

ELINTARVIKEVÄLITTEISTEN PATOGEENIEN  
NOPEAT TUNNISTUSMENETELMÄT

Partanen Moona  
Kandidaatin tutkielma  
Ravitsemustiede  
Lääketieteen laitos  
Terveystieteiden tiedekunta  
Itä-Suomen yliopisto  
Maaliskuu 2021

Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta  
Kansanterveystieteen ja kliinisen ravitsemustieteen yksikkö  
Ravitsemustiede  
PARTANEN MOONA P: Elintarvikevälikkeisten patogeenien nopeat tunnistusmenetelmät  
Kandidaatin tutkielma, 26 sivua, 2 liitettä (2 sivua)  
Ohjaaja: TtM Kati Riekkinen  
Maaliskuu 2021

---

Elintarvikemikrobiologia, elintarvikepatogeeni, taudinaiheuttajat, tutkimusmenetelmät

## ELINTARVIKEVÄLITTEISTEN PATOGEENIEN NOPEAT TUNNISTUSMENETELMÄT

Elintarvikevälikkeisten patogeenien aiheuttamat infektiot ovat olleet kasvava huolenaihe maailmanlaajuisesti. Perinteiset elintarvikemikrobiologian tunnistusmenetelmät ovat hitaita, työläitä ja kalliita. Uusien menetelmien kehitys elintarvikevälikkeisten patogeenien tunnistamisessa on tärkeää globaalien elintarviketurvallisuuden parantamiseksi. Tutkielman tarkoituksena oli tarkastella eri elintarvikevälikkeisten patogeenien nopeita tunnistusmenetelmiä ja niiden ominaisuuksia ihanteelliseen tunnistusmenetelmään verraten. Tutkielmassa tarkasteltiin nopeita patogeenien tunnistusmenetelmiä kolmessa kategoriassa: nukleiinihappojen monistamiseen perustuvat menetelmät, biosensorimenetelmät ja immunologiset menetelmät.

Kaikki tarkasteltavat menetelmät pystyvät tunnistamaan elintarvikenäytteestä patogeenin alle kahdeksassa tunnissa. Havaitsemisrajat eri menetelmissä olivat välillä  $10^2$ – $10^5$  pmy/g. Monissa menetelmissä matriisi ja sen komponentit todettiin haastaviksi. Kaikki menetelmät vaativat joko näytteen esirikastuksen tai mittavan näytteen esikäsitteilyn. Usein myös parannettaessa menetelmän tarkkuutta ja nopeutta, menetelmän kustannukset ja helppo käytettävyys kärsivät. Menetelmien vahvuuksia ja heikkouksia on koottu tutkielman liitteenä oleviin taulukkoihin.

Ihanteellisen patogeenien tunnistusmenetelmän kriteerejä ei täytä vielä yksikään menetelmä, mutta vastaus on mahdollisesti eri menetelmien yhdistämisessä. Nanoteknologia on ottamassa jalansijaa menetelmäkehityksessä ja onkin lupaavin lähestymistapa ihanteellisen patogeenien tunnistusmenetelmän kehityksessä. Tulevaisuudessa on nähty mahdolliseksi kannettavan, nopean, tarkan ja pitkälle automatisoidun tunnistusmenetelmän kehitys eri elintarvikkeiden patogeenien tunnistukseen.

## LYHENNELUETTELO

ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys enzyme linked immunosorbent assay
LAMP	isotermaalinen LAMP-monistus loop-mediated isothermal amplification
LFIA	lateraaliseen virtaukseen perustuva immunoanalyysi lateral flow immunoassay
PCR	polymeraasiketjureaktio polymerase chain reaction
pmy	pesäkettä muodostavaa yksikköä
qPCR	reaaliaikainen PCR real-time or quantative PCR
SPR	pintaplasmoniresonanssi surface plasmon resonance
VBNC	elävä mutta ei viljeltävissä viable but nonculturable

## SISÄLTÖ

1. JOHDANTO.....	5
2. NUKLEIINIHAAPPOJEN MONISTAMISEEN PERUSTUVAT MENETELMÄT .....	7
2.1 Multiplex-PCR.....	8
2.2 Reaaliaikainen PCR (qPCR).....	8
2.3 Isotermaalinen LAMP-monistus.....	10
3. BIOSENSORIMENETELMÄT .....	12
3.1 Pintaplasmoniresonanssi (SPR) .....	13
3.2 Elektrokemialliset biosensorit.....	15
3.3 Nanoteknologia biosensorimenetelmissä.....	16
4. IMMUNOLOGISET MENETELMÄT.....	17
4.1 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA) .....	17
4.2 Lateraaliseen virtaukseen perustuva immunoanalyysi (LFIA).....	19
5. POHDINTA.....	19
6. JOHTOPÄÄTÖKSET .....	21
LÄHTEET .....	22
LIITTEET.....	25
Liite 1. Nukleiinihappojen monistamiseen perustuvat menetelmät.....	25
Liite 2. Biosensori- ja immunologiset menetelmät.....	26

## 1. JOHDANTO

Elintarvikevälitteiset patogeenit ovat mikro-organismeja, jotka pystyvät aiheuttamaan infektion ihmisessä nautitun elintarvikkeen välityksellä (Lumio 2019, Vuento 2020). Tunnetuimpia ja yleisimpiä patogeenisia bakteereja ovat *Eschericia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* ja *Bacillus cereus*. *E. coli* on näistä tunnetuin toksiinia tuottava bakteeri, joka aiheuttaa ravinnosta tai vedestä saatuna ripulin. *S. aureus* on ruokaan toksiineja tuottavista bakteereista yleisin. Kampylobakteeri- ja salmonellainfektiot aiheuttavat ruoasta saatuna ripulitautia. *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttama listerioosi on erityisesti raskaana oleville vaarallinen. Elintarvikevälitteisten patogeenien yleisimpiä tartuntalähteitä on saastunut juomavesi tai ruoka, kuten lämpimässä säilytetty salaatti tai maitotuote sekä huonosti kypsennetty ruoka. Ruoka voi kuitenkin saastua jo tuotantovaiheessa kasteluvedestä tai tuotantoeläimen ruokinnasta, jonka vuoksi koko elintarviketuotantoketjun mikrobiologinen laadunvalvonta on tärkeää (Lumio 2019, Vuento 2020).

Suomessa raportoidaan vuosittain noin 50–100 ruoasta tai vedestä saatua epidemiaa, joista useampi ihminen on sairastunut (Lumio 2019). Maailmanlaajuisesti noin 600 miljoonaa ihmistä saa vuosittain ruokavälitteisen infektion ja 420 000 kuolee siihen (WHO 2020). Tämä viittaa suureen elintarviketurvallisuutta koskevaan ongelmaan, jonka vuoksi patogeenien tunnistus elintarvikkeista on tärkeää tartuntalähteiden vähentämiseksi (Zhao ym. 2014).

Perinteisesti patogeeneja on tunnistettu viljelymenetelmillä (Foddai ja Grant 2020). Viljelymenetelmä perustuu bakteerin kykyyn lisääntyä laboratorio-olosuhteissa optimaalisessa kasvualustassa ja muodostaa näkyviä pesäkkeitä, joiden avulla voidaan todeta bakteerin olemassaolo. Menetelmään kuuluu kasvualustan inkubointi ja usein myös näytteen rikastusvaihe. Spesifisyytensä ja sensitiivisyytensä takia patogeenien viljelymenetelmiä kutsutaankin ”kultaiseksi standardiksi” Perinteiset patogeenien tunnistusmenetelmät ovat kuitenkin hitaita ja työläitä. Lisäksi perinteisen viljelymenetelmän heikkoutena on se, että se ei kykene tunnistamaan ”eläviä mutta ei viljeltävissä” (VBNC) soluja ruokanäytteistä. VBNC-tilassa olevat solut eivät kasva kasvualustassa, mutta ovat silti metabolisesti aktiivisia ja pystyvät aiheuttamaan infektion. Kyky mennä VBNC-tilaan on pystytty todentamaan yli 67 patogeenisella bakteerilla (Foddai ja Grant 2020).

Ihanteellinen patogeeniä tunnistusmenetelmä sisältää Carlson ym. (2018) mukaan kahdeksan elementtiä: (1) mahdollisimman vähän näytteen esivalmistelua, (2) kyky tunnistaa patogeeneja reaali-aikaisesti matalillakin pitoisuuksilla, (3) kyky tunnistaa useita patogeeneja, (4) monipuolinen käytettävyys, (5) edullisuus, (6) helppokäyttöisyys, (7) käytettävyys realistisissa tilanteissa sekä (8) menetelmään tarvittavien ainesosien säilyvyys. Priyanka ym. (2016) jakoi ihanteellisen tunnistusmenetelmän vaatimukset viiteen osaan: (1) korkea spesifisyys, eli menetelmä havaitsee vain halutun bakteerin näytteestä, (2) korkea sensitiivisyys, eli kyky havaita niinkin pieniä määriä bakteeria näytteestä kuin yksi solu, (3) nopea tunnistus, (4) helppokäyttöisyys ja (5) edullisuus. Ihanteellinen tunnistusmenetelmä on yksinkertaistettuna kannettava, näyte ei vaadi esikäsitelyä ja lisäksi menetelmä on sensitiivinen (Carlson ym. 2018).

