

Työpaperi 26/2023

Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakteerien tunnistamiseen Suomen talousvedestä PCR-tekniikalla

Loppuraportti

Annastiina Rytönen, Anna-Maria Hokajärvi, Pia Räsänen, Anniina Sarekoski,
Jenni Ikonen, Eveliina Nurmi ja Tarja Pitkänen

Talousveden mikrobiologinen turvallisuus on perusedellytys yhteiskunnan ja yksilöiden normaalien toimintojen ylläpitämiseksi. Yhteiskunnan huoltovarmuus edellyttää juomakelpoisen veden saatavuutta, sillä saastunut talousvesi on tehokas infektioautien levittäjä. Talousveden mikrobiologinen turvallisuus on pystyttävä osoittamaan ja varmentamaan nopeasti ja luotettavasti. Hankkeen tavoitteena oli kehittää ongelmatilanteita varten pikamittausmenetelmä, jolla *E. coli* -bakteeri saadaan havaittua näytteestä viiden tunnin kuluessa siitä, kun näyte on saapunut laboratorioon, ja jalkauttaa tämä menetelmä paikallisiin testauslaboratorioihin.

Hankkeessa validoitiin *E. coli* -pikamittausmenetelmä, joka tunnisti *E. coli* -bakteerin hyväksyttävällä herkkyydellä ja spesifisyydellä talousvedestä ja analyysin läpimenoaika oli alle viisi tuntia. Tämän jälkeen valmisteltiin suomenkielinen menetelmäohje ja hankkeeseen osallistuneet laboratoriot perehdytettiin menetelmän vaiheisiin. Osallistuneet laboratoriot ottivat menetelmän käyttöön, ja se todettiin toimivaksi ja nopeaksi, mutta korkeiden kustannusten ja vaadittavan työajan vuoksi menetelmä ei päätynyt osaksi laboratorioden analyysivalikoimaa hankkeen yhteydessä. THL osallistui myös Euroopan komission yhteisen tutkimuskeskuksen (The Joint Research Centre, JRC) järjestämään eurooppalaiseen laboratorioden väliseen vertailututkimukseen, jonka tarkoituksena oli saada lisää kokemusta *E. coli* -pikamittausmenetelmästä.

Lukijalle

Molekyylibiologiset menetelmät, erityisesti polymeerasiketjureaktioon (polymerase chain reaction, PCR) perustuvat tekniikat, ovat tulleet viime vuosikymmenien aikana osaksi mikrobiologista erikoisanalytiikkaa tutkimuslaboratorioihin ja yliopistoihin. Vesimikrobiologisia valvontatutkimuksia tekevissä laboratorioissa on kuitenkin vain harvoin erikoisanalytiikkatarpeita, ja siksi tätä hanketta vuonna 2018 suunniteltaessa valtaosassa laboratorioita, jotka tekevät vesimikrobiologista analytiikkaa Suomessa, ei ollut käytössään PCR-tekniikoita.

Bakteeriviljelyyn perustuvat analyysimenetelmät ovat tarkkoja, herkkiä ja kustannuksiltaan kohtuullisia, mutta vaativat usein vähintään yön yli kestävän inkuboinnin, mikä hidastaa tulosten valmistumista. PCR-tekniikat eivät edellytä inkubaatioaikaa, ja tulos voi parhaassa tapauksessa valmistua jo näytteenottopäivänä. Tulosten valmistumisen nopeus voi olla tietyissä tilanteissa, kuten vesilaitoksilla putkirikkokorjausten jälkeen normaalitilaan palattaessa yksittäisen analyysin kustannuksia oleellisempi seikka.

Tämä hanke alkoi vuonna 2019 Vesihuoltolaitosten kehittämisrahaston ja hankkeeseen osallistuneiden vesilaitosten tukemana. Hankkeen osarahoittajina toimineet vesilaitokset olivat Helsingin seudun ympäristöpalvelut – kuntayhtymä HSY, Turun Seudun Vesi Oy, Oulun Vesi Oy, Kuopion Vesi, Joensuun Vesi, Kemmin Energia ja Vesi, Tampereen Vesi, Porvoon Vesi, Nokian Vesi, Aqua Palvelu Oy ja Hämeenlinnan Seudun Vesi Oy. Hanke tehtiin yhteistyössä sosiaali- ja terveysministeriön ja Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto Valviran kanssa. THL pystytti ensin *E. coli*-PCR-menetelmän omaan laboratorioonsa Kuopioon, ja kutsui sitten Suomen vesilaboratorioita osallistumaan menetelmän käyttöönottoon. Kutsuun vastasi alkuvaiheessa myöntävästi seitsemän laboratoriota, joista kolme joutui menetelmästä ja sen vaatimuksista lisätietoja saatuaan kuitenkin luopumaan menetelmän käyttöönotosta. Hankkeessa jatkaneet laboratoriot olivat sellaisia, joilla oli jo aiempaa kokemusta PCR-menetelmistä ja PCR-analytiikkaan soveltuvat tilat ja laitteet valmiina.

Tämän hankkeen valmistumista viivästytti merkittävästi toisena hankevuonna (2020) puhjennut COVID-19 pandemia. Hanke saatiin kuitenkin lopulta päätökseen, josta lämmin kiitos kaikille osallistujille ja rahoittajaorganisaatioille. PCR-tekniikoiden jalkauttaminen vesimikrobiologian laboratorioihin jatkuu. Kansainvälinen standardointiorganisaatio (International Organization for Standardization, ISO) valmistele parhaillaan menetelmästandardeja tukemaan PCR-menetelmien käyttöönottoa vesimikrobiologian laboratorioissa.

Tiivistelmä

Annastiina Rytönen, Anna-Maria Hokajärvi, Pia Räsänen, Anniina Sarekoski, Jenni Ikonen, Eveliina Nurmi, Tarja Pitkänen. Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakteerien tunnistamiseen Suomen talusvedestä PCR-tekniikalla. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL). Työpaperi 26/2023. 30 sivua. Helsinki 2023. ISBN 978-952-343-971-9 (verkkojulkaisu)

Hankkeessa otettiin Suomessa käyttöön hollantilaisen vesitutkimusinstituutin (KWR Water Research Institute) kehittämä *E. coli* -pikamittausmenetelmä. Menetelmä perustuu *E. coli* -bakteerin ribosomaalisen 16S RNA:n havaitsemiseen käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktiotekniikalla (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR). Menetelmän kohdentaminen RNA:han mahdollistaa kohdebakteerin elävyyden arvioinnin, sillä RNA hajoaa nopeasti bakteerisolun kuoltua. Menetelmän käyttöönoton yhteydessä vuonna 2019 Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) vesimikrobiologian laboratorioissa menetelmälle määritettiin havaitsemisraja, herkkyys, spesifisyys, toistettavuus ja virhelähteet. Käyttöönottovalidoinnin lopputuloksena todettiin, että menetelmä on toimiva ja se tunnistaa *E. coli* -bakteerin hyväksyttävällä herkkyydellä ja spesifisyydellä talusvesimatriisista. Analyysin läpimenoaika oli alle viisi tuntia.

Menetelmän käyttöönoton jälkeen hanke jatkui menetelmän jalkauttamisvaiheeseen. THL:ssä valmistettiin suomenkielinen menetelmäohje, rekrytoitiin hankkeeseen osallistuvat laboratoriot ja osallistuneille neljälle laboratorioille järjestettiin kaksi samansisältöistä perehdytyspäivää 5.11.2019 ja 6.11.2019. Perehdytyspäivien aikana käytiin läpi kaikki *E. coli*-PCR-menetelmän vaiheet vesinäytteenotosta tulosten tulkintaan saakka. Yksittäisiä työvaiheita olivat suuren tilavuuden näytteenotto, näytteiden tallentaminen, kontrollinäytteiden valmistus, RNA-eristys, komplementaarisen cDNA:n synteesi eristetystä RNA:sta, RT-PCR-ajo, tulosten laskenta ja tulkinta. Perehdytyspäivän jälkeen keväällä 2020 THL lähetti laboratorioille hankkeen kustannuksella tarvikepaketit menetelmän käyttöönottoa varten.

Osallistuvat laboratoriot ottivat menetelmän käyttöön omassa aikataulussaan vuosien 2020–2021 aikana. Käyttöönoton jälkeen laboratoriot analysoivat menetelmällä putkirikkoihin ja muihin veden laadun ongelmatilanteisiin liittyviä vesi- ja talusvesinäytteitä, jotka olivat sekä pullovesinäytteitä, että suuren tilavuuden näytteitä. Hanke tuotti runsaasti tietoa Suomen vesilaboratorioiden valmiudesta ottaa käyttöön erikoisanalytiikkaa ja myös vesilaitosten tarpeista ja näytteenoton realiteeteista putkirikkotilanteissa. Osallistuvista laboratorioista kolme sai menetelmän onnistuneesti pystytettyä ja näiltä laboratorioilta saatiin kokemuksia menetelmän käyttöönottoon liittyen. Vaikka menetelmä koettiin nopeaksi ja herkäksi, pohdintaa aiheuttivat korkeat kustannukset ja suuri työajan tarve, eikä menetelmä päätnyt välittömästi hankkeen yhteydessä osaksi laboratorioiden analyysivalikoimaa. Hanke osoitti selkeästi, että pelkkä putkirikkotilanteisiin varautuminen ei ollut riittävä innoke PCR-tekniikoiden käyttöönottamiseksi lainsäädännön mukaisia vesien valvontatutkimuksia tekevissä laboratorioissa. Hankkeen aikana saatiin vain rajallinen määrä kokemusta luonnollisista näytteistä. Suuren tilavuuden näytteenotto koettiin hankalaksi putkirikkotilanteiden yhteydessä, minkä vuoksi osa laboratorioista suoritti käyttöönoton pelkästään pullonäytteillä.

Menetelmän jalkauttamistoimenpiteiden jälkeen THL osallistui Euroopan komission yhteisen tutkimuskeskuksen (The Joint Research Centre, JRC) järjestämään laboratorioiden väliseen vertailututkimukseen, jonka tarkoituksena oli saada lisää kokemusta molekulaariin menetelmiin pohjautuvasta *E. coli* -pikamittausmenetelmästä. JRC toimitti keinotekoiset *E. coli* -bakteerilla kontaminoitunut talusvesinäytteet ja reagenssit. Testattava menetelmä oli muuten sama kuin hankkeen alkuvaiheissa käytetty menetelmä, mutta eristyskitti jouduttiin vaihtamaan, sillä alun perin käytetyn kitin saatavuus oli heikko. Vertailututkimuksessa *E. coli* -bakteerien pikamittausmenetelmä todettiin nopeaksi, mutta sen herkkyys jäi viljelymenetelmää heikomaksi.

Molekyylibiologisten menetelmien, kuten PCR-tekniikoiden kehittäminen osaksi vesimikrobiologista analyysivalikoimaa jatkuu. Sovellusalueita ovat esimerkiksi vesilaitosten käyttötarkkailu ja erikoistilanteiden analytiikkatarpeet, mutta myös uimavesien laadunvalvonta.

Avainsanat: *Escherichia coli*, pikamittausmenetelmä, RT-PCR, talusvesi

Sammandrag

Annastiina Rytkönen, Anna-Maria Hokajärvi, Pia Räsänen, Anniina Sarekoski, Jenni Ikonen, Eveliina Nurmi, Tarja Pitkänen. Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakterien tunnistamiseen Suomen talousvedestä PCR-tekniikalla. [Snabbtest för att identifiera livsdugliga *E. coli*-bakterier i hushållsvatten i Finland med PCR-teknik]. Institutet för hälsa och välfärd (THL). Diskussionsunderlag 26/2023. 30 sidor. Helsingfors 2023. ISBN 978-952-343-971-9 (nätpublikation)

I projektet infördes en metod för snabbmätning av *E. coli* i Finland som utvecklats av ett holländskt vattenforskningsinstitut (KWR Water Research Institute). Metoden bygger på att upptäcka den ribosomala RNA-strukturen 16S för *E. coli*-bakterien med hjälp av omvänt transkriptaspolymeraskedjereaktion (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR). Genom att rikta in metoden på RNA kan man bedöma vitaliteten hos målbakterien, eftersom RNA snabbt bryts ner när bakteriecellen har dött. I samband med att metoden infördes år 2019 vid laboratoriet för vattenmikrobiologi vid Institutet för hälsa och välfärd (THL) fastställdes en detekteringsgräns, känslighet, specificitet, repeterbarhet och felkällor för den. Efter valideringen vid införandet konstaterades det att metoden fungerar och identifierar *E. coli*-bakterien med godtagbar känslighet och specificitet i en hushållsvattenmatris. Analysens genomloppstid var mindre än fem timmar.

Efter att metoden införts fortsatte projektet till implementeringsfasen. Vid THL framställde man en metodanvisning på finska, rekryterade fyra laboratorier som skulle delta i projektet och ordnade två introduktionsdagar för laboratorierna med samma innehåll den 5 och den 6 november 2019. Under introduktionsdagarna gick man igenom alla faser i PCR-metoden för *E. coli*, från vattenprovtagning till tolkning av resultaten. De enskilda arbetsmomenten bestod av en provtagning av stora vattenvolymer, registrering av prover, framställning av kontrollprover, isolering av RNA, syntes av komplementärt cDNA ur isolerat RNA, RT-PCR-körning, beräkning och tolkning av resultaten. Efter introduktionsdagen våren 2020 skickade THL ut paket med utrustning till laboratorierna på projektets bekostnad.

De laboratorier som deltog införde metoden enligt sin egen tidtabell under 2020–2021. Efter införandet använde laboratorierna metoden för att analysera vatten- och hushållsvattenprover i samband med rörbrott och andra problem med vattenkvaliteten. De bestod både av flaskprov och provtagning av stora volymer. Projektet gav mycket information om beredskapen hos vattenlaboratorierna i Finland när det gäller att införa specialanalyser och även om vattenverkens behov och om realiteterna när det gäller provtagning i samband med rörbrott. Tre av de laboratorier som deltog lyckades med införandet av metoden och de delade med sig av sina erfarenheter. Även om man upplevde att metoden var snabb och känslig, reagerade man på de höga kostnaderna och den stora mängden arbetstid den tar i anspråk, och metoden blev inte omedelbart en del av laboratoriernas analysutbud i samband med projektet. Projektet visade tydligt att beredskap inför rörbrott inte räckte som incitament för att införa PCR-teknik vid laboratorier som utför lagstadgade kontrollundersökningar av vatten. Under projektet inkom endast en begränsad mängd erfarenheter av naturliga prover. Det upplevdes besvärligt med provtagning av stora volymer, vilket gjorde att en del laboratorier enbart använde sig av flaskprover.

När åtgärderna för att implementera metoden hade genomförts deltog THL i en jämförande undersökning som ordnades av EU-kommissionens gemensamma forskningscentrum (The Joint Research Centre, JRC), där syftet var att få mer erfarenheter av metoden för snabbmätning av *E. coli* som bygger på molekylära metoder. JRC tillhandahöll hushållsvattenprover och reagenser kontaminerade med konstgjorda *E. coli*-bakterier. Metoden som testades var i övrigt densamma som den som användes i början av projektet, men man tvingades byta ut isoleringskittet eftersom tillgången på det kitt som ursprungligen användes var dålig. I en jämförande undersökning konstaterade man att metoden för snabbmätning av *E. coli*-bakterier var snabb, men att den var mindre känslig än odling.

Utvecklingen av molekylbiologiska metoder, såsom PCR-tekniker, som en del av utbudet av mikrobiologiska vattenanalyser fortsätter. Tillämpningsområdena utgörs till exempel av vattenverkens driftskontroller och analysbehov i speciella situationer, men också kontroll av badvattenkvalitet.

Nyckelord: *Escherichia coli*, snabbmätning, RT-PCR, hushållsvatten

Abstract

Annastiina Rytönen, Anna-Maria Hokajärvi, Pia Räsänen, Anniina Sarekoski, Jenni Ikonen, Eveliina Nurmi, Tarja Pitkänen. Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakteerien tunnistamiseen Suomen talousvedestä PCR-tekniikalla. [Rapid test for identifying viable *E. coli* bacteria in household water in Finland using the PCR technique]. Finnish Institute for Health and Welfare (THL). Discussion Paper 26/2023. 30 pages. Helsinki, Finland 2023. ISBN 978-952-343-971-9 (online publication)

In this project, the use of an *E. coli* rapid test method developed by the Dutch KWR Water Research Institute was launched in Finland. The method is based on ribosomal 16S RNA detection with reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR. By targeting RNA, it is possible to evaluate the viability of the target bacteria, as RNA decays rapidly after cell death. When the method was introduced in 2019 a limit of detection, sensitivity, specificity, replicability, and the sources of error were determined at the Expert Microbiology Unit at the Finnish Institute for Health and Welfare (THL). The outcome of the validation was that the method is functional, and it identifies *E. coli* bacteria with acceptable sensitivity and specificity from the drinking water. The lead time for the analysis was less than five hours.

After validation of the method the project shifted to an implementation phase. Procedural instructions were drafted in Finnish at THL, four laboratories were selected as participants in the project, and two orientation days with identical content were arranged for the participating laboratories: 5th and 6th of November 2019. During the orientation days, all the phases of the *E. coli* PCR method were examined, from sampling to interpreting the results. Individual phases included large-volume sampling, sample storage, control sample preparation, RNA extraction, synthesising of complementary cDNA from extracted RNA, running RT-PCR, and calculating and interpreting the results. After the orientation days, THL sent accessory packages to the laboratories in the spring 2020 at the project's expense to help in the implementation of the method.

The participating laboratories took the method into practice during 2020-2021. The laboratories used the method to analyse drinking water samples linked with ruptured pipes and other water quality problem situations, including both small and large volume samples. The project yielded a lot of information on the readiness of Finnish water laboratories to implement special analysis, the needs of water utilities and the realities of sampling in pipe breakage situation. Three of the participating laboratories managed to set up the method successfully, and they shared experiences concerning the method. Although the method was considered fast and sensitive, the high costs and the large amount of time that it required caused concerns, leading the laboratories not to immediately include the method in their analysis selection. The project clearly showed that preparing for pipe breaks alone is not a sufficient incentive for the introduction of PCR techniques for water monitoring in legally mandated laboratories. In the project, only a limited amount of experience was gained with natural water samples. High-volume sampling was found to be difficult in situations that involved ruptured pipes, for which reason some of the laboratories carried out the process using bottle samples alone.

