

Opinnäytetyö AMK

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2016

Janne Nevalainen

PIKORNAVIRUSTEN TYYPITYS KLIINISISTÄ NÄYTTEISTÄ RT- QPCR -MENETELMÄLLÄ

Janne Nevalainen

PIKORNAVIRUSTEN TYYPITYS KLIINISISTÄ NÄYTTEISTÄ RT-QPCR -MENETELMÄLLÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja testata vuokaaviota, jonka avulla voidaan kliinisistä näytteistä tunnistaa ja tyypittää entero-, rino- tai parechovirusia. Vuokaaviossa käytetään kvantitatiivista käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktio (RT-qPCR) -menetelmää. Erilaisia alukkeita ja ajo-ohjelmia käyttämällä virus tunnistetaan ja PCR-tuote sekvensoimalla ja analysoimalla saadaan selville kunkin pikornavirusnäytteen tyyppi. Työssä vertailtiin ensin virus-RNA:n eristysmenetelmiä käyttäen ns. ENRI-menetelmää ja tunnettuja enterovirusnäytteitä. Eristyskittejä vertailtiin RT-qPCR-laitteen antamaan Ct-arvoon perustuen ja sopivinta eristysmenetelmää käytettiin työssä. Työn aikana analysoitiin 71 kpl THL:n FinOM Cohort study -tutkimuksessa kerättyä näytettä, joiden oletettiin sisältävän virusta. Vuokaaviossa edettiin seuraavasti: Virus-RNA:t (vRNA) eristettiin ja ne analysoitiin ENRI-testillä. ENRI-testissä positiivisiksi osoittautuneet näytteet analysoitiin VP4/2-testillä rinovirusten tyypittämiseksi (ns. rinotyypitys) ja enterovirusten tunnistamiseksi. VP4/2-alueen sekvensointitulosten perusteella enterovirusista tehtiin vielä VP1-testi (ns. enterotyypitys) sekvensoimalla VP1-alueesta tuotettu PCR-pala. ENRI-negatiiviset näytteet tutkittiin parechovirusten osalta ns. PAR-ENRI-testissä. PAR-ENRI:ssä positiivisen tuloksen tuottaneet näytteet tyypitettiin. Parechotyypitystestissä oikeankokoiset PCR-tuotteet lähetettiin sekvensoitavaksi. Sekvenssejä verrattiin geenipankin sekvensseihin ja lähin samankaltainen sekvenssi osoitti näytteen tyyppin. Työn aikana saatiin tyypitettyä kaikki entero-, rino- ja parechovirus-positiiviset näytteet, joita oli yhteensä 28 kpl. Näytteistä kaksi tyypitettiin rinovirusiksi, kuusi parechovirusiksi ja loput 20 näytettä enterovirusiksi.

ASIASANAT:

rinovirus, enterovirus, parechovirus, virustyypitys, RT-qPCR.

Janne Nevalainen

TYPING OF PICORNAVIRUSES FROM CLINICAL SAMPLES BY RT-QPCR METHOD

The purpose of this thesis was to develop and test a workflow which would allow the typing of viruses from a fairly large number of samples. The workflow should enable virus typing from clinical samples if the viruses are either entero-, rhino- or parechoviruses. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the primary method used in the workflow. The use of different primers and run protocols allows the production of different PCR products that can be sequenced and analyzed. First different methods for extraction of virus-RNA (vRNA) were compared using so called ENRI protocol and known enterovirus samples. The performance of each extraction method was determined based on the Ct value obtained by RT-qPCR. The most appropriate method was used to prove the effectivity of the workflow. In this study 71 samples from the FinOM Cohort study by National Institute for Health and Welfare (Finland) were analyzed using the workflow. In the workflow the samples were subjected to an ENRI test after vRNA extraction. If a sample was positive in the ENRI test, a VP4/2-test was conducted in order to type rhinoviruses (so called rhinotyping) and to identify enteroviruses. If the VP4/2 sequencing result indicates enterovirus, a VP1-test (so called enterotyping) was performed. If a sample was negative in ENRI test, a parecho-ENRI (PAR-ENRI) test was conducted. If a sample was positive in the PAR-ENRI test, parechotyping was performed in order to type the parechovirus. The obtained sequences were compared to GenBank sequences in order to obtain the type name for the virus sample. The closest match in the GenBank indicates the virus type. Out of 71 clinical samples 28 were typed as a picornavirus. Two rhinoviruses, six parechoviruses and 20 enteroviruses were identified, respectively.

