913955,408	N/A	N/A
33	38,44	240428,009	N/A	N/A
33	37,81	239522,256	N/A	N/A
34	37,96	148049,638	N/A	N/A
34	38,01	141693,197	N/A	N/A
LP36	36,47	207219,872	N/A	N/A
LP36	37,96	118897,392	N/A	N/A
LP36 1:5	43,76	163591,986	N/A	N/A
LP36 1:5	35,67	227307,345	N/A	N/A
LP37	38,72	82614,025	N/A	N/A
LP37	37,42	173127,435	N/A	N/A
LP37 1:5	34,97	247511,151	N/A	N/A
LP37 1:5	35,66	179540,681	N/A	N/A
Y63	35,44	289473,51	N/A	N/A
Y63	37,87	112634,638	N/A	N/A
Y64	Alle määrittämissärajien	2389,317	N/A	N/A
Y64	43,96	33747,848	N/A	N/A
Neg. ctrl	37,82	208962,053	N/A	N/A
Neg. ctrl	36,97	370702,697	N/A	N/A
Keskiarvo	37,07	261447,62	N/A	N/A

qPCR-ajojen tulostaulukot: Mitatut Cq-arvot, ΔRn -arvot ja niiden keskiarvot

Ajo 10				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
"Vanha" peptoni (neg.)	36,63	177308,376	N/A	N/A
"Vanha" peptoni (neg.)	33,04	743121,416	N/A	N/A
"Uusi" peptoni (neg.)	28,98	639430,505	N/A	N/A
"Uusi" peptoni (neg.)	37,04	378148,094	N/A	N/A
Tranoroo ("vanha" peptoni)	36,49	374953,655	24,26	156745,785
Tranoroo ("vanha" peptoni)	36,93	325797,552	25,12	96143,147
Tranoroo ("uusi" peptoni)	37,31	279283,599	25,44	93260,716
Tranoroo ("uusi" peptoni)	36,34	296597,455	24,93	119906,308
Keskiarvo	35,35	401830,08	24,94	116513,99

Ajo 11				
Näyte	Cq (IPC)	ΔRn (IPC)	Cq (SLM)	ΔRn (SLM)
Neg. ctrl	29,07	273057,019	N/A	N/A
Neg. ctrl	36,95	213621,373	N/A	N/A
Neg. ctrl	36,18	253509,042	N/A	N/A
Neg. ctrl	21,51	599873,585	N/A	N/A
Tranoroo	29,84	525256,716	24,17	327613,771
Tranoroo	35,27	261602,941	24,83	169357,585
Tranoroo 1:10	35,93	224841,749	27,66	123936,968
Tranoroo 1:10	37,08	202181,943	27,63	124388,383
Keskiarvo	32,73	319243,05	26,07	186324,18