After the method was deployed, THL participated in a comparative study within European laboratories arranged by the European Commission's Joint Research Centre (JRC). The aim was to gain experience about quick measurement procedures for viable *E. coli* based on molecular methods. JRC supplied reagents and drinking water samples that were artificially contaminated with *E. coli* -bacteria. The method was similar to the one developed by the Dutch KWR Water Research Institute, except for the extraction kit due to problems with availability. In the comparative study the molecular-based testing method for viable *E. coli* bacteria was seen as fast, but its sensitivity proved to be weaker than the bacterial culture method.

The development of molecular biology methods, such as PCR techniques, as part of the analysis selection of water microbiology methods, continues. Areas for application include, for example, monitoring the operation of water utilities and the need for analytics in special situations, as well as the monitoring of the water quality of bathing water.

Keywords: *Escherichia coli*, rapid testing method, RT-PCR, drinking water

Sisällys

Lukijalle.....	2
Tiivistelmä.....	3
Sammandrag.....	4
Abstract.....	5
Sisällys.....	6
1. Tausta.....	7
2. Menetelmän validointi.....	8
2.1 Validoitava menetelmä.....	8
2.2 Työn toteutus.....	9
2.2.1 Reagenssien toimivuus ja RT-PCR olosuhdetesti.....	9
2.2.2 Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesti.....	10
2.2.3 Suuren tilavuuden näytteenoton (DEUF) testaaminen.....	10
2.2.4 Muut testit.....	11
3. Validoinnin tulokset ja tulosten tarkastelu.....	12
3.1 Reagenssien toimivuus ja RT-PCR olosuhdetesti.....	12
3.2 Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesti.....	14
3.3 Suuren tilavuuden näytteenoton (DEUF) testaaminen.....	17
3.4 Muut testit.....	18
4. Menetelmän jalkauttaminen.....	23
4.1 Jalkauttamisen toteutus.....	23
4.2 Jalkauttamisen tulokset.....	24
5. Eurooppalainen vertailututkimus.....	26
6. Johtopäätökset.....	28
Lähteet.....	30

1. Tausta

Talousveden mikrobiologinen turvallisuus on perusedellytys yhteiskunnan ja yksilöiden normaalien toimintojen ylläpitämiseksi (WHO, 2017). Yhteiskunnan huoltovarmuus edellyttää juomakelpoisen veden saatavuutta, sillä saastunut juomavesi on tehokas infektioautautien levittäjä. Talousveden saastumisella voi olla akuutit terveysvaikutukset vesivälitteisen epidemian muodossa (Hrudey ja Hrudey, 2007). Talousveden raakavedet, vesilaitokset ja vedenjakeluverkostot edustavat kriittistä infrastruktuuria, joiden huoltovarmuus tulee turvata. Ilmaston muuttuessa on arvioitu, että myös sään ääreisilmiöt voimistuvat ja asettavat siten uusia uhkia talousveden turvallisuudelle (Meriläinen ym., 2019).

Talousveden mikrobiologinen turvallisuus on pystyttävä osoittamaan ja varmentamaan nopeasti ja luotettavasti. Nykyään talousveden laadun arviointiin käytetään bakteeri-indikaattoreita *Escherichia coli* ja suolistoperäiset enterokokit, joista etenkin *E. coli* -bakteeri on käytettävissä olevan tieteellisen tiedon perusteella paras ja käyttökelpoisin tunnetuista suolistoperäisen saastumisen osoittajista (Tallon ym., 2005). *E. coli* -bakteerin esiintymistä vesinäytteistä tutkitaan nykyään viljelymenetelmillä laboratorioissa (Rompre ym., 2002). Yleisesti käytössä olevilla viljelymenetelmillä varmistetun tuloksen saaminen kestää 2–3 työpäivää, eli 48–72 tuntia (SFS 3016:2011, SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017) ja nopeimmillakin laboratoriokäytössä olevilla menetelmillä *E. coli* -analyysitulokset saadaan aikaisintaan vasta 18 tunnin kuluttua näytteen saamisesta laboratorioon (Pitkänen ym., 2009a). Talousvettä tutkittaessa on oleellista, että jo hyvin pieni määrä suolistomikrobeja pystytään havaitsemaan, mikä edellyttää vesinäytteiden konsentroimista suurien näytetilavuuksien tutkimiseksi (Hargy ym., 2010; Hijnen ym., 2000).

Monet bakteerit, mukaan lukien *E. coli*, menettävät viljeltävyytensä helposti jo pienten desinfiointiainepitoisuuksien läsnä ollessa tai ympäristöolosuhteiden kuten auringon valon vaikutuksesta (Theron ja Cloete, 2004). Tämä ei kuitenkaan tarkoita, etteivät nämä bakteerit voisi olla elinkykyisiä ja mahdollisesti infektiivisiä. Ratkaisu ei-viljelykelpoisten bakteerisolujen elävyyden selvittämiseen löytyy uusista, molekyylibiologiaan ja RNA:n tunnistamiseen perustuvista PCR-menetelmistä, joiden avulla pystytään parhaimmillaan jopa erottelemaan kuolleet bakteerisolut elävistä soluista (Pitkänen ym., 2013). RNA-tekniikoiden käyttösovellukset tulevat olemaan merkittävä edistysaskel molekyylibiologisten bakteerien havaitsemismenetelmien hyödyntämisessä mikrobiologisissa tutkimuksissa, sillä tähän saakka PCR-menetelmien käyttöönottoa bakteriologiassa on rajoittanut se, että PCR-tekniikoilla ei ole saatu tietoa bakteerisolujen elävyydestä (Nielsen ym., 2007, Pitkänen ym., 2013).

2. Menetelmän validointi

Hankkeessa kehitettiin talousvesien mikrobiologisen turvallisuuden testaamiseen soveltuva nopea RT-PCR-menetelmä *E. coli* -bakteerin ribosomaalisen 16S rRNA:n (16S rRNA) tunnistamiseksi vesinäytteestä. KWR Watercycle Research Institututen (KWR, 2018) kehittämä RT-PCR-menetelmä *E. coli* -bakteerin 16S rRNA:n tunnistamiseksi vesinäytteestä perustuu Huijsdens ym., 2002 julkaisemiin alukesekvensseihin, joilla *E. coli* -bakteerin 16S rRNA voidaan tunnistaa. Menetelmää testattiin kahdessa eri mittakaavassa: 100–1000 ml:n tilavuudessa (näytteenotto pulloihin) ja suuren tilavuuden (100–200 L) näytteenotolla (DEUF, Dead End Ultrafiltration) (Smith & Hill, 2009, Mull & Hill, 2012). Tavoitteena oli, että analyysitulokset elinkykyisten *E. coli* -bakteerien esiintymisestä näytteessä olisi saatavissa noin viiden tunnin kuluttua näytteen saapumisesta tutkivaan laboratorioon.

2.1 Validoitava menetelmä

E. coli -bakteerin tunnistamiseen tarkoitetun pikamenetelmän pystyttämiseen käytettiin KWR Watercycle Research Institututen (KWR, 2018) julkaisemaa vaihtoehtoista talousveden saastumisen tunnistusmenetelmää. Työn tarkoituksena oli *E. coli* -bakteerin havaitsemisen nopeuttaminen talousvesinäytteistä verrattuna standardoituun *E. coli* -bakteerin viljelymenetelmiin. Tässä työssä validoitu pikamenetelmä perustuu *E. coli* -bakteerin 16S rRNA:n havaitsemiseen käänteiskopioinnilla ja polymeerasiketjureaktiolla (RT-PCR), mikä mahdollistaa bakteerin elävyyden arvioinnin RNA:n hajotessa nopeasti solun kuoltua. Työssä käytettiin referenssimenetelmänä standardin SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 mukaista menetelmää, jossa bakteerisolut suodatettiin vesinäytteestä 0,45 µm:n suodattimelle (GN-6 Metrical®, PALL Corporation, Yhdysvallat) ja kasvatettiin Chromocult-alustalla (CC) *E. coli* -bakteerin tunnistamiseksi. Menetelmä perustuu β-glukuronidaasientsyymin läsnäoloon *E. coli* -bakteerin soluissa, mikä saa ne kasvamaan CC-maljalla tumman sinisinä tai violetteina pesäkkeinä.

Referenssimenetelmänä käytetyn viljelyanalyysin lisäksi *E. coli* -pikamittausmenetelmän sisältämiä nukleiinihappojen eristysmenetelmiä ja RT-PCR-menetelmiä verrattiin THL:n Vesimikrobiologian laboratoriossa aiemmin käytettyihin eristys- ja RT-PCR-menetelmiin. Nämä menetelmät on aiemmissa tutkimuksissa todettu luotettaviksi tavoiksi arvioida erilaisten bakteerien esiintymistä vesistöissä (Pitkänen ym., 2013, Rytkönen ym., 2021).

Tässä työssä validoitu *E. coli* -pikamittausmenetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

1. Näytteen käsittely: suodatus 0,4 µm polykarbonaattisuodattimelle (PC) ja RNA-eristys NucliSens-eristyskitillä. Eristys voidaan tehdä myös ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep -kitillä (Zymo Research, Yhdysvallat).
2. Menetelmässä käytettävät kontrollit: negatiivinen prosessikontrolli, negatiivinen eristyskontrolli, NTC-kontrolli (No Template Control), positiivinen prosessikontrolli ja inhibitiokontrolli.
3. RT-PCR: näytteet analysoidaan RT-PCR:llä kahtena rinnakkaisena. Ensimmäisessä vaiheessa RNA käännetään käänteiskopiointireaktiossa cDNA-molekyyliseksi (RT, reverse transcriptase; cDNA, complementary DNA), joka monistetaan PCR-reaktiossa. Monistumista seurataan reaaliaikaisella PCR-laitteella, joka havaitsee monistumisen ja laskee, montako sykliä kunkin näytteen kohde-RNA:n monistuminen vie. Tämän perusteella laite antaa kullekin näytteelle Ct-arvon (cycle threshold), jonka perusteella *E. coli* -bakteerin läsnäoloa voidaan arvioida näytteessä.
4. Tulosten tulkinta: koska monet RT-PCR-reagensseissa käytettävät entsyymit tuotetaan *E. coli* -bakteerin soluissa, reagensseissa on usein jäänteitä näistä soluista ja RT-PCR-reaktiossa nähtävissä taustaa myös negatiivisista näytteistä. Tästä syystä menetelmän tuloksia tulkitaan vertaamalla positiivisten ja negatiivisten näytteiden Ct-arvojen erotusta.

E. coli -pikamittausmenetelmän vaiheet, sekä käytetyt reagenssit ja tarvikkeet on esitetty tarkemmin jäljempänä, sekä Liitteissä 1 ja 2.

2.2 Työn toteutus

Tässä validoinnissa verrattiin rinnakkain *E. coli* -pikamittausmenetelmänä KWR:n aiemmin validoimaa RNA-eristysmenetelmää, sekä kahta RT-PCR-menetelmää THL:n Vesimikrobiologian laboratorioissa käytössä aiemmin olleisiin RNA-eristys- ja RT-PCR-menetelmiin. Lisäksi *E. coli* -pikamittausmenetelmän antamia tuloksia ja analyysiaikaa verrattiin viljelymenetelmään. Työssä myös kerättiin kokemuksia pikamittausmenetelmään parhaiten soveltuvasta näytteenottomenetelmästä testaamalla menetelmää tavanomaisessa 100–1000 ml:n vesitilavuudessa (pullonäytteenotto) ja suuren tilavuuden (100–200 L) DEUF-näytetilavuudessa. Validoinnissa vertailtiin soveltuvilta osin näytteenoton ja reagenssien toimivuutta ja RT-PCR olosuhteita, ja PCR-testin inklusiivisuutta, eksklusiivisuutta, herkkyyttä, sekä havaitsemisrajaa.

Validointi suoritettiin kahdelle KWR:n aiemmin validoimalle RT-PCR-kitille, HawkZ05 Fast One-step RT-PCR -kitille (Roche, Sveitsi), sekä SensiFast cDNA Synthesis -kitille ja SensiFast Probe LoROX -kitille (Bioline, Yhdysvallat). Validoinnissa painotettiin menetelmän nopeutta ja helppokäyttöisyyttä, jolloin pääasiallisesti testattiin yksivaiheisen HawkZ05-kitin toimivuutta. SensiFast-kiteille tehty validointi oli huomattavasti suppeampi.

2.2.1 Reagenssien toimivuus ja RT-PCR olosuhdetesti

Validoinnin aluksi testattiin RT-PCR-reagenssien, PCR-menetelmässä käytettävien alukkeiden ja koettimien sekä NucliSens-eristyskitin toimivuus ja soveltuvuus THL:n Vesimikrobiologian laboratorion käyttöön. Myös NucliSens-eristyskitin soveltuvuus puoliautomaattiselle KingFisher mL -eristysrobotille (KF) (Thermo Scientific, Yhdysvallat) testattiin vertaamalla sitä manuaaliseen eristykseen magneettitelineellä. NucliSens-eristyskitin testaukset tehtiin käyttäen näyttemateriaalina *E. coli* WDCM00012 solupellettiä ja 0,4 µm PC-suodattimelle konsentroitua *E. coli* WDCM00012-kannalla terästettyä steriiliä vettä. Validoinnissa verratut PCR-menetelmät, RT-PCR-kitit ja nukleiinihappojen eristysmenetelmät on esitetty taulukossa 1. HawkZ05-kitille testatut reaktioseosten koostumukset ja ajo-olosuhteet, sekä SensiFast-kiteille testatut reaktioseosten koostumukset ja ajo-olosuhteet on esitetty liitteessä 3. RT-PCR analyysit tehtiin QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR -laitteella (Applied Biosystems, Yhdysvallat). Tuloksia verrattiin referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin.

Taulukko 1. Validoinnissa käytetyt reagenssit.

PCR-menetelmän alukesetti	Valmistaja/viite	Testi
<i>E. coli</i> Assay	Huijsdens ym. 2002 KWR 2018 Roche Molecular Systems, 2012	dsDNA-standardisekvenssin (gBlocks) laimennossarja ja NTC-kontrollit, amplifikaatiolämpötila
Ref. EC23S875	Chern ym. 2011	dsDNA-standardisekvenssin (gBlocks) laimennossarja ja NTC-kontrollit
RT-PCR-kitit	Valmistaja/viite	Testi
Roche HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit	KWR 2018 Roche Molecular Systems, 2012	dsDNA-standardisekvenssin (gBlocks) laimennossarja ja NTC-kontrollit, amplifikaatiolämpötila
SensiFast cDNA Synthesis Kit ja SensiFastProbe LoROX Kit	Bioline PI-50476 V7 Bioline PI-50202 V9	dsDNA-standardisekvenssin (gBlocks) laimennossarja ja NTC-kontrollit
Ref. IV VILO cDNA Synthesis Kit ja Environmental MasterMix 2.0	Rytkönen ym. 2021	dsDNA-standardisekvenssin (gBlocks) laimennossarja ja NTC-kontrollit
Nukleiinihappojen eristyskitit	Valmistaja/viite	Testi
NucliSens	KWR 2018	<i>E. coli</i> WDCM000012 pelletti vs. suodatin, 50 pmy vs. 5 000 pmy
Ref. Chemagic DNA Plant Kit	Rytkönen ym. 2021	<i>E. coli</i> WDCM000012 pelletti vs. suodatin, 50 pmy vs. 5 000 pmy

Validoinnissa käytetyt reagenssit ja niille tehdyt toimituustestit. Validoitavalla menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin (Ref.). Pmy = pesäketä muodostava yksikkö.

2.2.2 Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesti

Inklusiivisuus ja eksklusiivisuus ovat PCR-menetelmälle tärkeitä ominaisuuksia. Inklusiivisuudella, eli sensitiivisyydellä tai herkkyydellä voidaan toteamisrajan alhaisuuden lisäksi tarkoittaa myös sitä, että menetelmä havaitsee tarkasti kaikki kohdemikrobinsa, tässä tapauksessa esimerkiksi mahdollisimman monta erilaista *E. coli* -kanta. Tällöin väärin negatiivisten tulosten riski on mahdollisimman pieni. Eksklusiivisuudella, eli spesifisyydellä tarkoitetaan PCR-menetelmän kykyä erottaa kohdemikrobin perimä muusta näytteessä esiintyvistä perimäaineksesta. Kun analysoidaan näytteitä vesijohtoverkostosta, on erityisen tärkeää, ettei menetelmä anna väärää positiivisia tuloksia esimerkiksi yleisesti vesistöissä ja vesijohtoverkostoissa esiintyvien ainesosien tähden.

RT-PCR-menetelmän kykyä erottaa kohdeorganismi muista mikrobeista ja kykyä tunnistaa kohdeorganismien edustajia laajasti testattiin analysoimalla *E. coli* -bakteerin tyyppi- ja ympäristökantoja sekä muiden vesiympäristöissä esiintyvien bakteerilajien tyyppi- ja ympäristökantoja. Testissä analysoidut bakteerikannat ovat esitetty liitteessä 4. Bakteerikannoista eristettiin RNA NucliSens-eristyskitillä ja RT-PCR-analyysi (*E. coli* Assay) tehtiin HawkZ05-kitillä. Referenssimenetelmänä eristetty RNA analysoitiin IV VILO cDNA -synteesikitillä ja RT-PCR analyysi (EC23S875) tehtiin Environmental Master Mix 2.0 -PCR-kitillä (EMM). Lisäksi kaikki bakteerikannat tutkittiin viljelemällä ne CC-alustalle.

2.2.3 Suuren tilavuuden näytteenoton (DEUF) testaaminen

Putkirikkotilanteessa vesijohtoverkoston suureen vesimäärään voi päästä suhteessa hyvin pieni määrä maaperän bakteereja, pintavesiä tai jätevettä. Tällöin tavalliseen näytteenottoon käytettävästä 100–1000 ml näyte-tilavuudesta ei välttämättä ole mahdollista havaita luotettavasti verkoston saastumista. Suuren tilavuuden näytteenotolla eli ns. DEUF-tekniikalla on mahdollista konsentroida satoja litroja verkostovettä jatkoanalyysijä varten. Konsentroitavan vesimäärän kasvaessa kerättävän yksittäisen näytteen edustavuus paranee. Tehokkaat konsentroititeknikat vaativat kuitenkin erikoisvälineistön ja voivat konsentroida RT-PCR-menetelmän kohteen lisäksi myös epäpuhtauksia, kuten PCR-reaktioita häiritseviä inhibiittoreita.