Patogeenit usein esiintyvät elintarvikkeissa hyvin pieninä pitoisuuksina ( $<10^2$  pmy/g) ja ovat kyvykkäitä lisääntymään bakteerin kasvulle suotuisissa olosuhteissa (Zhao ym. 2014). Perinteisten viljelymenetelmien havaitsemisraja, eli pienin bakteerin pitoisuus, mikä voidaan varmuudella havaita näytteestä, on noin  $10^1$ – $10^2$  pmy/ml. Tähän havaitsemisrajaan myös nopeat tunnistusmenetelmät pyrkivät. Elintarvikemikrobiologian menetelmäkehityksestä tekee haastavaa muun muassa patogeeniä pienet pitoisuudet sekä tutkittavan näytematriisin monimutkaisuus (Zhao ym. 2014).

Tutkielman tarkoituksena oli tarkastella erilaisia käytettyjä menetelmiä elintarvikeväälitteisten patogeeniä tunnistamisessa verraten niitä ihanteelliseen patogeeniä tunnistusmenetelmään. Menetelmät jaettiin kolmeen kategoriaan niiden toimintamekanismin perusteella: nukleiinihappojen monistamiseen perustuvat menetelmät, biosensorimenetelmät ja immunologiset menetelmät. Jokaisesta menetelmätyypistä on esitetty esimerkkejä menetelmistä, sekä niiden sovellutuksia. Jatkuvasti kuitenkin kehitetään uusia menetelmiä usein yhdistäen kahden tai useamman menetelmän ominaisuuksia. Tutkielmassa perehdyttiin yleisimmin käytettyihin, sekä tutkituimpiin menetelmätyyppeihin. Eri menetelmien ominaisuuksia ja tutkimustuloksia on koottu liitteenä oleviin taulukkoihin (liite 1 ja liite 2).

Tiedonhaussa käytettiin PubMed - ja Elsevier -tietokantoja. Tutkimusartikkelit ovat viimeisen kymmenen vuoden ajalta, mutta pääpaino on uusimmissa tutkimuksissa. Läpi tutkielman hyödynnetään muutamaa katsausartikkeliä. Sen lisäksi joka menetelmätyypistä esitellään tutkimuksia, joissa menetelmää on testattu elintarvikkeilla tai vedellä, ja tunnistettava bakteeri on ollut patogeeniä.

## 2. NUKLEIINIHAAPPOJEN MONISTAMISEEN PERUSTUVAT MENETELMÄT

Nukleiinihappojen monistamiseen perustuvat menetelmät perustuvat tietyn DNA- tai RNA-jakson havaitsemiseen kohdepatogeenissa hybridisoimalla synteettinen oligonukleotidi kohdesekvenssiin (Law ym. 2015). Nukleiinihappojen monistamiseen perustuvien menetelmien vahvuutena on niiden spesifisyys, joka vähentää selkeästi epäselvien ja väärin tulkittujen tulosten määrää (Zhao ym. 2014).

Patogeenien tunnistamisessa polymeerasiketjureaktion (PCR) käyttö on yleistynyt runsaasti (Zhao ym. 2014). PCR toteutuu kolmessa eri vaiheessa, joissa on jokaisessa tietty toimintalämpötila. PCR alkaa DNA:n denaturoinnilla nostamalla lämpötilaa (noin 90–95 °C), jolloin DNA-juosteet erkaantuvat yksijuosteiseiksi. Erkaantuminen mahdollistaa toisen vaiheen, jossa kohdemikrobille spesifiset alukkeet, eli synteettiset DNA-fragmentit kiinnittyvät yksijuosteisiin DNA-jaksoihin lämpötilan laskiessa sopivaksi (usein 50–65 °C). Lämpötilaa tämän jälkeen nostetaan noin 70 °C:een, jolloin DNA-polymeraasi aktivoituu ja alkaa monistamaan alukkeiden tunnistamaa kohdemikrobin DNA-jaksoa. Sykli toistuu useamman kerran, jonka seurauksena alkuperäinen DNA-jakso monistuu eksponentiaalisesti. PCR:n tuotteet analysoidaan perinteisesti geelielektroforeesissa värjäämällä monistetut alukkeet etidumbromidilla (Zhao ym. 2014).

Perinteinen PCR on nopeuttanut patogeenien tunnistamiseen kuluvaan aikaan päivistä tunteihin (Priyanka ym. 2016). PCR:n on osoitettu olevan sensitiivisempi kuin perinteiset menetelmät, mutta menetelmä on edelleen hintava ja alukkeiden suunnittelu on haastavaa. PCR:n heikkouksia ovat mahdolliset vaikeudet DNA:n eristämisessä, inhibiittoreiden vaikutus monistettavaan tuotteeseen, ristikontaminaatio tai reaktion epäonnistuminen. Suurin PCR:n heikkous on riski väärille positiivisille tuloksille (Priyanka ym. 2016). Perinteistä PCR:ää on kuitenkin paranneltu käyttämällä useampia spesifisiä alukkeita reaktiossa (multiplex-PCR) ja seuraamalla PCR tuotetta reaaliaikaisesti (reaaliaikainen PCR, qPCR). Seuraavaksi tarkastellaan edellä mainittujen menetelmien lisäksi nukleiinihappoihin perustuvista menetelmistä isotermaalista LAMP-monistusmenetelmää.

## 2.1 Multiplex-PCR

Multiplex-PCR:n toimintamekanismi on samanlainen kuin perinteisen PCR:n, mutta reaktiossa monistetaan useampaa geeniä tai DNA-jaksoa samanaikaisesti käyttäen reaktiossa monistettaville jaksoille spesifisiä alukkeita (Law ym. 2015). Alukkeet ovat spesifisiä tietyille patogeenille ja menetelmällä pyritäänkin samanaikaisesti tunnistamaan useita patogeeneja samasta näytteestä. Tämä säästää aikaa, resursseja ja kustannuksia verrattuna perinteiseen yhtä aluketta käyttävään PCR:ään (Law ym. 2015). Alukkeiden suunnittelu on kriittinen vaihe multiplex-PCR:n toimivuuden kannalta (Zhao ym. 2014). Kaikilla alukkeilla on oltava sama kiinnittymislämpötila, jotta määrittäminen onnistuu. Tämän lisäksi alukkeiden välillä ei saa olla vuorovaikutusta. Suunnittelu on työlästä ja alukkeiden konsentraatioita voidaan joutua säätämään useasti (Zhao ym. 2014).

Guan ym. (2013) tutkivat multiplex-PCR:n kykyä tunnistaa viisi eri yleisintä sianlihan välityksellä tarttuvaa patogeenia. Tutkittavat patogeenit olivat *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* ja *Yersinia enterocolitica*. Näytteitä rikastettiin rikastusliemessä ja inkuboitiin yön yli. Menetelmällä onnistuttiin tunnistamaan kontaminoidusta lihasta kaikki patogeenit. Tutkimuksen mukaan havaitsemisrajan arvioitiin olevan  $10^3$  pmy/ml reaktioseoksesta.

Zhou ym. (2013) testasivat multiplex-PCR:ää GeXP-analysointilaitteella kuudelle eri ruokamyrkytyksiin yhdistettävälle patogeenille samanaikaisesti. Perinteisestä multiplex-PCR-menetelmästä poiketen tuloksia ei tarkasteltu geelielektroforeesissa, vaan GeXP-analysointilaitteella erotteli PCR:n datan koon mukaan korkean resoluution omaavalla kapillaarielektroforeesilla ja esitteli sen huippuina elektroferogrammissa. Tarkasteltavat patogeenit olivat *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Shigella* spp. ja *Campylobacter jejuni*. Havaitsemisrajan arvioitiin olevan  $10^1$ – $10^2$  pmy/ml. GeXP-PCR:n todettiin olevan nopea, sensitiivinen ja tehokas menetelmä. Suurin osa multiplex-PCR-menetelmistä käyttää tulosten tulkitsemiseen geelielektroforeesia, jonka sensitiivisyys on heikko ja käyttö vaikeuttaa suuritehoista analysointia (Zhou ym. 2013).