DEUF-konsentroititekniiikan yhteensopivuutta *E. coli* -pikamittausmenetelmän kanssa testattiin valmis-tetuista ja PC-suodattimen sijaan Millipore Express plus -suodattimelle (47 mm, 0,22 µm, Merck, Saksa) tallennetuista DEUF-eluaateista eristämällä RNA NucliSens-eristyksellä ja analysoimalla se *E. coli* Assay PCR-menetelmällä käyttäen HawkZ05-RT-PCR-reagensseja.

Näyttemateriaalina käytettiin sekä talousvettä että talousvettä, johon oli lisätty tunnettua mikrobikantojen seosta tai jätevettä. Mikrobikantojen seos sisälsi bakteereja, viruksia ja alkueläimiä.

2.2.4 Muut testit

Putkirikkotilanteissa näytteet sisältävät usein erilaisia epäpuhtauksia, joilla voi olla vaikutusta mikrobiana-lyysien eri vaiheisiin. Tällaisten tekijöiden vaikutusta analyysituloksiin selvitettiin simuloituilla putkirikko-näytteillä. Testeissä pyrittiin selvittämään, millaisia vaikutuksia näytteenottomenetelmällä (konsentroidun pullonäyte vs. DEUF-konsentroidu näyte), DEUF-eluintiliuoksen autoklavoinnilla, jatkokonsentroidimene-telmällä (eri suodatinmateriaalit) ja vesijohtoverkostojen desinfioinnissa käytettävällä klooridesinfioinnilla on *E. coli* -pikamittausmenetelmän antamiin tuloksiin. Klooridesinfiointi oli erityisen tarkastelun kohteena, sillä on mahdollista, että *E. coli* -solujen RNA saattaa säilyä vedessä saastumistapahtuman jälkeen havaitta- vissa, vaikka desinfiointi olisi jo tappanut nämä solut.

Näytteenottomenetelmän vaikutusta testattiin vertaamalla eri menetelmillä ja suodattimilla konsentroituja näytteitä toisiinsa silloin, kun suodattimilla oli laskennallisesti sama määrä mikrobeja eri menetelmillä. DEUF-patruunoille konsentroidtiin 10 l joko puhdasta talousvettä tai talousvettä, johon oli lisätty joko tunnet- tua mikrobikantojen seosta tai jätevettä. DEUF-patruunat eluoiitiin 500 ml:lla eluintiliuosta, joka jatkokon- sentroidtiin PC- ja Express-suodattimille. Kontaminoidusta talousvedestä otettiin lisäksi pullonäytteet, jotka konsentroidtiin PC- ja Express-suodattimille.

DEUF-patruunan eluintiliuoksen steriloinnin vaikutusta testattiin analysoimalla rinnakain kaksi muutoin samalla tavalla käsiteltyä DEUF-konsentroidtua näytettä, joista toiselle käytettiin autoklavoimalla steriloitua ja toiselle tuoretta steriloidun eluintiliuosta.

Kloorin vaikutusta *E. coli* -bakteerin havaitsemiseen tässä työssä validoitavalla pikamenetelmällä vesi- johtoverkostosta testattiin lisäämällä *E. coli* -bakteeria sisältäviin verkostovesinäytteisiin tyypillinen ylläpi- toklooripitoisuus natriumhypokloriittia (0,3 mg/l), jonka annettiin vaikuttaa joko 5 min tai 15 min ennen reaktion päättämistä natriumtiosulfaatilla (18 mg/l näytettä).

3. Validoinnin tulokset ja tulosten tarkastelu

3.1 Reagenssien toimivuus ja RT-PCR olosuhdetesti

Validoinnin ensimmäisessä vaiheessa testattiin KWR:n menetelmän mukaiset RT-PCR-kitit HawkZ05 Fast One-step RT-PCR -kitti (Roche) ja *E. coli* Assay -analyysi. Alukkeiden ja RT-PCR-reagenssien toimivuuksien tulokset on esitetty taulukossa 2. PCR:n laatuarvot R^2 ja tehokkuus (Eff%) poikkeisivat hieman hyvistä arvoista ($R^2 \geq 0,99$, Eff% 80–110 %) HawkZ05-kittiä käytettäessä sekä validoitavalla *E. coli* Assay -analyysillä, että referenssianalyysillä EC23S857 (Bustin ym. 2009). Kaikilla testatuilla reaktioseoksen koostumuksella ja ajo-olosuhteilla kvantitointiraja oli alhainen (10 GC/ μ l), mikä ennustaa menetelmälle hyvää herkyyttä näytteiden analyysissä. *E. coli* -solujen jäämiä voi esiintyä PCR-reagensseista niiden tuotantotavasta johtuen ja HawkZ05-kitti antoikin jonkin verran taustaa NTC-kontrolleista sekä validoitavalla *E. coli* Assay -analyysillä, että referenssianalyysillä EC23S857. Referenssi-PCR-kittiä käytettäessä taustaa ei esiintynyt ja laatuarvot olivat selvästi paremmat. Tämän perusteella korkeat tehokkuudet ja matalat R^2 -arvot johtunevat reagenssien antamasta taustasta. Koska RT-PCR-reaktioseoksen koostumuksella tai PCR-ajo-olosuhteella ei ollut merkittävää vaikutusta laatuarvoihin, valittiin jatkoon 18 μ l reaktioseos ja 61°C ajo-olosuhde (KWR 2018).

Taulukko 2: Alukkeiden ja RT-PCR-reagenssien toimivuus

Analyysi	Reaktioseos	Ajo-olosuhde	LOQ	R^2	Eff%
<i>E. coli</i> Assay	18 μ l	61°C	20	0,953	108,3
	20 μ l	61°C	20	0,972	101,7
	18 μ l	60°C	20	0,985	105,4
	20 μ l	60°C	20	0,988	109,3
<i>E. coli</i> Assay: referenssireagenssit	Rytkönen ym. 2021		20	0,999	93,7
EC23S857	18 μ l	61°C	20	0,962	126,3
	20 μ l	61°C	20	0,974	114,7
	18 μ l	60°C	20	0,978	107,8
	20 μ l	60°C	20	0,982	109,3
EC23S857: referenssireagenssit	Rytkönen ym. 2021		20	0,998	98,7

E. coli Assay -analyysin toimivuus testattiin käyttäen kahta reaktioseoksen koostumusta ja kahta PCR-ajo-olosuhdetta. Lisäksi samat kokeet tehtiin käyttäen referenssimenetelmiä: analyysiä EC23S857 ja julkaisun Rytkönen ym. 2021 mukaisia reaktioseosta ja PCR-olosuhteita. LOQ = matalin monistunut kvantitatiivisen standardisuoran piste geenikopiona mikrolitraa kohden. R^2 = standardisuoran lineaarisuus. Eff% = PCR-ajon monistumistehokkuus.

NucliSens-eristykseen toimivuus testattiin käyttäen näytemateriaaleina *E. coli* -solupellettiä ja PC-suodatimelle konsentroitua *E. coli* -kannalla kontaminoitua vettä kahdella eri lukumäärätasolla, 50 ja 5000 pmy. Lisäksi eristys tehtiin referenssimenetelmällä käyttäen Chemagic DNA Plant -kittiä (Taulukko 1). Näytteet analysoitiin käyttäen HawkZ05-RT-PCR-kittiä ja *E. coli* Assay -analyysiä, sekä referenssimenetelmällä käyttäen IV VILO cDNA -synteesikittiä ja EMM-PCR-kittiä, sekä EC23S857-analyysiä. NucliSens-eristystä käytettäessä kaikki *E. coli* -bakteeria sisältäneet näytteet havaittiin positiivisiksi sekä validoitavalla että referenssimenetelmänä käytetyillä EMM-PCR-kitillä ja EC23S857-analyysillä (Taulukko 3). Kun eristys tehtiin referenssimenetelmällä käyttäen Chemagic DNA Plant -kittiä, jotkin 50 pmy *E. coli* -bakteeria sisältäneet näytteet jäivät negatiivisiksi, kun ne analysoitiin EMM-PCR-kitillä ja EC23S857-analyysillä. Kokeen perusteella Chemagic DNA Plant -kitti todettiin NucliSens-eristystä huomattavasti soveltuvaksi pienten *E. coli* -määrien eristämiseen, eikä sitä käytetty myöhemmissä testeissä. IV VILO cDNA-synteesikittiä käytettäessä

taustasignaali PCR-reaktiossa oli lisäksi merkittävä (tuloksia ei ole esitetty), mikä voi aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia bakteerilukumäärien ollessa pieniä.

Taulukko 3. NucliSens-eristystesti KF-eristysautomaatilla

NucliSens-eristys					
Näyte	HawkZ05-RT-PCR	Referenssi RT-PCR: IV VILO ja EMM			
	<i>E. coli</i> Assay	<i>E. coli</i> Assay DNA	<i>E. coli</i> Assay cDNA	EC23S857 DNA	EC23S857 cDNA
<i>E. coli</i> PC-suodatin 5 000 pmy	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> PC-suodatin 50 pmy	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 5 000 pmy	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 50 pmy	P	P	P	P	P
Referenssieristys: Chemagic DNA Plant -kitti					
Näyte	<i>E. coli</i> Assay	<i>E. coli</i> Assay DNA	<i>E. coli</i> Assay cDNA	EC23S857 DNA	EC23S857 cDNA
	<i>E. coli</i> PC-suodatin 5 000 pmy	P	P	P	P
<i>E. coli</i> PC-suodatin 50 pmy	P	A	P	A	A
<i>E. coli</i> solupelletti 5 000 pmy	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 50 pmy	P	P	P	A	A

NucliSens-eristyksen toimivuus testattiin käyttäen näytemateriaaleina *E. coli* -solupellettiä ja PC-suodattimelle konsentroitua *E. coli* -kannalla kontaminoitua vettä kahdella eri lukumäärätasolla. Lisäksi eristys tehtiin referenssinä Chemagic DNA Plant -kitillä. Näytteet analysoitiin käyttäen HawkZ05-RT-PCR-kittiä ja *E. coli* Assay -analyysiä, sekä referenssinä IV VILO cDNA-synteetikittiä ja EMM-PCR-kittiä, sekä EC23S857-analyysiä. pmy = pesäkkeen muodostava yksikkö. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

Kaikissa tutkivissa laboratorioissa ei välttämättä ole käytössään puoliautomoitua laitteistoa kuten THL:n käyttämä KF-laite nuleiinihappojen eristämiseen, mistä syystä testattiin NucliSens-eristyskitin käytettävyys magneettitelineen avulla ilman eristyslaitetta. Manuaalisessa eristyksessä käytettiin näytemateriaalina *E. coli* -solupellettiä, sekä PC-suodattimelle konsentroitua *E. coli* -kannalla kontaminoitua vettä kahdella eri lukumäärätasolla, 50 ja 5000 pmy. Näytteet analysoitiin käyttäen HawkZ05-RT-PCR-kittiä, SensiFast-cDNA-synteetikittiä ja SensiFast-PCR-kittiä ja *E. coli* Assay -analyysiä, sekä referenssinä IV VILO cDNA-synteetikittiä ja EMM-PCR-kittiä, sekä EC23S857-analyysiä. Manuaalisesti eristetyt näytteet analysoitiin paitsi HawkZ05-kitillä, myös SensiFast-PCR-kitillä käyttäen SensiFast-cDNA-synteetikittiä cDNA-synteesiin. Nukleiinihappojen manuaalinen eristys toimi puoliautomoitun eristykseen verrattuna yhtä hyvin, joten KF-laite on tarvittaessa korvattavissa manuaalisella eristyksellä magneettitelineitä käyttäen. Myös RT-PCR-tulosten perusteella manuaalinen eristys on toimiva vaihtoehto eristysrobotille: kaikki *E. coli* -bakteeria sisältäneet näytteet havaittiin positiivisiksi sekä validoitavilla, että referenssimenetelmällä (Taulukko 4). SensiFast-RT-PCR-menetelmän laatuarvot olivat tässä testissä hyvät (LOQ = 10 GC/μl; R² = 0,992; ja Eff% = 95,998 threshold-arvolla 0,07), eikä negatiivikontrolleissa havaittu monistumista. Validointia jatkettiin kuitenkin pääasiassa yksivaiheisella HawkZ05-kitillä, sillä yksivaiheinen RT-PCR-menetelmä sisältää vähemmän työvaiheita ja näin ollen lyhentää menetelmän läpimenoaika.

Taulukko 4. Manuaalinen NucliSens-eristystesti

Näyte	SensiFast RT-PCR		HawkZ05 RT-PCR
	<i>E. coli</i> Assay		<i>E. coli</i> Assay
<i>E. coli</i> PC-suodatin 5 000 pmy	P		P
<i>E. coli</i> PC-suodatin 50 pmy	P		P
<i>E. coli</i> solupelletti 5 000 pmy	P		P
<i>E. coli</i> solupelletti 50 pmy	P		P
Referenssi RT-PCR: IV VILO ja EMM			
	DNA	IV VILO cDNA	SensiFast cDNA
	EC23S857	EC23S857	EC23S857
<i>E. coli</i> PC-suodatin 5 000 pmy	P	P	P
<i>E. coli</i> PC-suodatin 50 pmy	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 5 000 pmy	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 50 pmy	P	P	P
	<i>E. coli</i> Assay	<i>E. coli</i> Assay	<i>E. coli</i> Assay
<i>E. coli</i> PC-suodatin 5 000 pmy	P	P	P
<i>E. coli</i> PC-suodatin 50 pmy	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 5 000 pmy	P	P	P
<i>E. coli</i> solupelletti 50 pmy	P	P	P

NucliSens-eristyksen soveltuvuus manuaaliselle eristykselle testattiin käyttäen näytemateriaaleina *E. coli* -solupellettiä ja PC-suodattimelle konsentroitua *E. coli* -kannalla kontaminoitua vettä kahdella eri lukumäärätasolla. Näytteet analysoitiin käyttäen HawkZ05-RT-PCR-kittiä, sekä SensiFast cDNA-synteetikittiä ja SensiFast-PCR-kittiä, ja *E. coli* Assay -analyysiä. Referenssinä näytteet analysoitiin käyttäen IV VILO cDNA-synteetikittiä ja EMM-PCR-kittiä, sekä EC23S857-analyysiä. pmy = pesäkkeen muodostava yksikkö. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

3.2 Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesti

Validoinnin toisessa vaiheessa määritettiin menetelmän herkkyys ja spesifisyys inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustestin avulla. Inklusiivisuustestin tulokset on esitetty taulukossa 5. Tässä testissä validoitava menetelmä ei antanut analysoiduista *E. coli* -bakteerin referenssi- tai ympäristökannoista yhtään väärää negatiivista tulosta. Sen sijaan referenssimenetelmänä käytetty IV VILO cDNA -synteesi ja EMM-reaktioseos näyttäisivät vaikuttavan *E. coli* Assay -analyysin herkkyyteen negatiivisesti. Yleensä menetelmän herkkyys kasvaa, kun templaattina käytetään cDNA:ta DNA:n sijaan (Pitkänen ym. 2013, Rytönen ym. 2021), mutta tässä tapauksessa väärää negatiivisia tuloksia oli enemmän cDNA-templaattia analysoitaessa. Tähän voi vaikuttaa IV VILO -reagenssin antama korkea tausta, joka ”peittää” heikosti positiivisen tuloksen.

Eksklusiivisuustestin tulokset on esitetty taulukoissa 6 ja 7. Tulosten perusteella validoitava menetelmä on spesifinen *E. coli* -bakteerille, eikä anna väärää positiivisia tuloksia koliformisten tai muiden bakteerien referenssi- ja ympäristökannoista. Tässä testissä validoitava menetelmä ei antanut yhtään väärää positiivista tulosta. Sen sijaan referenssimenetelmänä käytetty EC23S857-analyysi havaitsi positiiviseksi yli puolet analysoiduista koliformikannoista ja yhden *Salmonella*-bakteerin ympäristökannan, kun käytettiin HawkZ05-RT-PCR-kittiä. EC23S857-analyysin spesifisyys *E. coli* -bakteerille on siis heikompi, kuin *E. coli* Assay-analyysin.

RT-PCR-analyysin lisäksi kaikki bakteerikannat tutkittiin viljelymenetelmällä. CC-alustalle viljeltyinä kaikki *E. coli* -kannat ja *Shigella sonnei* -kanta kasvoivat tumman sinisinä pesäkkeinä ja tunnistettiin *E. coli* -bakteereiksi. Eksklusiivisuustestin kannat tunnistettiin viljelymenetelmällä oikein, eli ne eivät olleet viljelymenetelmänkään perusteella *E. coli* -bakteereita.

Inklusiivisuus ja eksklusiivisuustestin sekä aiempien testien perusteella referenssi-RT-PCR-menetelmät IV VILO cDNA-synteesi, EMM-PCR-reaktioseos ja EC23S857-analyysi voitiin jättää pois myöhemmistä testeistä tässä validoitavien HawkZ05-RT-PCR-reaktioseoksen ja *E. coli* Assay-analyysin toimiessa niitä

paremmin. Referenssimenetelmistä EMM-PCR-reaktioseos toiminee kuitenkin *E. coli* -bakteerin havaitsemiseen, mikäli sen kanssa käytetään *E. coli* -analyysiin soveltuvaa cDNA-synteesikittä.

Taulukko 5. Validoitavan menetelmän inklusiivisuus

Bakteerikanta	NucliSens-eristys ja HawkZ05-RT-PCR		Referenssi-RT-PCR: IV VILO ja EMM			
	<i>E. coli</i> Assay	EC23S857	<i>E. coli</i> Assay		EC23S857	
			DNA	cDNA	DNA	cDNA
<i>E. coli</i> WDCM00012	P	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> WDCM00013	P	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> WDCM00090	P	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> ympäristökanta (9 kpl)	P (9/9)	P (9/9)	P (8/9)	P (7/9)	P (9/9)	P (7/9)
<i>E. coli</i> / <i>Klyuvera spp.</i> ympäristökanta	P	P	P	P	P	P
<i>E. coli</i> ympäristökanta	P	P	P	P	P	P
<i>Shigella sonnei</i> ATCC25931	P	P	P	P	P	P

Validoitavan menetelmän inklusiivisuutta testattiin käyttäen näytteinä 50 pmy:n lukumäärätasolla pelletoituja *E. coli* -bakteerin referenssi- ja ympäristökantoja. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittä ja *E. coli* Assay -analyysiä, sekä referenssinä IV VILO cDNA-synteesikittä ja EMM-PCR-kittä, sekä EC23S857-analyysiä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

Taulukko 6. Validoitavan menetelmän eksklusiivisuus, koliformiset bakteerikannat

Näyte	NucliSens-eristys ja HawkZ05-RT-PCR		Referenssi-RT-PCR: IV VILO ja EMM			
	<i>E. coli</i> Assay	EC23S857	<i>E. coli</i> Assay		EC23S857	
			DNA	cDNA	DNA	cDNA
Koliformiset bakteerikannat						
<i>E. aerogenes</i> DSM30053	A	P	A	A	A	A
<i>E. cloacae</i> DSM30054	A	P	A	A	A	A
<i>Enterobacter amnigenus</i> – Pohjavesi	A	P	A	A	A	A
<i>Enterobacter amnigenus</i> – Talousvesikaivo	A	P	A	A	A	A
<i>Enterobacter cancerogenus</i> – Pohjavesi	A	P	A	A	A	A
<i>Escherichia hermannii</i> – Talousvesi	A	A	A	A	A	A
<i>Klebsiella oxytoca</i> – Verkostovesi	A	P	A	A	A	A
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – Raakavesi	A	P	A	A	A	A
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – Pintavesi	A	P	A	A	A	A
<i>Chromobacterium violaceum</i> – Raakavesi	A	A	A	A	A	A
<i>Ewingella americana</i> – Pohjavesi	A	P	A	A	A	A
<i>Rahnella aquatilis</i> – Pohjavesi	A	A	A	A	A	A
<i>Serratia fonticola</i> – Talousvesi 1	A	A	A	A	A	A
<i>Serratia fonticola</i> – Talousvesi 2	A	A	A	A	A	A

Validoitavan menetelmän eksklusiivisuutta testattiin käyttäen näytteinä 50 pmy:n lukumäärätasolla pelletoituja koliformisten bakteerien referenssi- ja ympäristökantoja. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä ja *E. coli* Assay -analyysiä, sekä referenssinä IV VILO-cDNA-synteesikittiä ja EMM-PCR-kittiä, sekä EC23S857-analyysiä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

Taulukko 7. Validoitavan menetelmän eksklusiivisuus, muut bakteerikannat

Näyte	NucliSens-eristys ja HawkZ05-RT-PCR		Referenssi-RT-PCR: IV VILO ja EMM			
	<i>E. coli</i> Assay	EC23S857	<i>E. coli</i> Assay		EC23S857	
			DNA	cDNA	DNA	cDNA
Muut bakteerikannat						
<i>E. faecium</i> DSM2146	A	A	A	A	A	A
<i>Enterococci</i> – Jätevesi	A	A	A	A	A	A
<i>Enterococci</i> – Uimavesi	A	A	A	A	A	A
<i>Legionella anisa</i> ATCC 35292	A	A	A	A	A	A
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152	A	A	A	A	A	A
<i>P. aeruginosa</i> DSM50071	A	A	A	A	A	A
<i>P. fluorescens</i> ATCC49642	A	A	A	A	A	A
<i>Pseudomonas</i> – Rakennettu ympäristö	A	A	A	A	A	A
<i>S. aureus</i> DSM1104	A	A	A	A	A	A
<i>S. aureus</i> – Uimavesi	A	A	A	A	A	A
<i>Salmonella bredeney</i> – Kaivo	A	A	P	A	A	A

Validoitavan menetelmän eksklusiivisuutta testattiin käyttäen näytteinä 500 pmy:n lukumäärätasolla peltoituja muiden vesiympäristössä esiintyvien bakteerien referenssi- ja ympäristökantoja. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä ja *E. coli* Assay -analyysiä, sekä referenssinä IV VILO-cDNA-synteetikittiä ja EMM-PCR-kittiä, sekä EC23S857-analyysiä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

3.3 Suuren tilavuuden näytteenoton (DEUF) testaaminen

Validoinnin kolmannessa vaiheessa testattiin DEUF-näytteenottomenetelmän soveltuvuutta *E. coli*-PCR-analyysille. DEUF-testin tulokset on esitetty taulukossa 8. Tulosten perusteella validoitava menetelmä sopii yhteen DEUF-näytteenottomenetelmän kanssa, eikä kokeessa käytetystä talousvesimatriisista konsentroidu havaittavia määriä inhibiittoreita. Puhtaasta verkostovedestä ei havaittu *E. coli* -bakteeria. DEUF-näytteenottomenetelmää voidaan siis käyttää yhdessä validoitavan menetelmän kanssa. Tarvittaessa on mahdollista tehdä inhibiittoreiden poisto erillisillä kiteillä tuloksen luotettavuuden parantamiseksi.

Taulukko 8. DEUF-näytteenottokokeen tulokset

Näyte	<i>E. coli</i> RNA	Inhibitio
Verkostovesi	A	A
Talousvesi, jossa <i>E. coli</i> 200 000 pmy/l	P	A
Talousvesi, jossa <i>E. coli</i> 2 000 pmy/l	P	A
Talousvesi, jossa jätevesi 10 ml	P	A
Talousvesi, jossa jätevesi 1 ml	P	A

Validoitavan menetelmän yhteensopivuutta DEUF-näytteenoton kanssa testattiin käyttäen näytteinä DEUF-konsentroitua talousvettä, johon oli lisätty eri pitoisuuksia *E. coli* -bakteerikantaa ja jätevettä. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä ja *E. coli* Assay -analyysiä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

3.4 Muut testit

Validoinnissa määritettiin lisäksi menetelmän havaitsemisraja, sekä ylläpitokloorin vaikutus *E. coli* -bakteerin havaitsemiseen verkostovesinäytteistä. Herkkyystestin tulokset on esitetty taulukossa 9. Kun käytettiin PC-suodatinta, RT-PCR-menetelmä havaitsi alhaisimmillaan 1 pmy:n *E. coli* -määrän. Koska samaan havaitsemisrajaan ei kuitenkaan päästy joka kerta, menetelmän havaitsemisrajaksi asetettiin tämän testin perusteella 10 pmy/PC-suodatin. Referenssinä käytetyn viljelymenetelmän havaitsemisrajaksi määritettiin tässä validoinnissa 1 pmy/suodatin, eli viljelymenetelmä havaittiin hieman RT-PCR-menetelmää herkemäksi (taulukko 10). Näytteen konsentroiminen suuremmista tilavuuksista voi auttaa *E. coli* -bakteerin havaitsemisessa. Backflush-liuoksen autoklavoinnilla ei havaittu olevan merkittävää vaikutusta saantoon. Express-suodattimen havaittiin testin perusteella konsentroivan kohdemikrobia huonommalla tehokkuudella, kuin PC-suodattimen. Klooraustestin tulosten perusteella *E. coli* -bakteerin RNA pysyi havaittavana 5 ja 15 minuutin kloorauksen jälkeen. *E. coli* -bakteerin viljeltävyys hävisi kloorauksen myötä, mutta RNA-lukumääriin kloorauksella ei ollut vaikutusta.

Taulukko 9. Menetelmän herkkyys

Näyte	Suodatettu tilavuus (ml)	Pmy/suodatin	PC 0,4 µm				Express 0,2 µm			
			<i>E. coli</i> RNA		Inhibitio		<i>E. coli</i> RNA		Inhibitio	
			Hawk	SF	Hawk	SF	Hawk	SF	Hawk	SF
DEUF 0 pmy/100 ml*	10 000	0	A	A	A	A	A	A	A	A
DEUF 0,05 pmy/100 ml	10 000	1	P	P	A	A	A	P	A	A
Pullo 0,05 pmy/100 ml	500	<1	A	A	A	A	A	A	P	A
DEUF 0,5 pmy/100 ml*	10 000	10	P	P	A	A	P	P	A	A
Pullo 0,5 pmy/100 ml	100	<1	A	A	A	A	A	A	P	A
Pullo 0,5 pmy/100 ml	500	2,5	A	A	A	A	A	A	A	A
DEUF jätevesi 530 pmy/100 ml*	10 000	600	P	P	A	A	P	P	A	A
Pullo jätevesi 30 pmy/100 ml	100	30	P	P	A	A	P	P	A	A
DEUF 5 pmy/100 ml* tuore backflush	10 000	100	P	P	A	A	P	P	A	A
DEUF 5 pmy/100 ml* autok. backflush	10 000	100	P	P	A	A	P	P	A	A

Menetelmän herkkyyttä testattiin käyttäen näytteinä talousvettä, johon oli ympätty *E. coli* -bakteeria eri pesäkelukumäärissä tai jätevettä. Näytteet konsentroidiin DEUF-konsentroinnilla ja jatkokonsentroidiin PC- ja Express-suodattimelle tai pullosta PC- ja Express-suodattimelle. Pmy/suodatin on laskennallinen arvo, joka on laskettu vesimatriisiin ympätyn bakteeriympin arvioidun pesäkelukumäärän ja suodattimelle konsentroidun näytetilavuuden perusteella. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä (Hawk), SensiFast-cDNA-synteesi ja PCR-kittiä (SF) ja *E. coli* Assay -analyysiä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent). * Jatkokonsentroinnissa suodatettu eluaatin määrä.

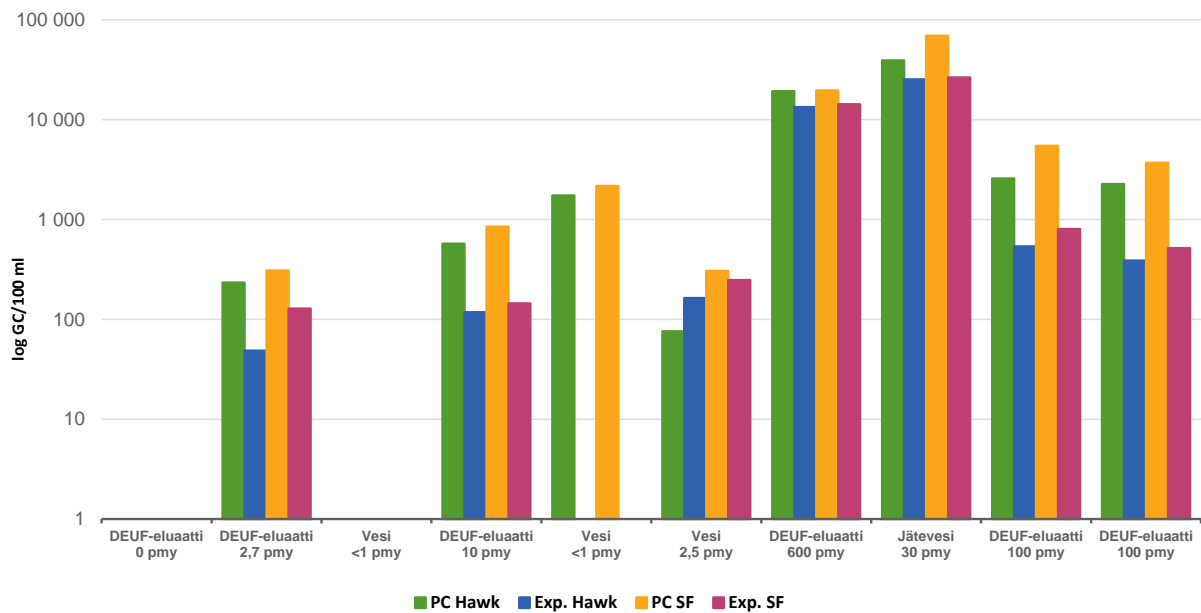
Taulukko 10. Viljelymenetelmän herkkyys

Näyte	Pmy/suodatin	CC-viljely
DEUF 0 pmy/100 ml	0	A
DEUF 0,05 pmy/100 ml	1	A
DEUF 0,05 pmy/100 ml	2,5	P
Pullo 0,05 pmy/100 ml	<1	P
DEUF 0,5 pmy/100 ml	10	P
DEUF 0,5 pmy/100 ml	25	P
Pullo 0,5 pmy/100 ml	<1	P
Pullo 0,5 pmy/100 ml	2,5	P
DEUF jätevesi 300 pmy/L	<1	A
DEUF jätevesi 300 pmy/L	5	P
DEUF jätevesi 300 pmy/L	25	P
Pullo jätevesi 300 pmy/L	<1	A
Pullo jätevesi 300 pmy/L	3	P
DEUF 5 pmy/100 ml tuore backflush	5	P
DEUF 5 pmy/100 ml tuore backflush	50	P
DEUF 5 pmy/100 ml tuore backflush	100	P
DEUF 5 pmy/100 ml autok. backflush	5	P
DEUF 5 pmy/100 ml autok. backflush	50	P
DEUF 5 pmy/100 ml autok. backflush	100	P

Referenssimenetelmän herkkyttä testattiin käyttäen näytteinä talousvettä, johon oli ympätty *E. coli* -bakteeria eri pesäkelukumäärissä tai jätevettä. Näytteet konsentroidiin DEUF-menetelmällä ja jatkokonsentroidiin GN-6-suodattimelle, tai pullonäytteiden osalta konsentroidi tehtiin suoraan GN-6-suodattimelle. Pmy/suodatin on laskennallinen arvo, joka on laskettu vesimatriisiin ympätyn bakteeriympin arvioidun pesäkelukumäärän ja suodattimelle konsentroidun näytetilavuuden perusteella. Näytteet analysoitiin viljelemällä ne CC-maljalle, jossa *E. coli* kasvaa sinisinä pesäkkeinä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent).

Kun tarkasteltiin testin kvantitatiivisia tuloksia (kuva 1), Express-suodatettujen näytteiden geenikopiolumäärät olivat Vesi 2,5 pmy -näytettä lukuun ottamatta joka kerta pienempiä, kuin vastaavien PC-suodatettujen näytteiden. On siis mahdollista, että Express-suodatus heikentää menetelmän herkkyttä. Express-suodatusmenetelmä vaikuttaisi myös konsentroivan enemmän inhibiittoreita kuin PC-suodatus (taulukko 9), sillä ainoat kaksi inhibitiöhavaintoa tehtiin Express-suodatetuista näytteistä. Backflush-liuoksen autoklavoinnilla ei tulosten perusteella havaittu olevan merkittävää vaikutusta saantoon.

Klooraustestin tulokset on esitetty taulukossa 11. *E. coli* -bakteerin RNA pysyi havaittavana molemmilla RT-PCR-menetelmillä 5 ja 15 minuutin kloorauksen jälkeen. Express-suodatinta käytettäessä *E. coli* -bakteeria ei aina havaittu, kun sen määrä oli 5 pmy, eli menetelmän herkkyys huononi Express-suodatinta käytettäessä. *E. coli* -bakteerin viljeltävyys hävisi kloorauksen myötä, mutta RNA-lukumääriin kloorauksella ei ollut vaikutusta (kuva 2).

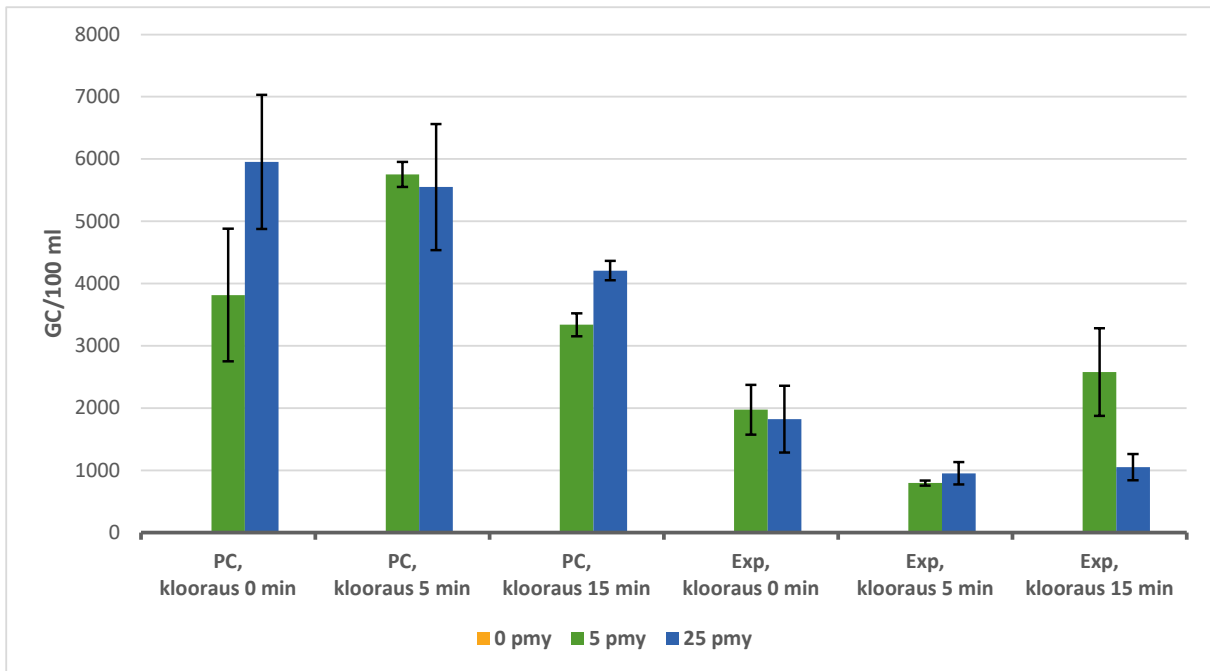


Kuva 1. Suodatinmateriaalin merkitys kvantitatiiviseen tulokseen. DEUF-eluaatti jatkokonsentroidiin PC- ja Express-suodattimelle (Exp.), tai näytevesi konsentroidiin suoraan pullosta PC- ja Express-suodattimelle. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä (Hawk), SensiFast-cDNA-synteesi ja PCR-kittiä (SF) ja *E. coli* Assay -analyysiä. GC = geenikopiolukumäärä.