## 2.2 Reaaliaikainen PCR (qPCR)

Reaaliaikainen PCR, toiselta nimeltään kvantitatiivinen PCR (qPCR) eroaa perinteisestä PCR:stä tulosten analysointivaiheessa (Law ym. 2015). Menetelmässä tarkastellaan PCR-



tuotteita reaaliaikaisesti mittaamalla leimattujen koettimien tai interkaloivien väriaineiden fluoresointia. Erilaisia fluoresointiin perustuvia havaitsemismenetelmiä on kehitetty ja yleisimpiä niistä ovat SYBR-vihreä, TacMan-koettimet ja molekulaariset ”pinnit” (beacons). Reaaliaikaisen PCR-menetelmän suurin etu on PCR-tuotteen jälkikäsitteilyn pois jääminen, mikä nopeuttaa analyysiä ja vähentää kontaminaatoriskiä. qPCR myös mahdollistaa osittain kvantitatiivisen analyysin. qPCR ei kuitenkaan eroa perinteisestä PCR:stä kustannustehokkuutensa tai tarkkuutensa puolesta (Law ym. 2015).

Multiplex-PCR- ja qPCR-menetelmät on yhdistetty (multiplex-qPCR) tehokkaampaan ja tarkempaan patogeenien tunnistukseen (Lopes ym. 2018). Lopes ym. (2018) vertailivat tutkimuksessaan multiplex-qPCR:n käytettävyyttä *Salmonella* spp. -, *E. coli* - ja *S. aureus* -bakteerien tunnistamisessa. Tutkimuksessa testattiin menetelmää kolmelle eri ruokamatriisille: maidolle, jauhelihalle ja osterin lihalle. Tutkimuksessa käytettiin TacMan-koetinta qPCR-ajossa. Vertailukelpoiset tulokset viljelymenetelmälle saatiin kolmessa tunnissa. Tutkimuksessa ei julkaistu menetelmän havaitsemisrajaa, vaikka analyysillä pyrittiin saamaan kvantitatiivinen tulos. Menetelmän todettiin olevan sovelias elintarviketeollisuuden käyttöön, ja lisäksi saaduista tuloksista pystyttiin tulkitsemaan kontaminaation tyyppi kohdegeenin monistumisen määrän perusteella. Esimerkiksi isompi määrä *E. coli* -bakteerin geeniä (*phoA*) voi indikoida ulostesaastumista tai *S. aureus* -bakteerin geeni (*nuc*) voi viitata käsittelyssä tapahtuneesta kontaminaatiosta (Lopes ym. 2018).

Multiplex-qPCR-menetelmä, kuten muutkaan PCR-menetelmät, eivät sellaisenaan pysty erottelemaan eläviä ja kuolleita soluja toisistaan, mikä voi altistaa väärille positiivisille tuloksille ja siten antaa väärän kuvan näytteen mikrobikoostumuksesta (Foddai ja Grant 2020). Zhou ym. (2017) muuttivat tutkimuksessaan alustaa siten, että alusta ei ole vuorovaikutuksessa kuolleiden solujen kanssa. Alustaan lisättiin interkalaattisena väriaineena propidiummonoatsidia (PMA) sekä puhdistusaineena natriumdeoksikolaattia (SDO). Tutkimuksessa tarkasteltavat patogeenit olivat *E. coli* O157:H7 ja *Salmonella* spp. Tutkittavana matriisina oli maito. Multiplex-qPCR-menetelmän havaitsemisrajaksi tutkimuksessa saatiin molempien bakteerien osalta  $10^2$  pmy/ml, pystyen onnistuneesti erottelemaan elävät solut kuolleista. SDO-PMA-mRT-PCR todettiin tutkimuksessa olevan hyödyllinen menetelmä eroteltaessa elävät solut multiplex-qPCR-menetelmällä (Zhou ym. 2017).

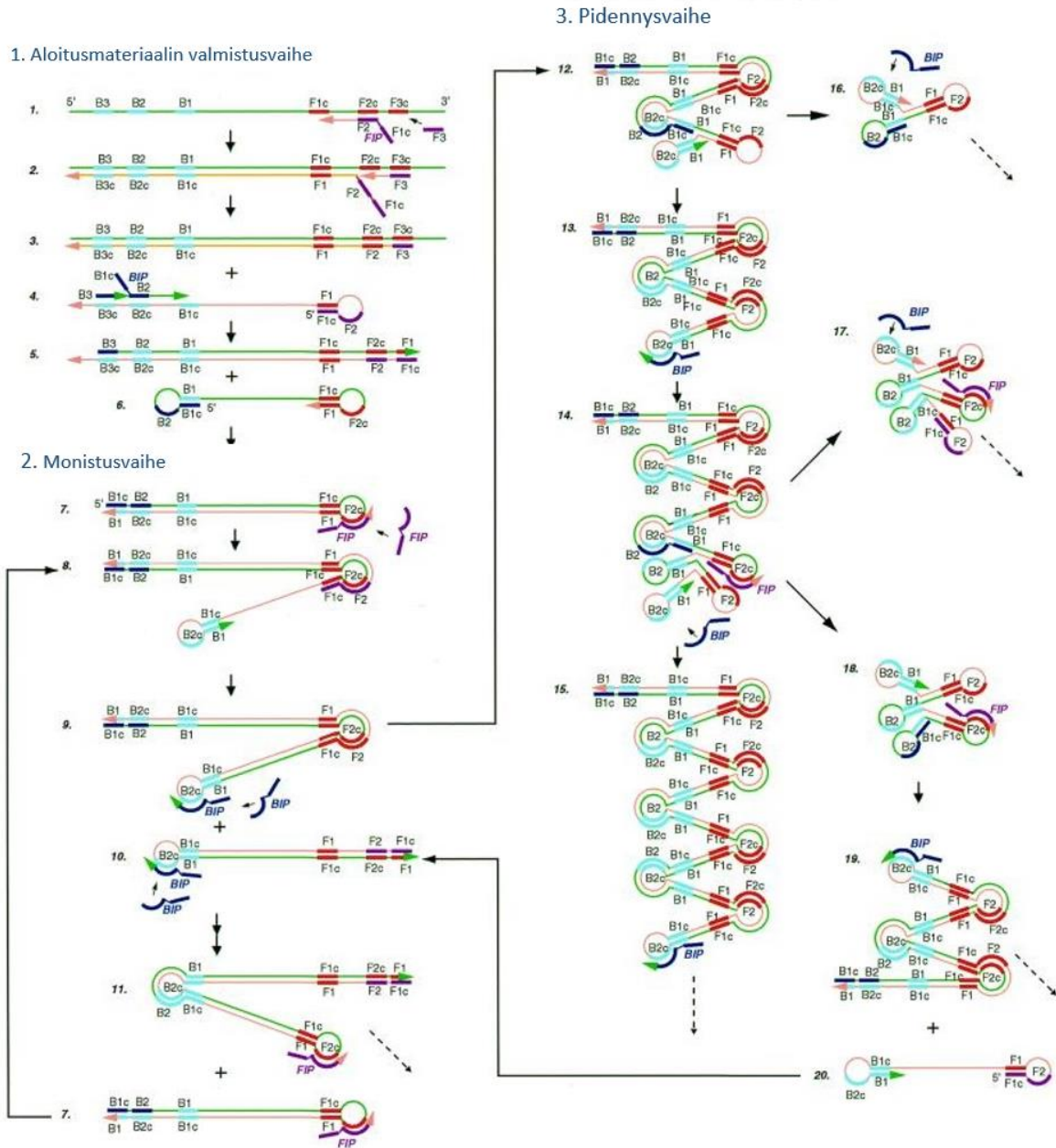
Multiplex-qPCR-menetelmä mahdollistaa reaaliaikaisen patogeenien tunnistuksen eikä vaadi PCR-tuotteen jälkikäsitteilyä (Lopes ym. 2018). Varmistus monistuksen onnistumisesta

pystytään toteamaan reaaliaikaisesti ja multiplex-qPCR-menetelmällä pystytään havaitsemaan useampia patogeeneja samanaikaisesti. Sekä tämän menetelmän että kaikkien PCR:n pohjautuvien menetelmien laitteisto on hintava ja niitä käyttämään tarvitaan osaava henkilökunta. Menetelmän tarkkuutta ja spesifisyyttä vähentää kilpaileva geenien monistus.

### 2.3 Isotermaalinen LAMP-monistus

Isotermaalinen LAMP-monistusmenetelmä perustuu syklimäiseen itsestään jatkuvaan reaktioon, joka monistaa haluttua DNA-sekvenssiä tarkasti ja nopeasti tasaisessa lämpötilassa (59 °C ja 65 °C välillä) (Zhao ym. 2014). LAMP-monistuksessa käytetään *Bacillus sterothermophilus* -bakteerista eristettyä DNA-polymeraasia, joka monistaa DNA:ta syrjäyttämällä kaksijuosteisen DNA:n toisen juosteen korvaten sitä samalla reaktioseoksessa olevien nukleotidien avulla (Notomi 2000). LAMP-monistuksessa käytetään neljää erilaista aluketta, jotka pystyvät tunnistamaan kuusi aluetta kohde-DNA:sta (Notomi 2000). LAMP-monistukseen kuuluu kolme vaihetta, joiden toimintaperiaate on esitetty kuvassa 1.