Taulukko 11. Kloorauksen vaikutus *E. coli*-bakteerin RNA:n esiintymiseen simuloituissa putkirikkonäytteissä.

Näyte	Näytteen tilavuus (ml)	PC 0,4 µm				Express 0,2 µm				CC
		<i>E. coli</i> RNA		Inhibitio		<i>E. coli</i> RNA		Inhibitio		
		Hawk	SF	Hawk	SF	Hawk	SF	Hawk	SF	
5 pmy, klooraus 0 min	100	P	P	A	A	A	P*	A	A	P
25 pmy, klooraus 0 min	400	P	P	A	A	P	P	A	A	P
5 pmy, klooraus 5 min	100	P	P	A	A	A	A	A	A	A
25 pmy, klooraus 5 min	400	P	P	A	A	P	P	A	A	A
5 pmy, klooraus 15 min	100	P	P	A	A	P	A	A	A	A
25 pmy, klooraus 15 min	400	P	P	A	A	P	P	A	A	A
0 pmy, klooraus 15 min	500	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Kloorauksen vaikutusta *E. coli*-bakteerin RNA:n havaitsemiseen RT-PCR:llä testattiin käyttäen näytteinä talousvettä, johon oli ympätty *E. coli*-bakteeria 5 pmy/100 ml. Näytteitä kloorattiin klooripitoisuudella 0,3 mg/l 5 min tai 15 min ennen reaktion pysäyttämistä natriumtiosulfaatilla. Klooratut näytteet konsentroidiin PC- ja Express-suodattimille kahdessa tilavuudessa. Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä (Hawk), SensiFast-cDNA-synteesi ja PCR-kittiä (SF) ja *E. coli* Assay -analyysiä. P = havaittiin (present). A = ei havaittu (absent). *Ainoastaan, kun käytettiin suurempaa 15 µl cDNA-synteessitilavuutta.



Kuva 2. Kloorauksen vaikutus geenikopiolukumääriin. Geenikopiolukumäärät (GC) 100 ml:n vesitilavuutta kohti klooratuissa näytteissä. 5 min ja 15 min 0,3 mg/l klooripitoisuudella käsiteltyä *E. coli* -ympäristyä talousvettä konsentroidiin PC- ja Express-suodattimelle (Exp.). Näytteet analysoitiin käyttäen NucliSens-eristystä, HawkZ05-RT-PCR-kittiä (Hawk), SensiFast-cDNA-synteesiä ja PCR-kittiä (SF) sekä *E. coli* Assay-analyysiä.

4. Menetelmän jalkauttaminen

Hankkeen toisessa vaiheessa THL:ssä käyttöönotettua menetelmää testattiin hankkeen yhteistyökumppanina toimivissa suomalaisissa vesi- ja ympäristölaboratorioissa. Testauksen aluksi THL järjesti laboratorioiden edustajille perehdytyspäivän, jossa menetelmän ominaisuudet ja käytännön toteutus demonstroitiin THL:n laboratoriotiloissa Kuopiossa. Menetelmän käyttöönoton jälkeen yhteistyölaboratorioissa testattiin ensin tunnettuja kontrollinäytteitä ja sitten vesilaitoksilta tositilanteissa putkirikkokorjausten yhteydessä kerättyjä näytteitä.

4.1 Jalkauttamisen toteutus

Menetelmään jalkauttaminen toteutettiin neljässä yhteistyölaboratoriossa ja näytteiden toimittamiseen osallistuvia vesihuoltolaitoksia oli yhteensä 11, yhtä laboratoriota kohden 1–3 vesilaitosta. Laboratorioita varten laadittiin suomenkielinen menetelmäohje ja järjestettiin kaksi samansisältöistä perehdytyspäivää laboratorioille 5. ja 6.11.2019 THL:n Vesimikrobiologian laboratoriossa Kuopiossa. Menetelmäohje lähetettiin laboratorioille ennen perehdytyspäivää tutustumista varten, ja siitä oli mahdollista esittää kysymyksiä etukäteen. Perehdytyksen aikana käytiin läpi suuren tilavuuden DEUF-näytteenotto, näytteen tallentaminen, kontrollinäytteiden valmistus, RNA-eristys suodattimilta, cDNA-synteesi, RT-PCR-ajo, sekä tulosten laskenta ja tulkinta.

Laboratorioille lähetettiin hankkeen kustantamat tarvikepaketit menetelmän käyttöönottoa varten keväällä 2020. Tarvikepaketit sisälsivät välineet ja reagenssit DEUF-näytteenottoon, näytteiden eluointiin ja suodatukseen, nukleiinihappojen eristykseen ja PCR-menetelmään. Taulukossa 12 on kuvattu hankkeen kustantamien tarvikepakettien sisältö. PC-suodattimia sekä eristys- ja PCR-reagensseja oli paketeissa ylimäärin laboratorioiden sisäisen testauksen mahdollistamiseksi. Menetelmän käyttöönoton jälkeen osallistuvat laboratoriot analysoivat menetelmällä putkirikkotilanteisiin ja muihin ongelmatilanteisiin liittyviä vesi- ja talousvesinäytteitä, jotka oli tarkoitus ottaa sekä suuren tilavuuden DEUF-näytteenotolla, että pullonäytteinä.

Koronaviruspandemian aiheuttamien laboratoriotöiden muutosten vuoksi osallistuvissa laboratorioissa valmistelut veivät arvioitua pidempään, eikä menetelmän käyttöönottoa pystytty aloittamaan ilman viiveitä. Laboratoriotöitä jouduttiin siirtämään loppuvuodelle 2020 ja alkuvuodelle 2021.

Taulukko 12. Laboratorioille lähetetyn tarvikepaketin sisältö.

Tarvike	Valmistaja	Määrä	Pakkaus- lämpötila
DEUF-tarvikkeet			
Kylmävaraajia ja -laukkuja		1 kpl/näyte	
DEUF-patruuna	Asahi Rexeed-25A	1 kpl/näyte	4 °C
Autoklavoidut adapterit		1 kpl/näyte	
Autoklavoidut tulpat		1 kpl/näyte	
Vesimittari		1 kpl/vesihuoltolaitos	
Autoklavoitu näytteenotto- letku		1 kpl/näyte	
Letku patruunasta ulostule- valle vedelle		1 kpl/näyte	
Natriumtiosulfaatti (250 ml) ja ruisku		1 kpl/näyte	
Hananipat näytteenottoon		1 paketti/vesihuoltolaitos	
Eluointitarvikkeet			
Natriumpolyfosfaatti, ultra- puhdas	Merck	1 kpl/näyte	
Antifoam Y-30	Merck	1 kpl/näyte	
Tween-80	Merck	1 kpl/näyte	
Autoklavoitu letku	Etra	1 kpl/näyte	
Autoklavoidut adapterit	Molded Products	1 kpl/näyte	
Autoklavoidut tulpat	Molded Products	1 kpl/näyte	
Suodatustarvikkeet			
0,4 µm PC-suodatin	Merck	1 kpl/näyte	
Nukleiinihappojen eristystarvikkeet			
NucliSENS Lysis Buffer	Biomerieux	18 kpl/vesilaitos	4 °C
NucliSENS Magnetic Extrac- tion Reagents	Biomerieux	2 putkea/vesilaitos	4 °C
PCR-tarvikkeet			
HawkZ05 Fast One-Step RT- PCR -kitti	Roche	150 rxn/laboratorio	4 °C
Alukkeet	Integrated DNA Technologies (IDT)	30-40 µl 1 mM liuosta/labora- torio	-20 °C
Koettimet	Integrated DNA Technologies (IDT)	200 µl 10 µM liuosta/laborato- rio	-20 °C
Kvantitatiivinen standardi (5x108 kopiota/µl; gBlocks)	Integrated DNA Technologies (IDT)	10 µl käyttöliuosta/laborato- rio	-20 °C
Vitroids <i>E. coli</i> WDCM00090	Merck	2 kpl/laboratorio	-20 °C

4.2 Jalkauttamisen tulokset

Laboratorioilta kerättiin kokemuksia menetelmän käyttöönottoon liittyen. Vastauksia saatiin kolmelta laboratoriolta, joista kaikilla oli jo aiempaa osaamista PCR-menetelmistä ennen tätä hanketta. Menetelmä saatiin kyselyyn vastanneissa laboratorioissa toimimaan. Erään osallistuvan laboratorion analysoitujen näytteiden tuloksia on esitetty taulukossa 13, josta nähdään, että RT-PCR-menetelmällä ja SFS-ISO EN 9808-2 standardimenetelmällä saadut tulokset vastaavat toisiaan. Vaikka menetelmä saatiin osallistuvissa laboratorioissa pystytettyä, ei se kuitenkaan päätnyt välittömästi hankkeen yhteydessä osaksi laboratorioiden analyysivalikoimaa. Verrattuna viljelymenetelmään, RT-PCR:n etuna nähtiin sen nopeus. Ongelmalliseksi koettiin PCR-

työskentelyssä tarvittavat erikoislaitteet, laboratoriotilojen puhtaustasovaatimukset, kalliit reagenssit, suuri työajan tarve ja näistä koituvat suuret kustannukset. Menetelmä koettiin herkäksi, mutta pohdintaa aiheuttivat luonnollisten näytteiden mahdolliset inhibitio-ongelmat. Hankkeen aikana pystyttiin tuottamaan vain rajallinen määrä kokemusta luonnollisista näytteistä, joiden *E. coli* -lukumäärät ovat yleensä alhaisia. Myös DEUF-näytteenotto herätti kysymyksiä, sen katsottiin muun muassa hidastavan toimintaa putkirikkokorjausten yhteydessä. Osa laboratorioista suoritti menetelmän käyttöönoton tämän vuoksi pelkästään pullonäytteillä.

Taulukko 13. Esimerkki osallistuvan laboratorion saamista tuloksista eri näytetyypeillä.

Näytetyyppi	Näytetilavuus, PCR (ml)	PCR-tulos	<i>E. coli</i> , ISO 9308-2, mpn/100 ml
Lähtevä talousvesi	900	A	0
Talousvesi	900	A	0
Raakavesi	100	P	5
Lähtevä jätevesi	10	P	58 000

5. Eurooppalainen vertailututkimus

THL osallistui syksyllä 2021 Euroopan komission yhteisen tutkimuskeskuksen (The Joint Research Centre, JRC) järjestämään eurooppalaisten vesilaboratorioiden väliseen vertailututkimukseen. JRC:n koordinoiman työn tarkoituksena oli saada lisää eurooppalaista kokemusta molekulaarisiin menetelmiin pohjautuvasta, elinkykyisten *E. coli* -bakteerien esiintymistä vedenjakelujärjestelmissä mittaavasta menetelmästä. Testattava *E. coli* -pikamittausmenetelmä oli sama kuin aiemmin tässä tutkimuksessa THL:n käyttöönottama menetelmä, samoin referenssimenetelmänä toimiva viljelymenetelmä oli sama. JRC oli kuitenkin tehnyt *E. coli* -pikamittausmenetelmään välttämättömiä muutoksia, sillä kaikki alkuperäisen KWR:n raportoiman ja THL:n tässä työssä käyttöönottaman menetelmän reagenssit eivät olleet laajasti käytettävissä. Tärkein muutos koski RNA:n eristysmenetelmää, joka oli aiemmin käytetyn NucliSens-kitin sijasta ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep -kitti (Zymo Research, Yhdysvallat).

JRC toimitti eri *E. coli* -bakteerimäärillä kontaminoidut keinotekoiset talousvesinäytteet sekä muut tarvittavat reagenssit osallistuviin laboratorioihin. Näytteiden ja reagenssien kuljetuksen aikana lämpötila oli ≤ 8 °C. Kustakin näytteestä suodatettiin 100 ml kahtena rinnakkaisena selluloosa-asettaattisuodattimille (MF-Millipore™, 0,45 µm) (Merck, Saksa), joista toinen suodatin säilöttiin DNA/RNA Shield -säilöntöaineen kanssa syväjäähän ja toinen asetettiin CC-alustalle standardin SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 mukaisesti. Pakastetuista näytteistä eristettiin nukleiinihapot ja osasta nukleiinihappoja poistettiin DNA TURBO DNA-free™ Kit -reagensseilla (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat). Näytteistä mitattiin RNA- ja DNA-konsentraatiot Qubit-fluorometrillä (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) ja puhdistettu RNA käänteistranskriptoitettiin cDNA:ksi SensiFast cDNA -synteesikitillä. Lopuksi, *E. coli* -bakteerin esiintyvyys näytteissä määritettiin QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR -laitteella. Saadut tulokset toimitettiin JRC:lle, joka valmisti eri laboratorioiden tulokset yhteenvetävän raportin.

THL:n tuottamien tulosten osalta kaikkien *E. coli*-PCR-menetelmällä käsiteltyjen näytteiden RNA-pitoisuudet pysyivät havaitsemisrajan alapuolella (taulukko 14). Referenssimenetelmällä (CC-pesäkeviljely) analysoitujen vesinäytteiden *E. coli* -kontaminaatiotasot vaihtelivat välillä 0–12 pmy/100 ml. PCR-menetelmällä *E. coli* todettiin havaituksi kolmen teknisen PCR-replikaatin keskimääräisen Ct-arvon perusteella JRC:n antamien ohjeiden mukaisesti silloin, jos näytteen Ct-arvo oli alle 36 ja näytteen ja nollien Ct-arvojen erotus oli vähintään kaksi.

Taulukko 14. DNA- ja RNA-pitoisuudet, CC-viljelyn tulokset ja *E. coli*-PCR havaitsemistulokset.

Näyte	DNA, ng/ μ l	RNA, ng/ μ l	CC, pmy/100 ml	<i>E. coli</i> -PCR
Taso 0, toisto 1	0,178	<HR	0	A
Taso 0, toisto 2	0,195	<HR	0	A
Taso 0, toisto 3	0,193	<HR	0	A
Taso 1, toisto 1	0,283	<HR	0	A
Taso 1, toisto 2	0,262	<HR	2	A
Taso 1, toisto 3	0,227	<HR	1	P
Taso 2, toisto 1	0,146	<HR	1	A
Taso 2, toisto 2	0,222	<HR	1	P
Taso 2, toisto 3	0,204	<HR	1	A
Taso 3, toisto 1	0,24	<HR	5	P
Taso 3, toisto 2	0,2	<HR	3	A
Taso 3, toisto 3	0,144	<HR	1	A
Taso 4, toisto 1	0,165	<HR	9	P
Taso 4, toisto 2	0,157	<HR	6	P
Taso 4, toisto 3	0,165	<HR	12	P
Nolla, toisto 1	<HR	<HR	0	A
NA-eristyksen pos. kontrolli A	<HR	<HR	-	P
Käänteistranskriptaasin pos. kontrolli B	-	<HR	-	P
qPCR:n pos. kontrolli C	-	-	-	A
prosessinolla	<HR	<HR	-	A
NA-eristyksen neg. kontrolli	<HR	<HR	-	A
Käänteistranskriptaasin neg. kontrolli	<HR	<HR	-	A
qPCR-ajon neg. kontrolli	-	-	-	A

Positiivikontrollit saapuivat laboratorioon sulaneina ja huoneenlämpöisinä. Lähetettyjen A- ja C-kontrollien sijaan käytettiin samankaltaisia positiivikontrolleja, jotka oli valmistettu käyttäen *E. coli*-kanta ja DNA/RNA Shield -säilöntäainetta. Kontrolli C oli mahdollisesti liian laimea. <HR = alle havaitsemisrajan, P = havaittiin, A = ei havaittu.

6. Johtopäätökset

Tämän hankkeen ensimmäisessä osassa KWR Watercycle Research Instituten julkaisema vaihtoehtoinen talousvesiverkoston suolistoperäisen saastumisen tunnistusmenetelmä *E. coli* -bakteerin havaitsemiseen validoitiin käyttöön THL:n Vesimikrobiologian laboratoriossa. Menetelmän tarkoituksena oli nopeuttaa suolistoperäisen saastumisen tunnistusta juomavesinäytteistä verrattuna standardimenetelmään SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017. Vaihtoehtoinen menetelmä perustuu *E. coli* -bakteerin ribosomaalisen 16S RNA:n havaitsemiseen käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktiolla (RT-PCR). RNA-pohjainen analyysi mahdollistaa bakteerin elävyyden arvioinnin, sillä RNA hajoaa nopeasti solun kuoltua. Validoinnin perusteella menetelmälle määritettiin havaitsemisraja, herkkyys, spesifisyys, toistettavuus ja virhelähteet.

Validoinnin kokonaistulosten perusteella menetelmän toistettavuus on hyvä. Suurin osa *E. coli* -positiivisista näytteistä on antanut validoitavalla menetelmällä positiivisen tuloksen, vaikka eristyksiä ja RT-PCR-analyysyjä on tehty useissa erissä. Negatiivisiksi jääneet näytteet ovat olleet hyvin lähellä menetelmän havaitsemisrajaa. RNA-eristysmenetelmä toimii sekä manuaalisesti, että eristysrobotilla.

SensiFast-RT-PCR-menetelmän havaittiin olevan herkempi, kuin HawkZ05-menetelmän, jonka validoitiin tässä työssä ensisijaisesti keskityttiin. SensiFast-menetelmää voidaan jatkossa mahdollisesti hyödyntää *E. coli* -analyysissä, sillä se osoitti myös parempaa herkkyyttä, kuin kuin THL:n laboratoriossa aiemmin käytetty RT-PCR-menetelmä.

Osa herkkyydestä analysoidusta pienen pitoisuuden näytteistä jäin negatiivisiksi hyvin pienellä erolla positiivisiin näytteisiin verrattuna, esim. Ct(näyte) – Ct(nolla) = 1,9. Myöhempää käyttöä varten nollanäytteiden hajontaa voisi tarkastella ja mahdollisesti pienentää positiiviseen tulokseen vaadittavaa Ct-arvojen eroa.

Kun NucliSens-eristettyä RNA-eluaattia analysoitiin ilman cDNA-synteesivaihetta, antoi menetelmä joka tapauksessa positiivisen tuloksen. Menetelmän ei siis voida sanoa mittaavan pelkkää *E. coli* -bakteerin RNA:ta vesinäytteestä, vaan mukana on myös huomattavasti kestävämpää DNA:ta. Tämä mahdollisesti selittää sen, miksi kloorauskäsittely ei vaikuttanut havaittuihin geenikopiolukumääriin oletetulla tavalla. Tulevaisuudessa menetelmään voisi lisätä DNAasikäsittelyn, jolloin mikrobien elävyyden arviointi olisi luotettavampaa, vaikka se hieman pidentää analyysin läpimenoaika.

Kokonaisuudessaan tässä hankkeessa käyttöön otettu *E. coli*-PCR-menetelmä oli toimiva, se tunnisti *E. coli* -bakteerin hyväksyttävällä herkkyydellä ja spesifisyydellä talousvesimatriisista. Menetelmän herkkyyttä voidaan parantaa lisäämällä analysoitavaa vesitilavuutta DEUF-konsentroinnilla. Analyysin läpimenoaika oli alle viisi tuntia.

Menetelmän jalkauttamisen tavoitteena oli tuoda testauslaboratorioiden valikoimaan uusi pikamittausmenetelmä *E. coli* -bakteerin havaitsemiseksi, jotta putkirikkotilanteen jälkeen voitaisiin palata vesilaitoksilla normaalitilaan mahdollisimman nopeasti. Vaikka menetelmä saatiin hankkeeseen osallistuneissa laboratorioissa pystytettyä ja toimimaan, sitä ei kuitenkaan nähty realistisena vaihtoehtona nykyisille pesäkeluku- ja todennäköisin lukumäärä -menetelmille korkeiden kustannustensa ja suuren vaadittavan työajan vuoksi. *E. coli* -PCR-menetelmän huonona puolena nähtiin myös se, että tulos on muotoa: todettiin/ei todettu/100 ml, kun taas SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 menetelmällä saadaan sekä numeerinen (kvantitatiivinen) *E. coli* tulos, että koliformisten bakteerien määritystulos.

JRC:n vertailututkimuksessa elinkykyisten *E. coli* -bakteereiden pikamittausmenetelmä todettiin perinteistä viljelymenetelmää nopeammaksi, mikä on kansanterveydellisestä näkökulmasta ensiarvoisen tärkeää lyhytaikaisten saastetahtumien tai putkilinjojen rikkoutumistapahtumien yhteydessä. Osana eurooppalaisen laboratorioiden välistä vertailututkimusta THL:n vesimikrobiologian laboratoriossa saatujen tulosten perusteella pikamittausmenetelmä ei kuitenkaan yltänyt samaan herkkyyteen perinteisen menetelmän kanssa. Eurooppalaisen tutkimuksen ongelmakohtia olivat viivästyneet näytteiden ja reagensien kuljetusajat, selluloosa-asettaattisuodattimien huono käsiteltävyys soluhajotusvaiheessa sekä puutteet vakio toimintamenettelyluonnoksessa. Pikamittausmenetelmän herkkyyden varmistamiseksi vertailututkimus päädyttiin lopulta

toistamaan vuonna 2022 PC-suodattimia käyttäen. Tätä raporttia kirjoitettaessa JRC valmistelee julkista yhteenvetoraporttia menetelmävertailusta.

Tässä hankkeessa otettiin ensiaskelia molekyylibiologisten menetelmien käyttöönottamiseksi vesimikrobiologisia valvontatutkimuksia tekevissä laboratorioissa. Kansainvälinen standardointiorganisaatio (International Organization for Standardization, ISO) valmistelee parhaillaan menetelmästandardeja tukemaan PCR-menetelmien käyttöönottoa vesimikrobiologian laboratorioissa. Tulevina vuosina PCR-menetelmien kehitys ja käyttöönottosovellukset jatkuvat useilla eri sovellutusalueilla. Pikamenetelmiä tarvitaan paitsi talousveden häiriötilanteiden varalle, molekyylibiologiselle analytiikalle on paikkansa myös uimarantavesien laadunvalvonnan työkaluna ja rakennusten vesijärjestelmien riskinarvioinnin tukena.

Lähteet

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* (Baltimore, Md.), 55(4), 611–622.
- Chern EC, Sieftring S, Paar J, Doolittle M, Haugland RA. Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Mar;52(3):298-306. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.03001x. Epub 2011 Jan 19. PMID: 21204885.
- Hargy, T. M., J. Rosen, M. LeChevallier, M. Friedman, and J. L. Clancy. 2010. A high-volume sampling method for total coliform and *E. coli*. *Journal American Water Works Association* 102:79.
- Hijnen, W. A. M., D. A. Van Veenendaal, W. M. H. Van der Speld, A. Visser, W. Hoogenboezem ja D. Van der Kooij. 2000. Enumeration of faecal indicator bacteria in large water volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency. *Water Research* 34:1659–1665.
- Hrudey, S. E., and E. J. Hrudey. 2007. Published case studies of waterborne disease outbreaks - Evidence of a recurrent threat. *Water Environment Research* 79:233–245.
- KWR 2017.098. 2018. Validation of a real-time RT-PCR method for rapid detection of *E. coli* in distributed drinking water.
- Meriläinen P, Lanki T, Miettinen I, Hokajärvi AM, Simola A, Tiittanen P ja Tli-Tuomi T. 2019. Ilmastonmuutos ja vesihuolto – varautuminen ja terveysvaikutukset. Suomen ilmastopaneeli 10/2019.
- Mull B, Hill VR. 2012. Recovery of diverse microbes in high turbidity surface water samples using dead-end ultrafiltration. *J Microbiol Meth*, 91:429–433.
- Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res.* 2007 Jan-Jun;6(1-2):37–53. doi: 10.1051/ebr:2007031. Epub 2007 Sep 12. PMID: 17961479.
- Pitkänen, T., Kalso, S., Vepsäläinen, A., Rapala, J. ja Niemelä, S.I. 2009a. Colilert-menetelmän verifiointi sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 461/2000 mukaisiin koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin tutkimuksiin Suomessa. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen julkaisuja. Raportti 17/2009.
- Pitkänen, T., J. Bracker, I. T. Miettinen, A. Heitto, J. Pesola ja E. Hakalehto. 2009b. Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology* 55:849–858.
- Pitkänen, T., Ryu, H., Elk, M., Hokajärvi, A-M., Siponen, S., Vepsäläinen, A., Räsänen, P. and Santo Domingo, J.W. 2013. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ. Sci. Technol.*, 2013, 47 (23), pp 13611–13620. DOI: 10.1021/es403489b.
- Romppe, A., P. Servais, J. Baudart, M. R. de Roubin, and P. Laurent. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* 49:31–54.
- Rytkönen A, Tiwari A, Hokajärvi A-M, Uusheimo S, Vepsäläinen A, Tulonen T and Pitkänen T. (2021). The Use of Ribosomal RNA as a Microbial Source Tracking Target Highlights the Assay Host-Specificity Requirement in Water Quality Assessments. *Front. Microbiol.* 12:673306. doi: 10.3389/fmicb.2021.673306
- SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 Waterquality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO 9308-1:2014/Amd 1:2016)
- SFS 3016:2011. Veden laatu. Koliformisten bakteerien kokonaismäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä.
- Smith, CM, Hill, VR. 2009. Dead-end Hollow Fiber Ultrafiltration for Recovery of Diverse Microbes in Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(16):5284–5289.
- Tallon, P., B. Magajna, C. Lofranco, and K. T. Leung. 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. *Water Air and Soil Pollution* 166:139–166.
- Theron, J., and T. E. Cloete. 2004. Emerging microbiological detection techniques. In T. E. Cloete, J. Rose, L. H. Nel, and T. Ford (ed.), *Microbial Waterborne Pathogens*. IWA Publishing, London, UK.
- WHO 2017 Guidelines for drinking-water quality, 4 ed. World Health Organization, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en/.

Liite 1. TYÖOHJE – NÄYTTEENOTTO JA SUUREN TILAVUUDEN DEUF-NÄYTTEEN ESIKÄSITTELY

Versio 2, 29.5.2020

Sisällys

Tarvikkeet näytteenottoon.....	1
Laitteet ja tarvikkeet suuren tilavuuden DEUF-näytteen eluointiin.....	2
Näytteenotossa ja suuren tilavuuden DEUF-näytteen esikäsittelyssä tarvittavat reagenssit.....	2
Näytteenoton suoritus	3
Suuren tilavuuden DEUF-näytteen eluointi.....	3
Kirjallisuusviitteet	5

Tarvikkeet näytteenottoon

- Kylmävaraajia ja -laukkuja.
- Kertakäyttöiset hanskat
- Liekitin tai etanolia hanan desinfiointiin
- Steriilejä, kertakäyttöisiä 1 l muovipulloja.
- Suuren tilavuuden DEUF-näytteenottopaketti, joka sisältää:
 - DEUF-patruuna (ASAHI Rexeed-25A ultrafilters, toimittaja Scandinavian Medical Sweden, valmistaja Asahi Kasei Medical Co, Ltd.), säilyvyys (5 ± 3) °C valmistajan ohjeiden mukaisesti.
 - Autoklavoitu adapteri ja tulppa (Kuva 1, kohdat A ja E) (Molded products, Inc.: MPC-855NS.375 DIN Adapter ja MA-40 Blood Port Cap).
 - Vesimittari, huomioitava tarvittaessa kuumalle vedelle oma mittari.
 - Autoklavoitu näytteenottoletku (esim. 1 m tai tarvittaessa pidempi vahvikkeeton silikoniletku, kirkas sisä-/ulkohalkaisija 10/15 mm, toimittaja Etra, tuotenumero 10320004616).

- Letku DEUF-patruunasta ulostulevalle vedelle (esim. PVC-letku, sisähalkaisija 12 mm, ToppBright tai vastaava), joka ohjataan vesimittariin. Tarvittaessa letku myös vesimittarista ulostulevalle vedelle. Letkua ei ole välttämätön autoklavoida.
- Steriili pullo natriumtiosulfaatti jauheen säilyttämiseen.
- Steriili ruisku natriumtiosulfaattiliuoksen lisäämiseen DEUF (esim. 60 ml BD Syringe Luer-Lok tip).
- Letkunippoja (näytteenottoletkun yhdistäminen hanaan).

Laitteet ja tarvikkeet suuren tilavuuden DEUF-näytteen eluointiin

- Suuren tilavuuden DEUF-patruunan eluointipaketti, joka sisältää:
 - Autoklavoitu letku (pituus max. 1 m), esimerkiksi vahvikkeeton silikoniletku, kirkas sisä/ulkohalkaisija 10/15 mm (toimittaja Etra, tuotenumero 10320004616).
 - Autoklavoitu adapteri ja tulppa (Kuva 1, kohdat A ja E)
- Letkupumppu (Watson Marlow tai vastaava) DEUF-patruunan eluointiin. Letkupään oltava sopiva käytettävälle letkulle (sisä-/ulkohalkaisijaltaan 10/15 mm silikoniletku), tarvittava kierrosnopeus 650 ml/min.
- Pipettejä sekä steriilejä filterillisiä pipetinkärkiä
- 2 kpl 50–100 ml steriilejä lasipulloja (Scott tai vastaava)
- Magneettisekoittaja + steriilejä magneetteja
- 2 kpl 500 ml steriilejä lasipulloja (Scott tai vastaava)
- Kalibroitu vaaka
- Steriili ruisku DEUF-patruunan tyhjentämistä varten (esim. 60 ml BD Syringe Luer Lok Tip) (ei pakollinen, tyhjentämisen voi tehdä letkupumpulla)

Näytteenotossa ja suuren tilavuuden DEUF-näytteen esikäsittelyssä tarvittavat reagenssit

- Natriumtiosulfaattiliuos (18 mg/ml) kloorin inaktivointiin näytevedestä (pullonäyte)
- Natriumtiosulfaattijauhe (sodium thiosulphate, anhydrous) kloorin inaktivointiin DEUF-näytteessä, säilyvyys valmistajan (Amresco tai vastaava) ohjeiden mukaan
- Steriili, ultrapuhdas- tai nukleasivapaavesi, säilyvyys 6 kuukautta (5 ± 3) °C.

- Natriumpolyfosfaatti (NaPP, ultra pure), säilyvyys valmistajan (Merck tai vastaava) ohjeiden mukaan
- Antifoam Y-30 emulsion, säilyvyys valmistajan (Merck tai vastaava) ohjeiden mukaan
- Tween 80, säilyvyys valmistajan (Merck tai vastaava) ohjeiden mukaan

Näytteenoton suoritus

1. Pullonäytteenotto suoritetaan laboratorion näytteenotto-ohjeen mukaisesti steriiliin astiaan.
 - Esim. THL:n vesiepidemianäytteenotto-ohje:
<https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/vesimikrobiologinen-analytiikka/naytteenotto-ja-lomakkeet/vesiepidemianaytteenotto>.
 - *E. coli* PCR-osoitusta varten näytepullo on otettava näytetilavuus tulee olla vähintään 1 000 mL. Kertakäyttöinen mikrobiinäytepullo on paras valinta näyteastiaksi.
2. Suuren tilavuuden DEUF-näytteenotto suoritetaan, kuten on kuvattu THL:n vesiepidemianäytteenotto-ohjeessa: Analyysitilauslomake ja näytteenotto-ohje suuren tilavuuden näytteille,
<https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/vesimikrobiologinen-analytiikka/naytteenotto-ja-lomakkeet/vesiepidemianaytteenotto>.
3. Näytteet (joko näytteenottopullot tai DEUF-patruuna) tulee toimittaa tutkivaan laboratorioon kylmäpakkauksia sisältävässä kylmälaukussa mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Laboratorioanalyysi tulee aloittaa viimeistään 24 tunnin kuluessa näytteenotosta.

Suuren tilavuuden DEUF-näytteen eluointi

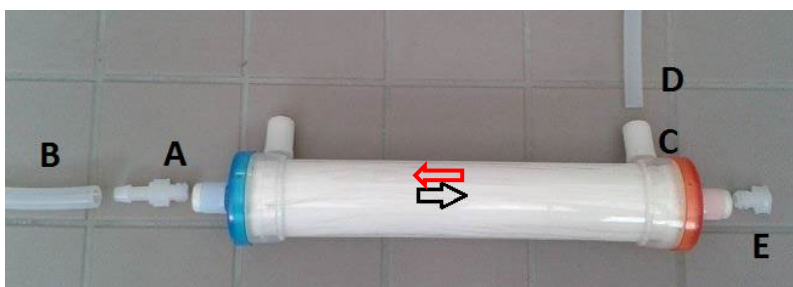
1. Tehdään mikrobiologiseen työskentelyyn sopivassa laboratoriotilassa.
2. Eluointiliuoksen valmistaminen DEUF-patruunan purkua varten:
 - a. Steriili vesi otetaan huoneenlämpöön hyvissä ajoin ennen liuoksen valmistamisen aloittamista, mahdollisuuksien mukaan jo edellisenä päivänä. Liuosta

valmistettaessa käytetään filtterillisiä pipetinkärkiä sekä suojahanskoja ja mahdollisuuksien mukaan liuoksen voi tehdä suojakaapissa.

- b. Valmista 10 % natriumpolyfosfaatti-liuos (NaPP): Punnitse 1 g NaPP ja lisää 10 ml steriiliä vettä. Huom! Liukenee huonosti, kannattaa liuottaa esim. ravistelijassa lämpöhuoneessa tai magneettisekoittajalla lämmitystä käyttäen.
- c. Valmista 1 % Antifoam Y-30-liuos: Lisää 100 µl Antifoam Y-30:tä 9,9 ml:aan steriiliä vettä.
- d. Jaa jokaista näytettä kohti 500 ml:n steriiliin pulloon 496,5 ml steriiliä vettä. Lisää 2,5 ml Tween 80 sekä 500 µl 10 % NaPP-liuosta ja 500 µl 1 % Antifoam Y-30-liuosta edellä mainittuun ultrapuhtaaseen veteen. Sekoita niin kauan, että Tween 80 on liennut (esim. magneettisekoittajalla, käytä steriloitua magneettia).

3. DEUF-patruunan eluointi:

- a. Valmistele näytepatruuna
 - i. Laita siniseen päähän, sisääntuloaukkoon (Kuva 1, kohta A) adapteri
 - ii. Laita punaiseen päähän tulppa (Kuva 1, kohta E)
 - iii. Liitä sisä-/ulkohalkaisijaltaan 10/15 mm letku sekä pumppuun ja patruunan ulostulopuolelle (kuvassa 1 kohta D) että patruunan sisääntulopuolelle (kuva 1, A) VARO KONTAMINOIMASTA LETKUJA!
 - iv. Tyhjennä patruuna näytevedestä letkupumpulla tai steriilillä ruiskulla. Tyhjennys tehdään näytteenottosuuntaan.

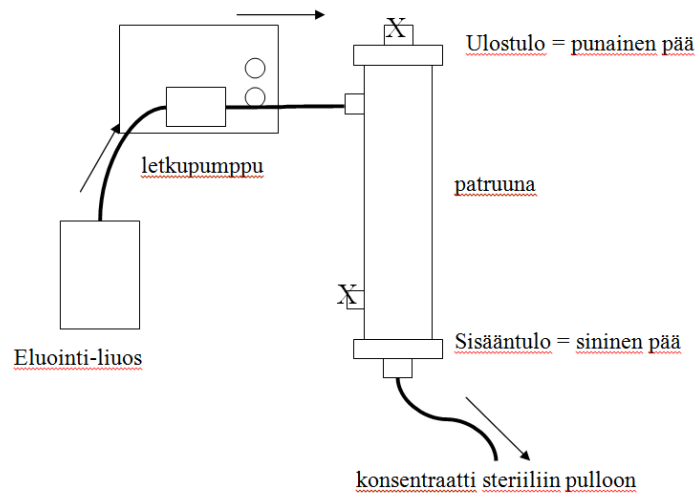


Kuva 1. DEUF-suodatinpatruuna (musta nuoli = näytteenottosuunta; punainen nuoli = eluointisuunta)

b. Eluointi

Pumpataan letkupumpulla nopeudella 650 ml/min eluointiliuos ns. vastavirtaan (kuva 2) patruunan läpi ja kerätään saatu konsentraatti steriiliin lasipulloon (esim. 500 ml). Pumppausta jatketaan niin pitkään, että patruuna

on täysin tyhjä. Huomaa, että pumpussa olevaan letkuun kertyy painetta, joka poistuu letkun irrotuksen yhteydessä (pidä letkun pää pullossa sen aikaa).



Kuva 2. DEUF-eluointi.