LAMP-monistus pystyy tuottamaan 1000 kertaisesti enemmän monistustuotteita 60 minuutissa verrattuna perinteiseen PCR:n eikä menetelmä vaadi suurta laitteistoa (Law ym. 2015). Monistustuotteet analysoidaan usein käyttämällä SYBR-vihreä-väriainetta ja geelielektroforeesia. LAMP-monistuksen alustan valmistus on haastavaa. LAMP-monistukseen voivat vaikuttaa matriisissa olevat inhibiittorit ja lisäksi monistustuotteiden analyysivaiheessa on kontaminaatoriski (Vichaibun ja Kanchanaphum 2020).



Kuva 1. LAMP-monistuksen periaate (Muokattu Notomi ym. 2000).

Monistuksen ensimmäinen vaihe on aloitusmateriaalin valmistusvaihe, jossa forward inner primer-alue (FIP) käynnistää reaktion, joka valmistaa DNA:sta silmukkamaisen sekvenssin (Notomi 2000). Toinen vaihe on monistusvaihe, jossa FIP ja backward inner primer-alue (BIP) kiinnittyvät muodostuneisiin silmukoihin ja DNA-polymeraasi aloittaa rakentamaan erilaisia DNA-sekvenssejä. Pidennysvaiheessa muodostuu lopullinen tuote, joka on kukkakaalimainen rakenne eri pituisia DNA-sekvenssejä.

Chen ym. (2011) tutkivat LAMP-monistusmenetelmän kykyä havaita salmonella tuoretuotteista verrattuna qPCR-menetelmään. Testattavat tuotteet olivat cantaloupe-meloni, pinaatti ja tomaatti. Menetelmään lisättiin propidiummonoatsidia (PMA), jotta havaittiin vain elävät bakteerisolut. PMA-LAMP-menetelmän analyysiaika ilman rikastusta oli kokonaisuudessaan kolme tuntia ja havaitsemisrajaksi saatiin  $6.1 \times 10^3$  pmy/g -  $6.1 \times 10^4$  pmy/g, joka oli 100 kertaa sensitiivisempi kuin PMA-qPCR-menetelmässä.

LAMP-monistuksen tulokset tulkitaan geelielektroforeesissa samalla tavalla kuin PCR:n tulokset (Law ym. 2015). Tämän ominaisuuden pohjalta on pystytty kehittämään kvantitatiivinen LAMP-monistus (qLAMP), jota Vichaibun ja Kanchanaphum (2020) vertasivat qPCR-menetelmään salmonellan tunnistamiseksi kananäytteistä. Tutkimuksessa todettiin qLAMP- ja LAMP-monistusmenetelmien olevan parempia sensitiivisyytensä ja nopeutensa puolesta kuin qPCR- ja PCR-menetelmien. LAMP-monistuksen analyysiaika oli 45–60 minuuttia, kun taas PCR:n 1,5–2 tuntia.

LAMP-monistus on todettu edellä mainituissa tutkimuksissa sensitiivisemmäksi ja spesifisemmäksi kuin PCR-menetelmät (Chen ym. 2011, Vichaibun ja Kanchanaphum 2020). LAMP-monistus on edullista ja siitä on kehitetty pienikokoisia kannettavia laitteita (Oh ym. 2016). LAMP-monistusmenetelmä todettiin lisäksi sensitiivisemmäksi ja spesifisemmäksi useammassa ruokamatriisissa kuin ISO- ja VIDAS UP-menetelmät ja tärkeäksi osaksi etenkin kehittyvien maiden elintarviketurvallisuuden valvontaa (Incili ym. 2019). LAMP-monistusmenetelmää on sovellettu muun muassa multiplex-LAMP-, qLAMP- ja *in situ* LAMP-monistusmenetelmien kehityksessä (Law ym. 2015).

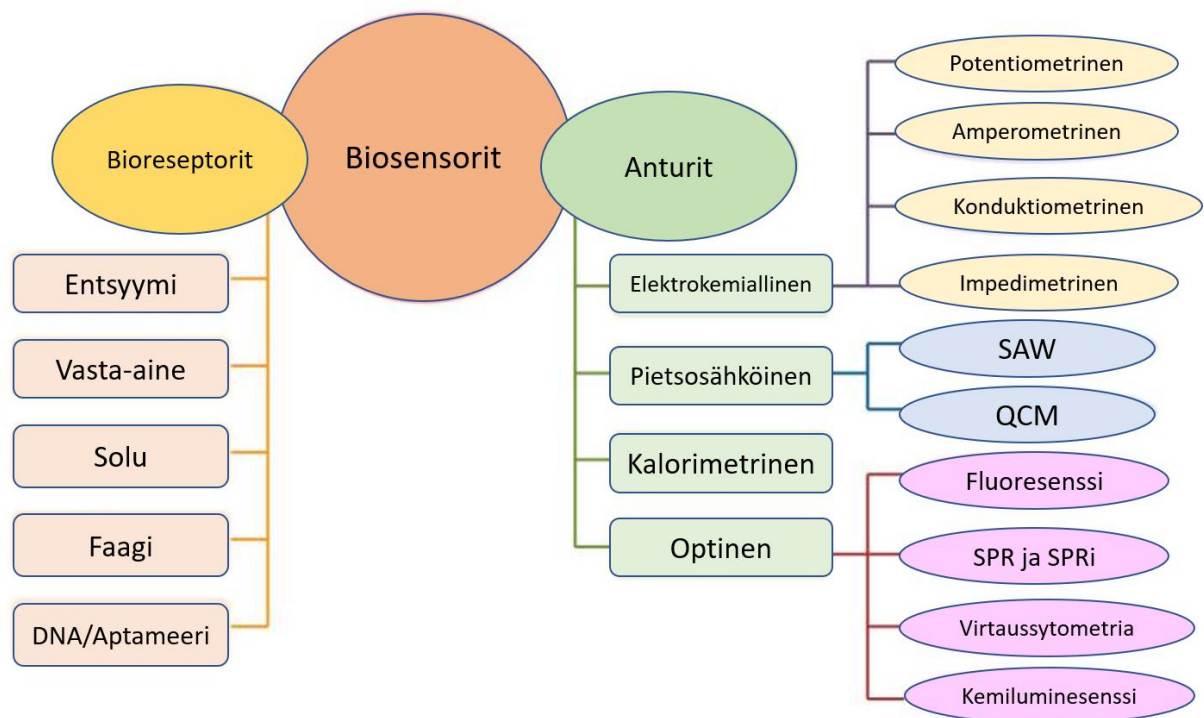
### 3. BIOSENSORIMENETELMÄT

Biosensorit ovat analyttisiä laitteita, jotka pystyvät muuttamaan biologisen vuorovaikutuksen kohdepatogeenin kanssa mitattavaksi elektroniseksi signaaliksi (Law ym. 2015). Biosensorit koostuvat kahdesta komponentista: bioreseptorista ja anturista. Bioreseptori voi tunnistaa kohdesolusta joko biologisen materiaalin kuten vasta-aineen, eristetyn materiaalin kuten aptameerin tai esimerkiksi leimatun polymeerin.

Biosensorit ovat viimeisin kehitetty tunnistusmenetelmä (Priyanka ym. 2016). Biosensorit ovat sensitiivisiä ja spesifisiä sekä biosensoreilla ei ole samoja haittapuolia kuin PCR:n perustuvilla menetelmillä. Biosensorien havaitsemisrajat ovat matalammat kuin muiden nopeiden

menetelmien. Vaikka biosensorien tunnistus on tehokkaampaa, erilaiset ruokamatriisit voivat vaikuttaa tuloksiin. Biosensoreiden käyttöön vaadittava laitteisto on myös usein hintava (Priyanka ym. 2016).

Erilaisia biosensoreita on kehitetty runsaasti. Erilaiset biosensorien reseptorit, anturit ja menetelmät on esitetty kuvassa 2. Seuraavaksi tarkastellaan optisista biosensoreista pintaplasmoniresonanssia (SPR) ja elektrokemiallisia biosensoreita sekä uusimpia edistysaskeleita nanoteknologian hyödyntämisestä biosensorimenetelmissä.