- i. Kirjataan ylös konsentraatin määrä.
 - ii. Mikäli tehdään puhtauskontrollinäyte DEUF-patruunalle, eluointi tehdään saman ohjeen mukaisesti (eluointi käyttämättömälle patruunalle). Pelkän eluointiliuoksen puhtauden varmistamiseksi voidaan tehdä eluointi-0 (pelkkä eluointiliuos ilman DEUF-suodatusta).
4. Näytteet suodatetaan kalvosuodattimille noudattaen *E.coli*PCR -työohjetta.

Kirjallisuusviitteet

- KWR 2017.098, June 2018; Validation of a real-time RT-PCR method for rapid detection of *E. coli* in distributed drinking water.
- Terveystieteiden tutkimuskeskus, Asiantuntijamikrobiologiayksikkö, 2018; Suuren tilavuuden näytteenotto DEUF-menetelmällä ja näytteen käsittely laboratoriossa; Menetelmäohje VESI TO34.

Liite 2. TYÖOHJE – NÄYTTEEN VALMISTELU, RNA-ERISTYS JA RT-PCR

Versio 2, 29.5.2020

Sisällys

Työtilat.....	1
Näytteiden valmistelu	2
Reagenssit.....	3
Standardit ja kontrollit.....	4
Laitteet ja tarvikkeet.....	4
RNA-eristys NucliSENS eristyskitillä (Biomerieux).....	6
Yksivaiheinen RT-PCR-menetelmä (Roche HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit)	8
Tulosten käsittely.....	9
Kirjallisuusviitteet:	10

Työtilat

Molekyylibiologisissa analyyseissä työskennellään nukleiinihappojen (NA) kanssa. Työskentelyssä on noudatettava erityistä puhtautta ja huolellisuutta, sillä kaikkialla, erityisesti sormissa, olevat nukleaasientsyymit hajottavat DNA:ta ja RNA:ta. Ympäristön nukleiinihapot ja etenkin monistetut PCR-tuotteet kontaminoivat herkästi NA-näytteet ja voivat johtaa pahimmillaan virhepositiivisiin PCR-tuloksiin. RNAasien eli RNA:ta hajottavien entsyymien pääsy näytteisiin johtaa sen sijaan virhenegatiivisiin tuloksiin. PCR-kontaminaatioiden välttämiseksi työskentelyssä on noudatettava puhtausasteen mukaista järjestystä ja kullekin työvaiheelle on määrättävä tilat, joissa niitä saa tehdä. Työpäivän aikana ei ole suositeltavaa siirtyä post-PCR-tiloista takaisin pre-PCR-tiloihin. Jos näin on kuitenkin tehtävä, pese kädet ja vaihda hanskat sekä työtakki ennen siirtymistä takaisin pre-PCR-tiloihin. Mitään tarvikkeita tai laitteita ei saa kuljettaa post-PCR-tiloista pre-PCR-tiloihin. Jokaisella työvaiheella on oma työpiste ja pipettisarja.

Pre-PCR tilat:

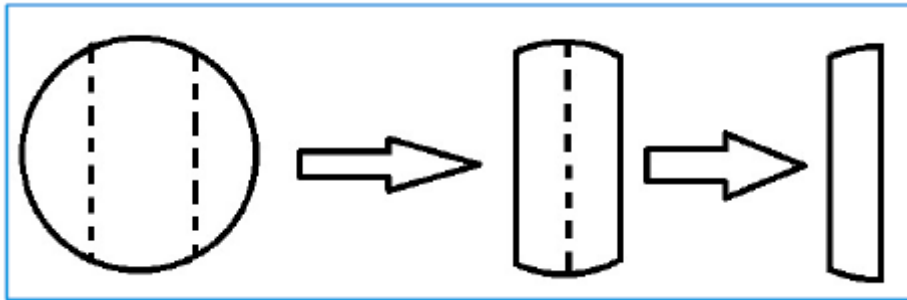
- Näytteen valmistelu tapahtuu mikrobiologiseen työskentelyyn sopivassa laboratoriotilassa, jossa ei käsitellä PCR-tuotteita.
- RNA-eristys tulee suorittaa molekyylibiologiseen työskentelyyn varatussa tilassa, jossa ei käsitellä PCR-tuotteita.
- RT-PCR-pipetointiin olisi hyvä olla saatavilla erillinen tila tai pipetointikaappi, jossa ei käsitellä PCR-tuotteita.

Post-PCR tilat:

- Kvantitatiivista PCR-laitetta ja kvantitatiivisten qPCR-kontrollien pipetointia ei suositella sijoitettavaksi samaan tilaan, jossa suoritetaan pre-PCR työvaiheita.

Näytteiden valmistelu

1. Vesinäytteet otetaan joko pulloihin tai konsentroidaan DEUF-menetelmällä (ks. erillinen työohje näytteenottoon).
2. Näytteet (sellaisenaan tai DEUF-eluaatteina) suodatetaan käyttäen nukleasivapaita tai autoklavoituja suodatussuppiloita.
 - a. Mikäli käytetään metallisia suodatussuppiloita, steriloimattomat metalliosat liekitetään etanolilla käyttäen ennen suodatusta.
3. Mahdollisimman suuri tilavuus näytettä suodatetaan 0,4 µm polykarbonaattisuodattimen (PC) läpi imusuodatusta käyttäen.
 - a. Talousvesinäytteille tilavuus on n. 1000 ml.
 - b. DEUF-eluaatille tilavuus on n. 100 ml.
4. Samalla suodatetaan positiivinen kontrollinäyte ja prosessikontrollit:
 - a. Positiivikontrollina suodatetaan 100 ml nukleinihappo- ja nukleasivapaata vettä (DEPC-vettä), johon on suspensoitu 50 pmy *E. coli* -kontrollikantaa.
 - i. Positiivikontrollin voi valmistaa esimerkiksi suspensoimalla bakteerilukumäärältään tunnettu kaupallinen pelletti tarvittavaan vesimäärään (esim. 15–80 pmy *Escherichia coli* WDCM 00090; Vitroids, Merck).
 - b. Prosessikontrollina suodatetaan 100 ml nukleinihappo- ja nukleasivapaata vettä (DEPC-vettä).
 - c. Myös seuraavia voidaan tarpeen mukaan käyttää:
 - i. DEUF-0 (eluointi käyttämättömälle patruunalle).
 - ii. Eluointi-0 (pelkkä eluointiliuos ilman DEUF-suodatusta).
5. Suodattimet taitellaan kuvan osoittamalla tavalla näytepuoli sisäänpäin steriilejä pinsettejä käyttäen ja säilötään syväjähän (-80°C) Eppendorf-putkissa odottamaan nukleinihappoeristystä, mikäli eristystä ei tehdä heti (Kuva: KWR 2017.098).



Reagenssit

Seuraavia reagensseja tarvitaan mikrobiologian laboratoriossa tapahtuvaan näytteen valmisteluun:

- 80 % (v/v) etanoli.
- Steriili, ultrapuhdas vesi
- Steriili, deionisoitu vesi
- Nukleiinihappo- ja nukleaasivapaa vesi (DEPC-vesi, ThermoFisher Scientific, cat. nro. AM9922).
- Positiivikontrolli: 50 pmy *E. coli* 100 ml nukleiinihappo- ja nukleaasivapaassa vedessä.

Seuraavia reagensseja tarvitaan molekyylibiologiseen työskentelyyn (pre-PCR):

- Pintojen puhdistusaineet, esim:
 - RNase Zap (ThermoFisher Scientific, cat. nro. AM9780).
 - DNA Eraser (MP Biomedicals, VWR cat. nro. IC821805).
 - 80 % (v/v) etanoli.
- Ultrapuhdas, molekyylibiologisille töille sopiva vesi (HyClone Water, FisherScientific, cat. nro. 10307052).
- NucliSENS Lysis Buffer (Biomérieux, cat-numero 200292 (2 ml putket)).
- NucliSENS Magnetic Extraction Reagents (Biomérieux, cat-numero 200293):
 - NucliSENS Magnetic Silica
 - NucliSENS Wash Buffer 1 (WB1).
 - NucliSENS Wash Buffer 2 (WB2).
 - NucliSENS Wash Buffer 3 (WB3).
 - NucliSENS Elution Buffer.
- Roche HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit (Roche, material number 05987687190).
- Alukkeet ja koettimet:
 - *E. coli* 16S Forward-aluke: 5'- CATGCCGCGTGTATGAAGAA -3'
 - *E. coli* 16S Reverse-aluke: 5'- CGGGTAACGTCAATGAGCAAA -3'

PROJEKTI Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakteerien tunnistamiseen Suomen talousvedestä qPCR-tekniikalla
Terveyden ja hyvinvoinninlaitos / Asiantuntijamikrobiologiayksikkö / Vesimikrobiologian laboratorio

- *E. coli* 16S-koetin: 5' FAM- TATTAACCTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAA – BHQ1 3'

Post-PCR -tilassa tarvitaan seuraavia reagensseja:

- Pintojen puhdistusaineet, esim.:
 - RNase Zap (ThermoFisher Scientific, cat. nro. AM9780).
 - DNA Eraser (MP Biomedicals, VWR cat. nro. IC821805).
 - 80 % (v/v) etanoli.
- Ultrapuhdas, molekyylibiologisille töille sopiva vesi (HyClone Water, FisherScientific, cat. nro. 10307052).
- Kvantitatiivinen standardi (esim. kaupallinen Integrated DNA Technologies gBlocks):
 - *E. coli* -standardisekvenssi:
catgccgcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaagggag-
taaagttaatacctttgctcattgacgttaccgc

Standardit ja kontrollit

- Positiivikontrolli: 50 pmy tunnettua *E. coli* -kantaa suspensoituna 100 ml:aan nukleiinihappo- ja nukleaasivapaata vettä (DEPC-vettä) ja suodatettuna 0,4 µm polykarbonaattisuodattimelle.
- Prosessikontrolli: 100 ml nukleiinihappo- ja nukleaasivapaata vettä (DEPC-vettä) suodatettuna 0,4 µm polykarbonaattisuodattimelle.
- DEUF-0 (eluointi käyttämättömälle patruunalle): eluointiliuoksen suodatus 0,4 µm polykarbonaattisuodattimelle.
- Eluointi-0 (pelkkä eluointiliuos ilman DEUF-suodatusta): suodatus 0,4 µm polykarbonaattisuodattimelle.
- Eristysnolla: käsitellään nukleiinihappoeristysreagenssit ilman näytemateriaalia.
- No Template Control (NTC): ajetaan qPCR-reaktion pelkillä reagensseilla ilman näytemateriaalia.
- Inhibitiokontrolli: jokaiselle qPCR-näytteelle tehdään rinnakkainen näyte lisäämällä positiivikontrollista eristettyä RNA:ta näytteen joukkoon.
- Keinotekoinen tunnetun pitoisuuden nukleiinihapposekvenssi, joka jäljittelee *E. coli* -bakteerin 16S rRNA geenin sekvenssiä ja sisältää alukkeiden ja koettimen täydelliset kiinnittymiskohdat. Käytetään PCR-ajon monistumistehokkuuden arviointiin.

Laitteet ja tarvikkeet

Seuraavia laitteita ja tarvikkeita tarvitaan mikrobiologian laboratoriossa tapahtuvaan näytteen valmisteluun:

PROJEKTI Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakteerien tunnistamiseen Suomen talousvedestä qPCR-tekniikalla
Terveyden ja hyvinvoinninlaitos / Asiantuntijamikrobiologiayksikkö / Vesimikrobiologian laboratorio

- Laboratoriokäsineet, puuterittomat.
- Jääkaappi (5°C ± 3°C).
- Pakastin (-18°C ± 3°C).
- Syväjäähäpakastin -75-80°C (ei pakollinen).
- Kalibroidut mikropipetit ja niihin sopivat steriilit, filterilliset kärjet useassa tilavuudessa.
- Suodatuslaitteisto (esim. EZ Stream Pump + letkut, Millipore, Merch, cat.nro: EZSTREAM1, STREAM-TUB, XX6700034; Sartorius suppilot, order nro. 16828, tai vastaavat).
- 0,4 µm polykarbonaattisuodattimia (PC, 47 mm, VWR, Whatman Nuclepore membraanisuo-datin, 111107 (515–2081))
- Steriilejä pinsettejä.
- Steriilejä mittalaseja.

Seuraavia laitteita ja tarvikkeita tarvitaan molekyylibiologiseen työskentelyyn (pre-PCR):

- Laboratoriokäsineet, puuterittomat.
- Jääkaappi (5°C ± 3°C).
- Pakastin (-18°C ± 3°C).
- Syväjäähäpakastin -75-80°C (ei pakollinen).
- Magneettitelineet mikrosentrifugiputkille (Magnesphere magnetic separation stand, FisherScientific, cat. nro. PR-Z5342 tai vastaava (1,5 ml)).
- Nukleiinihappojen eristysautomaatti (esim. King Fisher mL –laite (Thermo Fischer Scientific, cat 1508260) (ei pakollinen).
 - KingFisher muovit: putkistriipit ja kammot: KingFisher mL Combi Pack 240 97002141 240test/box) (ei pakollinen).
- Sentrifugi 15 ml putkille.
- Kertakäyttöisiä viljelysilmukoita.
- Mikrosentrifugi.
- Sekoittava lämpöblokki 60°C.
- Mikrosentrifugiputket (1,5 ml Eppendorf DNA LoBind-putket (VWR: 525–0130) tai vastaavat).
- Koeputkiravistelijä (Vortex-Genie® 1 (VWR: 444–9173) tai vastaava).
- DNA-vapaa UV-kaappi.
- DNA/RNA-vapaa UV-kaappi.
- UV-kaappi DNA:n/RNA:n käsittelylle.
- Kalibroidut mikropipetit ja niihin sopivat steriilit, filterilliset kärjet useassa tilavuudessa.
- RT-PCR-laitteistolle sopivat 96-kuoppalevyt ja sulkukalvot.

- Vaihtoehtoisesti PCR-putket korkkeineen.

Post-PCR tilan laitteet ja tarvikkeet:

- Laboratoriokäsineet, puuterittomat.
- Jääkaappi ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- Pakastin ($-18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- Rox-taustaväriä käyttävä qPCR-laitteisto.
- Kalibroidut mikropipetit ja niihin sopivat steriilit, filterilliset kärjet useassa tilavuudessa.
- Kuoppalevyille/PCR-putkille sopiva sentrifugi tai spinneri.

RNA-eristys NucliSENS eristyskitillä (Biomerieux)

1. Tehdään molekyylibiologiseen työskentelyyn sopivassa laboratoriossa.
2. NucliSENS lysipuskuri ja Wash Buffer 1 voivat muodostaa kiteitä säilytyksen aikana. Kiteet liuotetaan ennen käyttöä inkuboimalla puskureita 37°C 30 min välillä käänellen. Wash Buffer 1 voidaan avaamisen jälkeen säilyttää huoneenlämmössä kiteytymisen estämiseksi.
3. Eristysnolla otetaan mukaan aiempien negatiivikontrollien lisäksi käsittelemällä pelkät reagenssit ilman näytemateriaalia.
4. Näytesuodatin siirretään NucliSENS lysiputkeen. Putkia vorteksoidaan 30 sekuntia, inkuboidaan huoneenlämmössä 15 min ja vorteksoidaan uudelleen 30 sekuntia.
5. Suodatin nostetaan kertakäyttöisellä viljelysilmukalla puskurista ja kiinnitetään putken ja korkin väliin avaamalla suodatin putken seinää vasten ja jättämällä pieni kulma korkin väliin. Sentrifugoidaan putkia 2700 rpm 30 sekuntia. Poistetaan suodatin putkesta infektiojätteeseen.
6. Magneettipartikkelisuspensio vorteksoidaan ja lisätään 50 μl suspensiota jokaiseen näytteeseen. Suspensiota vorteksoidaan aika-ajoin näytteiden välillä, jotta se pysyisi homogeenisenä.
7. Vorteksoidaan näyte lyhyesti ja inkuboidaan näytteitä 15 min huoneenlämmössä.
8. Sentrifugoidaan näyteputkia 2 min 2700 rpm ja supernatantti poistetaan infektiojätteeseen. Magneettipartikkelit suspensoidaan 350 μl :aan Wash Buffer 1:stä.
9. Siirretään suspensio Eppendorf-putkeen.
10. Suoritetaan näytteen pesuvaiheet:
 - a. Sekoitetaan partikkeleita WB1-puskuriliuoksessa vorteksoimalla 20 s. Asetetaan näyteputki magneettitelineeseen ja poistetaan pesupuskuri infektiojätteeseen.
 - b. Suspensoidaan magneettipartikkelit 350 μl :aan WB1-liuosta. Sekoitetaan vorteksoimalla 20 s. Asetetaan näyteputki magneettitelineeseen ja poistetaan pesupuskuri infektiojätteeseen.

- c. Suspensoidaan magneettipartikkelit 500 µl:aan WB2-liuosta. Sekoitetaan vorteksoimalla 30 s. Asetetaan näyteputki magneettitelineeseen ja poistetaan pesupuskuri infektiójätteeseen.
- d. Suspensoidaan magneettipartikkelit 500 µl:aan WB2-liuosta. Sekoitetaan vorteksoimalla 30 s. Asetetaan näyteputki magneettitelineeseen ja poistetaan pesupuskuri infektiójätteeseen.
- e. Suspensoidaan magneettipartikkelit 500 µl:aan WB3-liuosta. Sekoitetaan vorteksoimalla 5 s. Asetetaan näyteputki magneettitelineeseen ja poistetaan pesupuskuri infektiójätteeseen.
- f. Suspensoidaan magneettikuulat 50 µl:aan eluutiopuskuria (Elution Buffer).