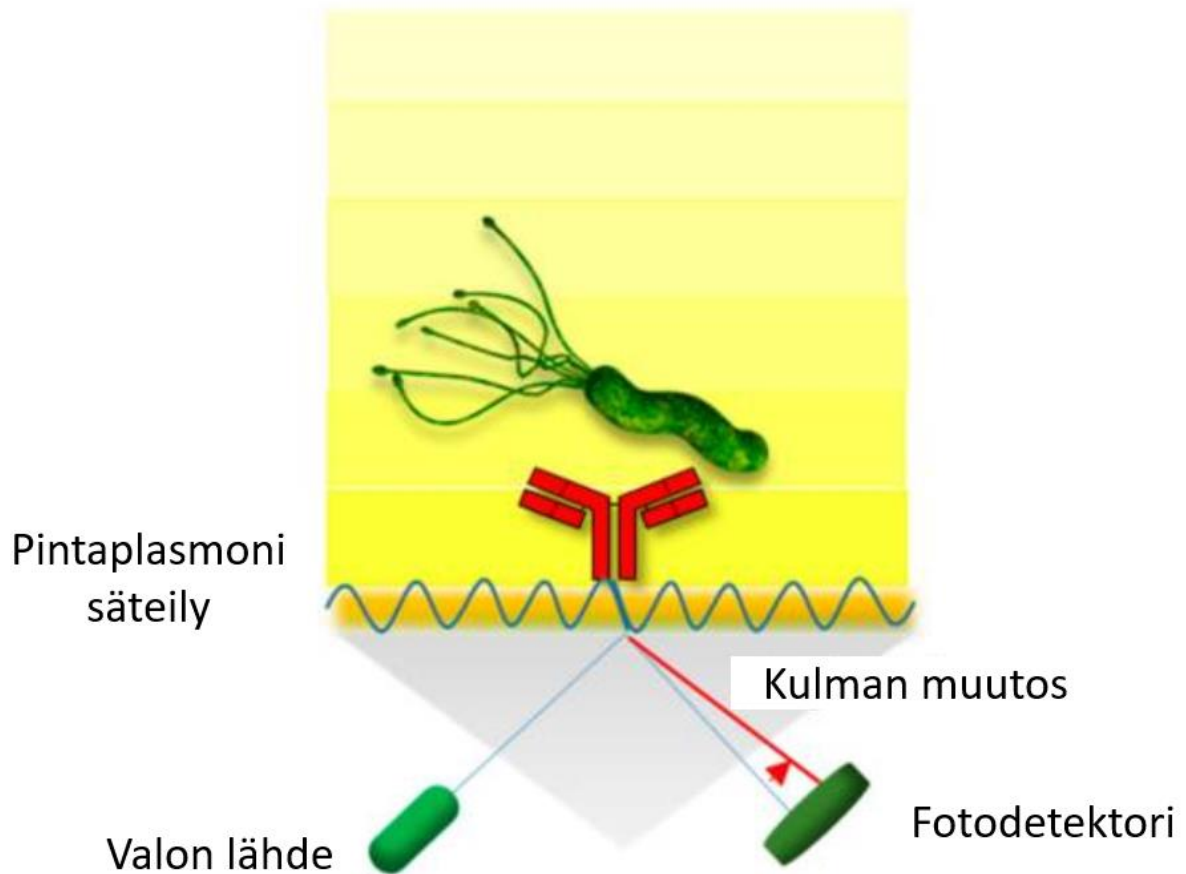
Kuva 2. Erilaiset biosensorimenetelmät (Muokattu Wu ym. 2019).

### 3.1 Pintaplasmoniresonanssi (SPR)

Yleisin optinen biosensori on pintaplasmoniresonanssi (SPR) (Cho ja Ku 2017). SPR perustuu ohuen metallipinnan päällä olevien pintaplasmonien kiihdyttämiseen ja valon säteen tulokulman muutoksen havaitsemiseen. Pintaplasmoni on metallin ja dielektrisen aineen rajapinnalla olevan sähkömagneettisen kentän muoto. Menetelmän toimintakaavio on esitetty kuvassa 3. Menetelmässä elektromagneettinen valo kohdistetaan ohuelle metallipinnalle, jolloin tämä pariutuu metallipinnan pintaplasmonisäteilyn kanssa. Metallipinnalla olevan immobilisoituneen patogeenin pariutuminen vasta-aineen tai jonkun muun bioreseptorin kanssa

muuttaa valon tulokulmaa, jonka anturi tunnistaa ja pystyy näin ollen vastaanottamaan ja analysoimaan tuloksia reaaliaikaisesti (Cho ja Ku 2017).

## Pintaplasmoniresonanssi



Kuva 3. Kaavio SPR:n toimintamekanismista (Muokattu Cho ja Ku 2017).

Mondani ym. (2014) hyödynsivät pintaplasmoniresonanssia *E. coli* O157:H7 -bakteerin tunnistamisessa rikastusvaiheen aikana. Tutkimuksessa tarkasteltiin myös stressin vaikutusta pintaplasmoniresonanssin kykyyn tunnistaa patogeeni, kuten jääkaapissa säilytyksen, suolauksen ja kuivauksen jälkeen. Menetelmää testattiin salaattilla, maidolla, vedellä ja jauhelihalle. Havaitsemisrajaksi saatiin eri näytteille  $10^1$  pmy/ml– $1,6 \times 10^3$  pmy/ml. Määrittäisaika oli kaikilla näytteillä alle seitsemän tuntia.

Nopeudestaan huolimatta SPR-menetelmän laitteisto on hintava ja kookas sekä SPR-laitteiston käyttö vaatii koulutetun henkilökunnan (Zhao ym. 2014). Näiden ongelmien ratkaisemiseksi on kehitetty pienikokoisia SPR-instrumentteja. Wang ym. (2016) kehittivät kannettavan SPR-

laitteen, jolla voidaan saada tarkkoja ja kvantitatiivisia tuloksia paikan päällä. Tutkimuksessa tarkasteltava patogeeni oli *E. coli* O157:H7 ja verrattava menetelmä oli ELISA. Havaitsemisrajaksi saatiin  $1,87 \times 10^3$  pmy/ml.

SPR:n suurin heikkous on nopea pintaplasmonin rappeutuminen (Cho ja Ku 2017). SPR:n sensitiivisyys voi olla myös matala pienen taitekerroinindeksin, hitaan diffuusiolähtöisen massan siirron tai vaikutettavan pinnan riittämättömän syvyyden vuoksi. Näihin on ratkaisuksi kehitetty paikallistettu SPR (LSPR), jossa signaalinvahvistajana toimii vasta-aineen ja nanopartikkelin konjugaatti. LSPR-konsepti mahdollistaa pienien ja edullisten biosensorisysteemien kehittämisen (Cho ja Ku 2017). Optisten biosensorien patogeeneiden tunnistus ja erottelujärjestelmä on parempi kuin muiden biosensorien (Priyanka ym. 2016). Muita optisia biosensoreita ovat muun muassa optiset kuidut ja mikrosirutekniikat (microarrays). Optiset biosensorit eivät tarvitse näytteen leimaamista.

### **3.2 Elektrokemialliset biosensorit**

Elektrokemiallinen biosensorointi perustuu kohdepatogeenille selektiivisen komponentin tunnistukseen elektrodin pinnalla, jolloin kohdepatogeenin tunnistuksen funktion signaali vahvistetaan ja analysoidaan (Zhang ym. 2019). Elektrokemialliset biosensorit voidaan jakaa amperometriin, impedimetriin, potentiometriin ja konduktimetriin biosensoreihin. Elektrokemiallisessa biosensorissa kohdepatogeeni reagoi elektrodin pinnalla olevan komponentin kanssa, jonka jälkeen elektrodi johtaa fysikaalisen tai biokemiallisen tunnistussignaalin anturiin, joka muuttaa signaalin sähköiseksi signaaliksi. Signaali analysoidaan mahdollistaen kvantitatiivisen tai kvalitatiivisen määrittelyn kohdepatogeenista (Zhang ym. 2019).

Elektrokemialliset biosensorit olivat ensimmäisiä kaupallisia biosensoreita biosensorien kehityksessä (Zhang ym. 2019). Ne kuitenkin sisältävät samat heikkoudet kuin muutkin biosensorit. Biokomponentin immobilisaation haasteena on mahdollisuus komponentin denaturaatioon tai satunnaiseen suuntaukseen. Vaikka menetelmän vakautta ja tarkkuutta on parannettava, elektrokemiallinen biosensorointi on lupaavimpia patogeeneiden nopeiden tunnistusmenetelmien kehityskohteita. Elektrokemiallisissa biosensoreissa on hyödynnetty paljon nanoteknologiaa.

### 3.3 Nanoteknologia biosensorimenetelmissä

Nanoteknologia tarkoittaa 1–100 nm kokoisten materiaalien ymmärtämistä ja manipulointia (Kumar ym. 2020). Nanomateriaalin käyttö nykyteknologiassa mahdollistaa uudenlaisen kemikaalisen, fysikaalisen ja pintakäsittelyn näkökulman. Nanopartikkelit voivat olla tulevaisuudessa vastaus kannettavaan, edulliseen ja nopeaan elintarvikeväälitteisten patogeenien tunnistamiseen. Tutkimus on kuitenkin vielä alkuvaiheessa ja nanoteknologian tulevia haasteita onkin eri ruokamatriisien inhibiittorit.

Viime vuosina biosensoroinnin sensitiivisyyttä on pyritty parantamaan hyödyntämällä nanoteknologiaa elektrodin suunnittelussa (Wu ym. 2019). Yleisimmin käytettyjä nanomateriaaleja on pelkistetty grafeenioksidi (RGO) kultananopartikkelit (AuNP) ja hiilinanoputket (CNT) (Wu ym. 2019). Nanoteknologian hyödyntäminen biosensorimenetelmissä on parantanut signaalinvälitystä ja vähentänyt monimutkaista näytteen käsittelyä (Cho ja Ku 2017).

Hasan ym. (2018) kehittivät yksiseinäisen pintahiilinanoputkielektrodin (SWCNT) ja käyttivät sitä elektrokemiallisessa biosensorissa *S. Enteritidis* - ja *S. typhimurium* -bakteerien tunnistamisessa. Havaitsemisrajaksi tutkimuksessa saatiin  $5.5 \times 10^1$  pmy/ml ja  $6.7 \times 10^1$  pmy/ml puhdasviljelmästä. Menetelmää testattiin myös kananäytteillä, joista havaitsemisrajaksi saatiin  $10^1$  pmy/ml. Menetelmän suoritus valmiiksi rikastetuista, homogenuiduista näytteistä kesti 20 minuuttia.

Chen ym. (2015) kehittivät kultananopartikkeli-beeta-galaktosidaasi-entsyymi-systeemiä hyödyntävän elektrokemiallisen menetelmän *E. coli* - ja *S. aureus* -bakteerien tunnistamiseen juomavedestä. Tutkimuksessa saatiin havaitsemisrajaksi  $10^2$  pmy/ml. Analyysiin kului aikaa yksi tunti. Menetelmän todettiin olevan validi, nopea ja edullinen patogeenien määrittämiseen juomavedestä, ja lisäksi menetelmään tarvittava laitteisto on pienikokoinen. Menetelmää ei kuitenkaan ole vielä testattu komplekseilla matriiseilla, kuten ruoalla.

Nykyiset biosensorit eivät ole tarpeeksi tarkkoja ihanteelliseksi tunnistusmenetelmäksi (Wu ym. 2019). Elektrodien kehitys onkin tärkein tutkimuskohde, jotta saataisiin alhaisempia havaitsemisrajoja elintarvikeväälitteisille patogeeneille. Nanoteknologian seuraava askel on eri nanomateriaalien yhdistäminen tunnistusmenetelmän kehityksessä.



## 4. IMMUNOLOGISET MENETELMÄT

Immunologiset menetelmät ovat laajalti käytettyjä ja sovellettuja menetelmiä elintarvikeväälitteisten patogeenien tunnistamisessa (Law ym. 2015). Immunologiset menetelmät perustuvat pääasiassa vasta-aineen ja antigeenin vuorovaikutukseen. Vuorovaikutuksen vahvuus määrittelee käytetyn menetelmän sensitiivisyyden ja spesifisyyden. Immunologisia alustoja on kehitetty niiden nopeuden, kustannustehokkuuden ja helppouden vuoksi.

Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA) on edelleen eniten käytetty immunologinen menetelmä (Priyanka ym. 2016). Uusimmista sovellutuksista liittyen elintarvikemikrobiologisiin analyysihin tarkastellaan lateraaliseen virtaukseen perustuvaa immunoanalyysia (LFIA).

Monenlaisia immunologisia määryksiä on kehitetty samaa periaatetta käyttäen. Esimerkiksi Kim ym. (2018) kehittivät magneettisiin helmiin perustuvan immunologisen määrytysmenetelmän, joka kykeni samanaikaisesti havaitsemaan *E. coli* -, *Salmonella* spp. - ja *S. aureus* -bakteerin erilaisista eläinperäisistä ruokanäytteistä jopa  $10^1$  pmy/g havaitsemisrajalla. Monissa biosensorimenetelmissä käytetään myös vasta-aineen ja antigeenin vuorovaikutusta mitattavana ominaisuutena (Kim ym. 2018).

Vasta-aineen puhtaus ja spesifisyys on tärkeimpiä asioita määrytyksen onnistumisen kannalta (Priyanka ym. 2016). Polyklonaaliset vasta-aineet, eli saman antigeenin eri epitoppeihin sitoutuva vasta-aineseos, vaikuttavat määrytyksen spesifisyyteen ja sensitiivisyyteen. Immunologisissa menetelmissä on suurempi riski vääriin positiivisiin tuloksiin kuin muissa käsitellyissä menetelmissä. Immunologiset menetelmät ovat herkkiä matriisin koostumukselle ja viskositeetille. Etenkin rasvapitoisuus ja happamuus vaikuttavat menetelmän havaitsemisrajoihin (Kim ym. 2018).

### 4.1 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)

ELISA perustuu usein silmin havaittavaan värin muutokseen, joka indikoi antigeenin läsnäoloa (Priyanka ym. 2016). Vasta-aineseen tai antigeeniin on liitetty konjugaatti, joka reagoi liuoksessa olevan substraatin kanssa tuottaen värillisen reaktiotuotteen. Yksi useimmin käytettyjä substraatti-konjugaatti yhdistelmistä on tetrametyylibentsidiini ja

piparjuuriperoksidaasi. ELISA on ollut vuosikymmeniä kliinisen mikrobiologian käytössä, mutta se ei ole yhtä laajassa käytössä elintarvikemikrobiologiassa.

Kerros-ELISA (sandwich ELISA) on muokattu ELISA-menetelmä, jossa käytetään kahta vasta-ainetta yhden antigeenin tunnistukseen (Zhao ym. 2014). Zhu ym. (2016) kehittivät kerros-ELISA-menetelmän *B. cereus* -bakteerin tunnistukseen maitonäytteistä. Menetelmä onnistui havaitsemaan bakteerin useilla patogeeneilla kontaminoidusta lihanäytteestä havaitsemisrajalla  $0,9 \times 10^3$  pmy/g. Kerros-ELISA:n sensitiivisyys ja spesifisyys on paljon parempi kuin perinteisen ELISA:n.

Nanoteknologiaa on hyödynnetty myös ELISA:n kehityksessä. Shen ym. (2014) yhdistivät funktionaaliset nanopartikkelit ja ELISA:n FNP-ELISA:ksi pyrkiessään havaitsemaan *E. coli* O157:H7 -bakteeria elintarvikkeista. Testatut ruokamatriisit tutkimuksessa olivat kontaminoitu maito, vihannes ja jauheliha. Havaitsemisrajat ruokanäytteistä olivat  $6,8 \times 10^2$  pmy/ml -  $6,8 \times 10^3$  pmy/ml. Koko menetelmäprosessi kesti vain kolme tuntia.

Pang ym. (2018) kehittivät edullisen, nopean, sensitiivisen ja kannettavan paperipohjaisen ELISA:n (p-ELISA) ja testasivat sitä *E. coli* O157:H7 -bakteerin tunnistukseen kiinankaalinäytteistä. Havaitsemisrajaksi tutkimuksesta saatiin  $10^4$  pmy/ml. Tutkimuksessa verrattiin p-ELISA-menetelmää tavanomaiseen ELISA:an ja p-ELISA:n todettiin olevan yli puolet halvempi, nopeampi ja tarkempi kuin tavanomainen ELISA. Menetelmä on soveltuva paikan päällä tapahtuvaan näytteiden analysointiin muun muassa kehitysmaissa.

ELISA on menetelmänä tarkka ja spesifinen (Law ym. 2015). Se pystyy havaitsemaan laajan kirjon erilaisia bakteereita ja suuria määriä toksiineja. Menetelmä sisältää kuitenkin riskin ristireaktiivisuuteen samankaltaisten antigeenien kanssa. Menetelmä on herkkä matriisin ominaisuuksille sekä bakteerin elinkelpoisuudelle. Menetelmä vaatii koulutetun henkilökunnan ja riski väärin positiivisiin tuloksiin on suhteessa suuri. ELISA-menetelmää hyödyntäen on kehitetty useita kaupallisia välineitä elintarvikkeiden patogeenimäärytyksiin, kuten VIDAS, Assurance EIA sekä BIOLINE (Law ym. 2015). Kaupallisia menetelmiä on validoitu monenlaisille ruokanäytteille ja eri patogeeneille.

## 4.2 Lateraaliseen virtaukseen perustuva immunoanalyysi (LFIA)

LFIA on immunomääritys -menetelmä, jossa näyte liikkuu kapillaariliikkeen myötä värjättyä reagenssia kohti (Zhao ym. 2014). Reagenssi on antigeeni tai vasta-aine, joka on leimattu joko kolloidilateksilla tai kultahiukkasella. Reagenssi sekoittuu näytteen kanssa ja johdattaa näytteen alueelle, jossa on spesifinen vasta-aine tai antigeeni. Värjätty reagenssi yhdistyy alueen vasta-aineeseen tai antigeenin värjäten viivan tai alueen. LFIA:n on tarkoitus antaa visuaalinen vastaus 2–10 minuutin sisällä määrittämisen aloittamisesta.