Vaiheet 8–10 voidaan suorittaa myös King Fisher-eristysautomaatilla. Tällöin:

- Asetetaan putkistriippi King Fisher-laitteen tarjottimeen ja pipetoidaan puskurit putkistriippiin kuvan osoittamalla tavalla:

Leveä muovi-reunus	Putki A:	Putki B:	Putki C:	Putki D:	Putki E:
		350 µl Wash Buffer 1	500 µl Wash Buffer 2	500 µl Wash Buffer 2	500 µl Wash Buffer 3

- Sentrifugoidaan näyteputkia 2 min 2700 rpm ja supernatantti poistetaan infektiójätteeseen. Magneettipartikkelit suspensoidaan 350 µl Wash Buffer 1, vorteksoidaan lyhyesti ja suspensio siirretään putkistripin A putkeen.
 - Asetetaan kärkikammat ja tarjotin King Fisher-laitteeseen ja käynnistetään ohjelma:
 - o Partikkeleita sekoitetaan WB1-puskuriluoksessa 20 s.
 - o Partikkelit siirretään putkeen B, joka sisältää 350 µl WB1-liuosta, sekoitus 20 s.
 - o Partikkelit siirretään putkeen C, joka sisältää 500 µl WB2-liuosta, sekoitus 30 s.
 - o Partikkelit siirretään putkeen D, joka sisältää 500 µl WB2-liuosta, sekoitus 30 s.
 - o Partikkelit siirretään putkeen E, joka sisältää 500 µl WB3-liuosta, sekoitus 5 s.
 - Pipetoidaan suspensio putkesta E puhtaaseen Eppendorf putkeen, asetetaan putket magneettitelineeseen ja poistetaan supernatantti infektiójätteeseen. Suspensoidaan magneettikuulat 50 µl eluutiopuskuria (Elution Buffer).
11. Suspensiota inkuboidaan sekoittavassa lämpöhauteessa 60°C 1400 rpm 5 min nukleiinihappojen irrottamiseksi magneettipartikkeleista.
 12. Putket asetetaan magneettitelineeseen ja supernatantti siirretään puhtaaseen Eppendorf-putkeen.
 13. Näyte voidaan säilyttää syväjässä (-80°C), jos analyysyjä ei tehdä heti.

Yksivaiheinen RT-PCR-menetelmä (Roche HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit)

1. Tehdään molekyylibiologiseen työskentelyyn sopivassa laboratoriossa, jossa on UV-kaapit sekä nukleiinihappovapaalle työskentelylle, että nukleiinihappojen käsitelyle.
2. Tehdään jokaisesta näytteestä kaksi rinnakkaista qPCR-reaktiota.
3. Näytteiden ja prosessikontrollien lisäksi ajetaan seuraavat qPCR-kontrollit:
 - a. No Template Control (NTC): qPCR-reagenssit ilman näytemateriaalia.
 - b. Inhibitiokontrolli: jokaiselle näytteelle tehdään rinnakkainen näyte lisäämällä positiivikontrollin RNA:ta näytetemplaatin joukkoon.
4. RT-PCR-reaktiota varten seuraavat reagenssit pipetoidaan PCR-putkeen tai kuoppalevyille (reagenssit pipetoidaan nukleiinihappovapaassa kaapissa ja näyte lisätään nukleiinihappotöihin sopivassa kaapissa, standardinäytteet standardisuoran määrittämiseksi pipetoidaan PCR-tilassa DNA-kaapissa):

Reagenssi:	Yhteen reaktioon:
Forward-aluke 20 µM	1,25 µl
Reverse-aluke 20 µM	1,25 µl
Koetin 10 µM	1 µl
Master mix (Roche HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit)	8,8 µl
Mn (OAc) 2 (Roche HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit)	2 µl
RNA-näyte eluutiopuskurissa	3,7 µl
Yhteensä:	18 µl

Huom! Koetin ja Master mix ovat valoherkkiä! Putket on pidettävä valolta suojattuina ja valmis reaktioseos käytettävä mahdollisimman pian.

5. Sulje putket tai kuoppalevy sopivilla korkeilla tai kalvolla ja spinnaa varovasti (putket eivät saa naarmuuntua) 2000 g 30 sekuntia.

Aseta putket/levy kvantitatiiviseen real-time-PCR-laitteeseen ja aja laitteella seuraava ohjelma:

55°C 05:00 min

60°C 05:00 min

65°C 05:00 min

50 kierrosta:

92°C 00:05 min

61°C 00:40 min

72°C 00:01 min

Tulosten käsittely

1. Menetelmän avulla on tarkoitus kvalitatiivisesti määrittää *E. coli* -bakteerin läsnäolo näytteessä.
2. Koska monet reagensseissa käytettävät entsyymit tuotetaan *E. coli* -bakteereissa, reagensseissa voi olla jäämiä soluista ja näin ollen nollanäytteet voivat myös antaa positiivisen tuloksen. Tämä otetaan huomioon tuloslaskennassa.
3. QPCR-ajosta saatava data käsitellään kullekin qPCR-laitteelle soveltuvalla ohjelmistolla. Tuloslaskentaa varten ajoista tarvitaan Ct-arvot (cycle threshold, kutsutaan myös Cq-arvoiksi).
4. Nollanäytteiden Ct-arvojen tulisi olla suurempia kuin 35.
 - a. Jos nollanäytteellä $Ct_{\text{nolla}} - Ct_{\text{näyte}} < 2 \rightarrow$ kontaminaatio.
5. Positiivikontrollien Ct-arvojen tulisi olla 24–30.
6. Näytteiden tulokset lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti: $\Delta Ct = Ct_{\text{prosessikontrolli}} - Ct_{\text{näyte}}$.
 - a. *E. coli* -bakteeria on näytteessä, kun $\Delta Ct > 2$ ja $Ct_{\text{näyte}} < 36$.
 - b. *E. coli* -bakteeria ei ole näytteessä, jos $\Delta Ct \leq 2$ ja $Ct_{\text{näyte}} > 36$.
7. Inhibitiokontrollien tulkinta:
 - a. Inhibitiokontrollinäytteen Ct-arvoja verrataan prosessikontrollin inhibitiokontrollinäytteen seen
 - i. $Ct_{\text{inhib.kontrolli+näyte}} - Ct_{\text{inhib.kontrolli+nolla}} < 2 \rightarrow$ ei inhibitiota
 - ii. $Ct_{\text{inhib.kontrolli+näyte}} - Ct_{\text{inhib.kontrolli+nolla}} \geq 2 \rightarrow$ inhibitio
 - b. Jos inhibitio havaitaan näytteessä, jossa *E. coli* -bakteeria voisi olettaa olevan, mutta jota ei qPCR:llä havaita, tulos voidaan lukea epäluotettavaksi ja analyysia jatkaa muilla menetelmillä.
 - i. Jos inhibitio havaitaan näytteessä, jossa myös qPCR:llä havaitaan *E. coli*, tulosta voidaan edelleen pitää luotettavana.

Esimerkki 1: Tuloksen laskeminen

Näyte	Näytematriisi	Δ Ct <i>E. coli</i> Assay RNA	Present/Absent	Ct näyte	Ct nolla
<i>E. coli</i> WDCM00012 6900 pmy	PC-suodatin 0,4 μ m	15,96	P	21,29	37,25
<i>E. coli</i> WDCM00012 69 pmy	PC-suodatin 0,4 μ m	9,19	P	28,05	37,25
<i>E. coli</i> WDCM00012 6900 pmy	Pelletti	15,75	P	21,49	37,25
<i>E. coli</i> WDCM00012 69 pmy	Pelletti	9,79	P	27,46	37,25
Fosfaattipuskuri, suod. 0	PC-suodatin 0,4 μ m			38,18	
Eristys-0				37,25	

Nollanäyte = . Tulos = . Ct_{näyte} RNA on keskiarvo kahdesta rinnakkaisesta näytteestä. Ct_{nolla} RNA on keskiarvo kahdesta rinnakkaisesta nollanäytteestä.

Esimerkki 2: Inhibition laskeminen

Näyte	Näytematriisi	Δ Ct <i>E. coli</i> Assay RNA	Present/Absent	Ct inhib. näyte	Ct inhib. nolla
<i>E. coli</i> WDCM00012 6900 pmy	PC-suodatin 0,4 μ m	-15,96	A	21,29	37,25
<i>E. coli</i> WDCM00012 69 pmy	PC-suodatin 0,4 μ m	-9,19	A	28,05	37,25
<i>E. coli</i> WDCM00012 6900 pmy	Pelletti	-15,75	A	21,49	37,25
<i>E. coli</i> WDCM00012 69 pmy	Pelletti	-9,79	A	27,46	37,25
Fosfaattipuskuri, suod. 0	PC-suodatin 0,4 μ m			38,18	
Eristys-0				37,25	

Nollanäyte = . Tulos = . Ct_{inhib.näyte} on rinnakkaisnäyte, johon on lisätty positiivikontrollin RNA:ta. Ct_{inhib.nolla} on rinnakkaisnolla, johon on lisätty positiivikontrollin RNA:ta.

Kirjallisuusviitteet

- Heijnen and Medema 2009; Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA.
- Xander W. Huijsdens, Ronald K. Linskens, Mariëtte Mak, Stephan G. M. Meuwissen, Christina M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, Paul H. M. Savelkoul 2002; Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR; Journal of Clinical Microbiology Dec 2002, 40 (12) 4423-4427; DOI: 10.1128/JCM.40.12.4423-4427.2002
- ISO/TS 13136; First edition 2012-11-15.
- KWR 2017.098, June 2018; Validation of a real-time RT-PCR method for rapid detection of *E. coli* in distributed drinking water.

Liite 3. Reagenssien toimivuus ja RT-PCR-olosuhdetesti

E. coli-pikamittausmenetelmän validoinnissa testattiin RT-PCR-reagenssien, sekä PCR-menetelmässä käytettävien alukkeiden ja koettimien toimivuus ja soveltuvuus THL:n Vesimikrobiologian laboratorion käyttöön. Validointi suoritettiin kahdelle KWR Watercycle Research Institutun aiemmin validoimalle RT-PCR-kitille (KWR, 2018), HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Kit (Roche, Sveitsi), sekä SensiFast cDNA Synthesis Kit ja SensiFast Probe LoROX Kit (Bioline, Yhdysvallat). Validoinnissa painotettiin menetelmän nopeutta ja helppokäyttöisyyttä, jolloin pääasiallisesti testattiin yksivaiheisen HawkZ05-kitin toimivuutta. SensiFast-kiteille tehty validointi oli huomattavasti suppeampi. HawkZ05-kitille testatut reaktioseosten koostumukset on esitetty taulukossa 1 ja ajo-olosuhteet taulukossa 2. SensiFast-kiteille testatut reaktioseosten koostumukset on esitetty taulukossa 3 ja ajo-olosuhteet taulukossa 4. RT-PCR analyysit tehtiin QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR -laitteella (Applied Biosystems, Yhdysvallat).

Taulukko 1. HawkZ05 Fast One-step RT-PCR-reaktioseosten koostumus

Reagenssi	Reaktioseos 18 µl (KWR 2018)	Reaktioseos 20 µl (Roche Molecular Systems 2012)
	Tilavuus/rxn (µl)	Tilavuus/rxn (µl)
Nukleaasivapaa vesi	-	3,2
HawkZ05 Master Mix	8,8	8,8
Manganaasiasetaatti (25 mM)	2	1,2
Etualuke (20 µM)	1,25	1
Taka-aluke (20 µM)	1,25	1
Koetin (10 µM)	1	0,8
RNA-eluaatti	3,7	4
Kokonaistilavuus	18	20

HawkZ05-RT-PCR-kittiä testattiin kahdella eri reaktioseoksen koostumuksella.

Taulukko 2. HawkZ05 Fast One-step RT-PCR-lämpöprofiilit

	Lämpöprofiili 61°C (KWR 2018)		Lämpöprofiili 60°C (Roche Molecular Systems 2012)	
	cDNA-synteesi	5 min 55°C		5 min 55°C
5 min 60°C		5 min 60°C		
5 min 65°C		5 min 65°C		
Denaturaation	50 kierrosta	5 s 92°C	45 kierrosta	5 s 92°C
Kiinnittyminen		40 s 61°C		40 s 60°C
Pidentyminen		1 s 72°C		1 s 72°C

HawkZ05-RT-PCR-kittiä testattiin kahdella eri lämpöprofiililla.

Taulukko 3. SensiFast-reaktioseosten koostumus

cDNA-synteesin reaktioseos		PCR-reaktioseos	
Reagenssi	Tilavuus/rxn (µl)	Reagenssi	Tilavuus/rxn (µl)
5x Transamp Buffer	4	Nukleaasivapaa vesi	3,5
Reverse Transcriptase	1	2x SensiMix II Probe Lo-ROX	10
Nukleaasivapaa vesi	10	Etualuke (4 µM)	2
RNA-eluaatti	5	Taka-aluke (4 µM)	2
Kokonaistilavuus	20	Koetin (4 µM)	0,5
		cDNA	2
		Kokonaistilavuus	20

SensiFast cDNA-synteesikittiä ja RT-PCR-kittiä testattiin valmistaja suosittelemilla reaktioseosten koostumuksilla (Bioline PI-50476 V7, Bioline PI-50202 V9)

Taulukko 4. SensiFast RT-PCR-lämpöprofiilit

cDNA-synteesin lämpöprofiili		PCR-lämpöprofiili			
25°C	10 min	Polymeraasin aktivaatio		95°C	2 min
42°C	15 min	40 kierrosta	Denaturaatio	95°C	10 s
85°C	5 min		Kiinnittyminen	61°C	20 s
4°C	Pito				

SensiFast cDNA-synteesikittiä ja RT-PCR-kittiä testattiin valmistaja suosittelemilla lämpöprofiileilla koostumuksilla (Bioline PI-50476 V7, Bioline PI-50202 V9)

Liite 4. Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesteissä käytetyt bakterikannat

E. coli -pikamittausmenetelmän validoinnissa inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesteissä käytetyt bakterikannat on kuvattu taulukoissa 1–3.

Taulukko 1. Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesteissä käytetyt *E. coli* -bakteerin tyyppi- ja ympäristökannat.

<i>E. coli</i> -tyyppikannat	API 20E	Ox	Gas36	Gas36 2d	Gas44	Ind44	Fluor44	Kasvu 36	Kasvu 44	Gram	Morfologia	CC
<i>E. coli</i> -tyyppikanta WDCM000012		-	+		+	+	-	+				Sin.
<i>E. coli</i> -tyyppikanta DSM 1103/WDCM000013		-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> -tyyppikanta DSM 30083/WDCM000090		-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>Shigella sonnei</i> , tyyppikanta ATCC25931	<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	g-	Sauva	Sin./viol.
<i>E. coli</i> -ympäristökannat:												
<i>E. coli</i> , jätevesi 1	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , jätevesi 2	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , jätevesi 3	<i>E. coli</i>	-	+		-	+	-	+				Sin.
<i>E. coli</i> , jätevesi 4	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , jätevesi 5	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	-	+				Sin.
<i>E. coli</i> , raakavesi	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , vedenottamo	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , verkostovesi	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , pumppaamo	<i>Kluyvera</i> spp. 84 % */ <i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.
<i>E. coli</i> , epidemia	<i>E. coli</i>	-	+		+	+	+	+				Sin.

* API 20E-tunnistus *Kluyvera* -sukuun kuuluvaksi koliformiksi oletettavasti virheellinen, sillä sama kanta on tunnistettu aiemmin API 20E-testillä *E. coli*-kannaksi. Samoin muut testit viittaavat *E. coli* -kantaan.

PROJEKTI Pikatesti elinkykyisten *E. coli* -bakteerien tunnistamiseen Suomen talousvedestä qPCR-tekniikalla Terveiden ja hyvinvoinninlaitos /
Asiantuntijamikrobiologiayksikkö / Vesimikrobiologian laboratorio

Taulukko 2. Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustesteissä käytetyt koliformisten bakteerien tyyppi- ja ympäristökannat.

Koliformisten bakteerien tyyppi- ja ympäristökannat:	API 20E	Ox	Gas36	Gas36 2d	Gas44	Ind44	Fluor44	Kasvu 36	Kasvu 44	Gram	Morfologia	CC
<i>Enterobacter aerogenes</i> DSM30053	<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	g-	Sauva	Pun.
<i>Enterobacter cloacae</i> DSM30054	<i>E. cloacae</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, pohjavesi	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83 %	-	-	-	-	-	-	+	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, talousvesikaivo	<i>Enterobacter amnigenus</i> 96,4 %	-	-	-	-	-	-	+	-	g-	Pieni sauva	Pun.
Koliformi, pohjavesi	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	g-	Sauva	Vaalea
Koliformi, talousvesi	<i>Escherichia hermannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, verkostovesi	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, raakavesi aktiivihiihluodatuksen jälkeen	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, pintavesi	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	g-	Möhkälesauva	Pun.
Koliformi, raakavesi aktiivihiihluodatuksen jälkeen	<i>Chromobacterium violaceum</i> 60,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	g-	Sauva	Tumma lila
Koliformi, pohjavesi	<i>Ewingella americana</i> 49,5 %	-	+	+	-	-	-	+	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, pohjavesi	<i>Rahnella aquatilis</i> 78,3 %	-	-	-	-	-	-	+	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, talousvesi 1	<i>Serratia fonticola</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	g-	Sauva	Pun.
Koliformi, talousvesi 2	<i>Serratia fonticola</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	g-	Sauva	Sin. halo + sin./viol. pesäke

Taulukko 3. Inklusiivisuus- ja eksklusiivisuustestissä käytetyt muut bakteerikannat

Muut testattavat kannat:	API 20E	Ox	Gas36	Gas36 2d	Gas44	Ind44	Fluor44	Kasvu 36	Kasvu 44	Gram	Morfologia	CC
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2146, WDCM 00177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g+	Kokki	Niukka pun.
<i>Enterococci</i> , jätevesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g+	Kokki	Niukka vaalea
<i>Enterococci</i> , uimavesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g+	Kokki	Niukka pun.
<i>Legionella anisa</i> ATCC 35292	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g-	Tikkumaine n sauva	Ei kasva
<i>Legianella pneumophila</i> ATCC 33152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g-	Ohut tikkumainen sauva	Ei kasva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071, WDCM 00024	-	+	-	-	-	-	-	-	-	g-	Sauva	Vaalea
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 49642	-	+	-	-	-	-	-	-	-	g-	Sauva	Hyvin niukka vaalea
<i>Pseudomonas</i> sp., rakennettu ympäristö	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	g-	Sauva	Harmaan vihreä
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 1104, WDCM 00034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g+	Kokki	Vaalea
<i>Staphylococcus aureus</i> , uimavesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g+	Kokki	Kellertävä
<i>Salmonella brededei</i> , kaivo	<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	-	-	+	-	+	g-	Sauva	Mintun vihreä