Pan ym. (2018) kehittivät parannetun LFIA:n, jossa käytetään kultananopartikkeleita (AuNPs) värimarkkerina tunnistamaan *Cronobacter zakazakii* -bakteeria äidinmaidonkorvikkejauheesta. LFIA:ta muutettiin niin, että kultananopartikkelit paransivat havaitsemisignaalia. Myös vasta-aineen konsentraatiota lisättiin, jotta saataisiin lisättyä reaktioherkkyyttä patogeenin antigeenin kanssa. Paranneltu versio onnistui tunnistamaan patogeenin herkkyydellä  $10^3$  pmy/ml määrittämisen kestäessä kuusi tuntia, kun taas perinteinen LFIA tunnistoi patogeenin havaitsemisrajalla  $10^5$  pmy/ml yhdeksässä tunnissa.

LFIA on menetelmänä halpa, nopea, yksinkertainen ja kannettava (Law ym. 2015). Menetelmä on saatavilla muun muassa kaupallisina mittatikkaina ja immunokromatografisina nauhoina. Menetelmä on kuitenkin herkkä muille matriisin komponenteille ja vaatii näytteen mittavaa esikäsittelyä. Spesifisten antigeenien tai vasta-aineiden teko ja leimaaminen on työlästä, ja havaitsemisrajat ovat suhteellisen korkeita. Menetelmä on suunniteltu vain yksittäisiä testejä varten, eikä sovellu suurille näytemäärille esimerkiksi teollisuuteen.

## 5. POHDINTA

Nukleiinihappojen monistamiseen perustuvista menetelmistä PCR:n pohjautuvat menetelmät ovat luoneet vankan perustan elintarvikkeissa esiintyvien patogeenien nopeaan tunnistamiseen. LAMP-menetelmä on kuitenkin ottamassa jalansijaa uutena, tarkempaan ja nopeampaan menetelmänä. Menetelmät ovat luotettavia ja soveltuvat suurien näytemäärien analysointiin. Menetelmät tunnistavat tehokkaasti VBNC-tilassa olevat solut. Nukleiinihappojen monistamiseen perustuvat menetelmät vaativat koulutetun henkilökunnan ja usein kalliin laitteen. Myös alustojen kehitys on työlästä. Niin PCR- kuin LAMP-menetelmä tuhoaa tarkasteltavan näytteen. Menetelmät vaativat näytteen esirikastuksen ja mittavan esikäsittelyn.

Biosensorimenetelmät ovat mikrobiologisen menetelmäkehityksen tärkeimpiä kehityskohteita johtuen niiden nopeudesta, tarkkuudesta ja alhaisista havaitsemisrajoista. Biosensorimenetelmien sovellutuksia voidaan kehittää lukemattomia määriä niiden monien eri bioreseptori ja anturi yhdistelmien takia. Biosensorimenetelmät tarjoavat erinomaisen menetelmäpohjan nanoteknologian hyödyntämiselle. Muita menetelmiä pystytään yhdistämään ja soveltamaan biosensorimenetelmien kanssa ihanteellisen tunnistusmenetelmän kehityksessä. Optiset biosensorit ja elektrokemialliset biosensorit ovat lupaavimpia biosensorimenetelmiä, vaikka ne vaativat vielä tällä hetkellä mittavan näytteen esikäsittelyä. Biosensorit ovat erityisen alttiita matriisin inhibiittoreille, eivätkä ne ole vielä tarpeeksi tarkkoja ihanteelliseen tunnistusmenetelmään verraten. Biosensorien laitteisto on usein sekä hintava että kookas.

Immunologisten menetelmien perusta on laajassa käytössä niin biosensorimenetelmissä kuin immunologisissa menetelmissä. ELISA-menetelmä on yleisin käytetty immunologinen menetelmä, josta kehitetään jatkuvasti uusia sovellutuksia. Yksi uusimmista immunologisten menetelmien alustoista on LFIA, joka pystyy antamaan tuloksen jopa muutamassa minuutissa, mutta se ei sovellu suurille näytemäärille. Immunologiset alustat ovat helppokäyttöisiä, edullisia ja kannettavia, jonka vuoksi niistä on tehty paljon kaupallisia paikan päällä käytettäviä alustoja. Immunologisten menetelmien havaitsemisrajat ovat kuitenkin korkeampia kuin muiden tunnistusmenetelmien sekä ne vaativat mittavaa näytteen esikäsittelyä. Riski väärin positiivisiin tuloksiin immunologisissa menetelmissä on suurempi verrattuna muihin tässä tutkielmassa käsiteltyihin menetelmiin.

Useissa elintarvikepatogeenien tunnistusmenetelmän kehitykseen tähtäävissä tutkimuksissa käytettiin esikäsiteltyjä näytteitä. Näytteet olivat usein esianalysoitu tai steriloitu muun mikrobiflooran varalta ja sen jälkeen kontaminoitu valitulla bakteerilla halutulle havaitsemistasolle. Suurilla näytemäärillä samankaltainen esikäsittely ei ole käytännöllistä. Rutiininomaisesti tutkittavissa elintarvikenäytteissä mahdollisesti olevat patogeenit eivät aina ole yhtä elinkelpoisia kuin keinoitekoisesti kontaminoiduissa näytteissä, jolloin tutkimustulokset eivät välttämättä ole sellaisenaan sovellettavissa rutiininomaisesti suoritettaviin toistuviin analyysimittauksiin. Analysoitavia elintarvikematriiseja on lukematon määrä, minkä vuoksi elintarvikemikrobiologian menetelmäkehitys on haasteellista. Elintarvikkeet vaihtelevat muun muassa rasvapitoisuuden, pH:n, liukoisuuden ja muun mikrobiflooran suhteen, minkä vuoksi yksittäisestä tutkimuksesta saatuja tuloksia ei voida soveltaa suoraan eri matriisien analysointiin. Nämä ominaisuudet myös usein luovat perusteen näytteen esikäsittelylle, joka taas pidentää analyysiaikaa, nostaa kustannuksia ja vaikeuttaa

analyysia. Muita syitä esikäsittelylle on näytteen matriisin monimutkaisuus, menetelmän havaitsemisrajat, näytteen määrän rajoitukset sekä patogeenisolujen elinkelpoisuus (Dwivedi ja Jaykus 2011). Esikäsittelyyn usein vaaditaan rikastusvaihe, jolloin voidaan saada patogeenimäärityksestä ainoastaan kvalitatiivisia tuloksia ja analyysiaika pitenee. Monissa tarkastelluissa tutkimuksissa ei ollut otettu menetelmän suorittamiseen kuluneessa ajassa huomioon näytteen rikastukseen kuluva aikaa.

## **6. JOHTOPÄÄTÖKSET**

Yleisesti ottaen nopeat patogeenien tunnistusmenetelmät ovat selektiivisempiä, spesifisempiä, nopeampia, työvoimaa säästävämpiä sekä luotettavampia kuin perinteiset viljelymenetelmät. Nopeat tunnistusmenetelmät mahdollistavat myös paikan päällä tapahtuvan analysoinnin, joka on erityisen tärkeää esimerkiksi kehitysmaissa.

Nanoteknologia on ottamassa jalansijaa menetelmäkehityksessä ja sitä on alettu soveltamaan eri menetelmätyyppeihin lupaavin tuloksin. Erityisesti kultananopartikkelit ovat herättäneet kiinnostusta. Nykytekniikan ja nanotekniikan hyödyntäminen uusien menetelmien kehityksessä on lupaavin lähestymistapa ihanteellisen tunnistusmenetelmän kehityksessä. Myös eri menetelmien yhdistelmä on arvioitu olevan vastaus ihanteellisen tunnistusmenetelmän kehitykseen.

Kaikki tarkastellut menetelmät vaativat joko rikastusvaiheen tai mittavan näytteen esikäsittelyn. Tärkeimpiä tutkimuskohteita onkin selvittää, miten matriisin vuorovaikutus käytetyn menetelmän kanssa saataisiin minimoitua. Esikäsittely on edelleen työlästä sekä kriittinen vaihe analysoinnin onnistumisen kannalta.

Vielä ei ole kehitetty menetelmää, joka täyttäisi kaikki ihanteellisen tunnistusmenetelmän ehdot. Tulevaisuuden mahdollisuudet ovat kuitenkin lupaavat, ja mikrobiologian menetelmäkehitys tutkimusalana ei koskaan ole valmis.

## LÄHTEET

- Carlson K, Misra M, Mohanty S. Developments in Micro- and Nanotechnology for Foodborne Pathogen Detection. *Foodborne Pathog Dis* 2018;15:16-25.
- Chen J, Jiang Z, Ackerman JD, ym. Electrochemical nanoparticle–enzyme sensors for screening bacterial contamination in drinking water. *Analyst* 2015;140:4991-4996.
- Cho I, Ku S. Current Technical Approaches for the Early Detection of Foodborne Pathogens: Challenges and Opportunities. *Int J Mol Sci* 2017;18:2078.
- Dwivedi HP, Jaykus L. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:40-63.
- Foddai ACG, Grant IR. Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104:4281-4288.
- Guan ZP, Jiang Y, Gao F, Zhang L, Zhou GH, Guan ZJ. Rapid and simultaneous analysis of five foodborne pathogenic bacteria using multiplex PCR. *Eur Food Res Technol* 2013;237:627-637.
- Hasan MR, Pulingam T, Appaturi JN, ym. Carbon nanotube-based aptasensor for sensitive electrochemical detection of whole-cell Salmonella. *Anal Biochem* 2018;554:34-43.
- Incili GK, Koluman A, Aktüre A, Atasalan A. Validation and verification of LAMP, ISO, and VIDAS UP methods for detection of Escherichia coli O157:H7 in different food matrices. *J Microbiol Methods* 2019;165:105697.
- Kim J, Yoo JG, Ham J, Oh M. Direct Detection of Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Salmonella spp. in Animal-derived Foods Using a Magnetic Bead-based Immunoassay. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2018;38:727-736.
- Kumar H, Kuča K, Bhatia SK, ym. Applications of Nanotechnology in Sensor-Based Detection of Foodborne Pathogens. *Sensors (Basel)* 2020;20:1966.
- Law JW, Ab Mutalib N, Chan K, Lee L. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol* 2015;5:770.
- Lopes ATS, Albuquerque GR, Maciel BM. Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Quantification of Salmonella spp., Escherichia coli, and Staphylococcus aureus in Different Food Matrices: Advantages and Disadvantages. *Biomed Res Int* 2018;2018:1-12.
- Lumio J. Ruokamykytys. Duodecim Terveyskirjasto 2019.  
[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00608](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00608) (luettu 23.1.2021)

- Mondani L, Roupioz Y, Delannoy S, ym. Simultaneous enrichment and optical detection of low levels of stressed *Escherichia coli* O157:H7 in food matrices. *J Appl Microbiol* 2014;117:537-546.
- Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28:63e-63.
- Oh SJ, Park BH, Jung JH, ym. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection. *Biosens Bioelectron* 2016;75:293-300.
- Pan R, Jiang Y, Sun L, ym. Gold nanoparticle-based enhanced lateral flow immunoassay for detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *J Dairy Sci* 2018;101:3835-3843.
- Pang B, Zhao C, Li L, ym. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection. *Anal Biochem* 2018;542:58-62.
- Priyanka B, Patil R, Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian J Med Res* 2016;144:327-338.
- Shen Z, Hou N, Jin M, ym. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles. *Gut Pathog* 2014;6:14.
- Vichaibun V, Kanchanaphum P. Quantitative LAMP and PCR Detection of *Salmonella* in Chicken Samples Collected from Local Markets around Pathum Thani Province, Thailand. *Int J Food Sci* 2020;2020:1-6.
- Vuento R. *Kampylobakteerin, salmonellan, shigellan ja EHEC-bakteerin aiheuttamat suolistotulehdukset*. Duodecim Terveyskirjasto 2020. [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01187](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01187) (luettu 23.1.2021)
- Wang S, Xie J, Jiang M, ym. The Development of a Portable SPR Bioanalyzer for Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Sensors (Basel)* 2016;16:1856.
- WHO. World Health Organization. Food Safety. WHO 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (luettu 23.1.2021)
- Wu Q, Zhang Y, Yang Q, Yuan N, Zhang W. Review of Electrochemical DNA Biosensors for Detecting Food Borne Pathogens. *Sensors (Basel)* 2019;19:4916.
- Zhang Z, Zhou J, Du X. Electrochemical Biosensors for Detection of Foodborne Pathogens. *Micromachines (Basel)* 2019;10:222.
- Zhao X, Lin C, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol* 2014;24:297-312.
- Zhou B, Liang T, Zhan Z, Liu R, Li F, Xu H. Rapid and simultaneous quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in milk through multiplex real-time PCR. *J Dairy Sci* 2017;100:8804-8813.

Zhou B, Xiao J, Liu S, ym. Simultaneous detection of six food-borne pathogens by multiplex PCR with a GeXP analyzer. *Food control* 2013;32:198-204.

Zhu L, He J, Cao X, Huang K, Luo Y, Xu W. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food. *Sci Rep* 2016;6:16092.



## LIITTEET

Liite 1. Nukleiinihappojen monistamiseen perustuvat menetelmät

Menetelmä	Vahvuudet	Heikkoudet	Tutkitut patogeenit	Havaitsemisraja	Lähteet
Multiplex-PCR	Sensitiivinen	Näytteen mittava esikäsittely	<i>S. enterica</i> ,	10 <sup>1</sup> –10 <sup>2</sup> pmy/ml.	(Law ym. 2015),
	Spesifinen	Ei tunnista eläviä ja kuolleita	<i>E. coli</i> O157:H7,	10 <sup>3</sup> pmy/ml	(Zhou ym. 2013),
	Automaattinen	soluja toisistaan	<i>L. monocytogenes</i> ,		(Guan ym. 2013)
	Luotettava	Työläs alustan suunnittelu	<i>S. aureus</i> ,		
	Pystyy tunnistamaan	Matriisin inhibiittorit	<i>Shigella</i> spp.,		
	useita patogeeneja	vaikuttavat	<i>Campylobacter jejuni</i>		
	samanaikaisesti				
qPCR	Nopea	Kallis	<i>E. coli</i> O157:H7,	10 <sup>2</sup> pmy/ml	(Law ym. 2015),
	Mahdollistaa osittain	Matriisi vaikuttaa analyysiin	<i>Salmonella</i> spp.		(Zhou ym. 2017)
	kvantitatiivisen tuloksen	Ristikontaminaation riski			
	Ei jälkikäsittelyä	Vaatii koulutetun henkilökunnan			
	Spesifinen ja sensitiivinen				
LAMP-monistus	Edullinen	Alukkeen suunnittelu	<i>Salmonella</i>	6.1×10 <sup>5</sup> pmy/g-	(Law ym. 2015),
	Helppokäyttöinen	haastavaa		6.1×10 <sup>4</sup> pmy/g	(Vichaibun ja Kanchanaphum
	Sensitiivinen ja spesifinen	Ei erota kuolleita ja eläviä soluja toisistaan			2020), (Chen ym. 2011)
	Nopea	Matriisin inhibiittorit vaikuttavat			
	Kontaminaatoriski	Kontaminaatoriski			
	analyysivaiheessa	analyysivaiheessa			

## Liite 2. Biosensori- ja immunologiset menetelmät

Menetelmä	Vahvuudet	Heikkoudet	Tutkitut patogeenit	Havaitsemisraja	Lähteet
SPR	Nopea Ei vaadi näytteen leimaamista Spesifinen	Kallis Osat rappeutuvat nopeasti Ruokamatriisi vaikuttaa huomattavasti	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i>	$1,87 \times 10^3$ pmy/ml, $10^5$ pmy/ml	(Zhao ym. 2014), (Priyanka ym. 2016), (Cho ja Ku 2017)
Elektrokemialliset biosensorit	Sopii suurille näyte määrittelylle Automaattinen Ei vaadi näytteen leimaamista Nopea ja sensitiivinen	Ei tarpeeksi spesifinen Ruokamatriisi vaikuttaa Esikäsitteily voi denaturoida näytteen	<i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	$10^2$ pmy/ml 10 pmy/ml	(Chen ym. 2015), (Hasan ym. 2018), (Zhang ym. 2019)
ELISA	Spesifinen Automaattinen Sopii suurille näyte määrittelylle Soveltuu paikan päällä tapahtuvaan näytteiden analysointiin	Ei tarpeeksi sensitiivinen Väärin negatiivisten tulosten riski suhteellisen suuri Ristireaktiivisuuden riski Vaatii osaavan henkilökunnan Vaatii esirikastuksen ja näytteen leimaamisen Herkkä matriisin ominaisuuksille	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> O157:H7	$6,8 \times 10^2$ pmy/ml – $6,8 \times 10^3$ pmy/ml, $10^4$ pmy/ml, $0,9 \times 10^3$ pmy/g	(Shen ym. 2014), (Law ym. 2015), (Zhu ym. 2016), (Pang ym. 2018)
LFIA	Edullinen Luotettava Helppokäyttöinen Spesifinen	Vaatii näytteen leimaamisen Herkkä matriisin komponenteille Vaatii mittavan esikäsitteilyn Ei soveltu suurien näyttemäärien analysointiin	<i>Cronobacter zakazakii</i>	$10^3$ pmy/ml	(Zhao ym. 2014), (Law ym. 2015), (Pan ym. 2018)