KEYWORDS:

rhinovirus, enterovirus, parechovirus, virus typing, RT-qPCR

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	7
1 JOHDANTO	1
2 PIKORNAVIRUKSET	3
3 RT-QPCR -MENETELMÄ	4
3.1 Vuokaavio	5
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	6
4.1 RotorGene Q -laite	6
4.2 Virus-RNA:n eristysmenetelmät	6
4.3 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)	7
4.4 Virukset ja virus-plasmidit	7
4.5 Käytetyt alukkeet	7
4.6 ENRI-testi	8
4.7 PAR-ENRI-testi	10
4.8 Tyypitys RT-qPCR-testit	11
5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	14
5.1 Virus-RNA:n eristys	14
5.2 ENRI-testin ja PAR-ENRI-testin herkkyyskoe	17
5.3 Kliinisten näytteiden analysointi ENRI- ja PAR-ENRI-menetelmillä	21
5.4 Tyypitys-RT-qPCR:t kliinisistä näytteistä	21
5.5 Sekvenssien analyysit	27
6 LOPUKSI	32
LÄHTEET	34

KAAVAT

Kaava 1. Työssä testattava vuokaavio	2
--------------------------------------	---

KUVAT

Kuva 1. Enteroviruksen rakennekuva. ²	3
Kuva 2. A. enteroviruksen genomi B. parechoviruksen genomi (kuvaa muokattu) ^{2,4}	5
Kuva 3. ENRI-ajon kuvaajat. Kuvassa vihreällä on ZR Viral RNA Kit, punaisella QIAamp Viral RNA Mini Kit ja sinisellä E.Z.N.A. Viral RNA Kit.	14
Kuva 4. ENRI-ajon melt-käyrät. vasemmalla E7 ja oikealla Rigmir	14
Kuva 5. Eristysmenetelmien vertailu. Kokeessa käytettiin Rigmir-virusta.	15
Kuva 6. Eristysmenetelmien vertauksen melt-käyrät. Kokeessa käytettiin Rigmir-virusta.	16
Kuva 7. ENRI-herkkyystestin standardisuora.	18
Kuva 8. ENRI-herkkyystestin kuvaaja	18
Kuva 9. ENRI-herkkyystestin melt-käyrät. Vihreä 10^1 , punainen 10^0 , oranssi 10^{-2} ja musta qPCR aqua.	18
Kuva 10. PAR-ENRI herkkyystestin standardisuora.	20
Kuva 11. PAR-ENRI herkkyystestin kuvaaja.	20
Kuva 12. PAR-ENRI herkkyystestin melt-käyrät. Punainen 10^1 , vihreä 10^0 , musta 10^{-1} ja qPCR aqua sininen.	20
Kuva 13. Yhden rinotyyppityksajan Ct- ja melt-käyrät.	22
Kuva 14. Osa rinotyyppityksen tuotteista geelillä. Numerosarjat ovat näytetunnuksia.	22
Kuva 15. esimerkki kahdesta Ct-käyrästä rinotyyppityksessä. Numerosarjat ovat näytetunnuksia	23
Kuva 16. esimerkki kahdesta melt-käyrästä rinotyyppityksessä. Numerosarjat ovat näytetunnuksia.	23
Kuva 17. enterotyyppityksen Ct- ja melt-käyrät.	25
Kuva 18. Osa enterotyyppityksen PCR-tuotteista geelillä.	25
Kuva 19. Parechotyyppityksen Ct-käyrät.	26
Kuva 20. Parechotyyppityksen melt-käyrät.	26
Kuva 21. parechotyyppityksen PCR-tuotteet geelillä.	26

TAULUKOT

Taulukko 1. Työssä testatut eristysmenetelmät.	6
Taulukko 2. Työssä käytetyt alukkeet.	8
Taulukko 3. ENRI-menetelmän RT-reaktioseos.	9
Taulukko 4. ENRI-testin qPCR-reaktioseos.	9
Taulukko 5. ENRI:n qPCR ajo-ohjelma.	10
Taulukko 6. PAR-ENRI:n RT-reaktioseos.	10
Taulukko 7. PAR-ENRI:n qPCR-reaktioseos.	11
Taulukko 8. PAR-ENRI:n qPCR ajo-ohjelma.	11
Taulukko 9. Tyypityksen RT-reaktioseos.	12
Taulukko 10. Tyypityksen qPCR-reaktioseos.	12
Taulukko 11. Tyypityksen qPCR ajo-ohjelma.	13
Taulukko 12. Eristystestin Ct-arvot.	15
Taulukko 13. Rigvirillä tehdyn menetelmien vertailun Ct-arvot.	16
Taulukko 14. Kittien hinnat	16
Taulukko 15. ENRI-herkkyystestin Ct-arvot.	17
Taulukko 16. PAR-ENRI:n herkkyystestin Ct-arvot	19
Taulukko 17. Parechotypityksen tulokset.	27
Taulukko 18. Rinotypityksen tulokset. Taulukossa ovat vain rinovirusiksi todetut näytteet.	28
Taulukko 19. Enterotypityksen tulokset.	29
Taulukko 20. Osa entero- ja rinovirusten tuloksista poimittuna.	30
Taulukko 21. Parechovirusten tuloksia.	31

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
cDNA	komplementaarinen DNA (engl. complementary DNA)
qPCR	kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (engl. quantitative polymerase chain reaction)
PBS	puskuriliuos (engl. phosphate-buffered saline)
RT	käänteiskopiointi (engl. reverse transcription)
ssRNA	yksijuosteinen RNA (engl. single-stranded RNA)
vRNA	virus-RNA

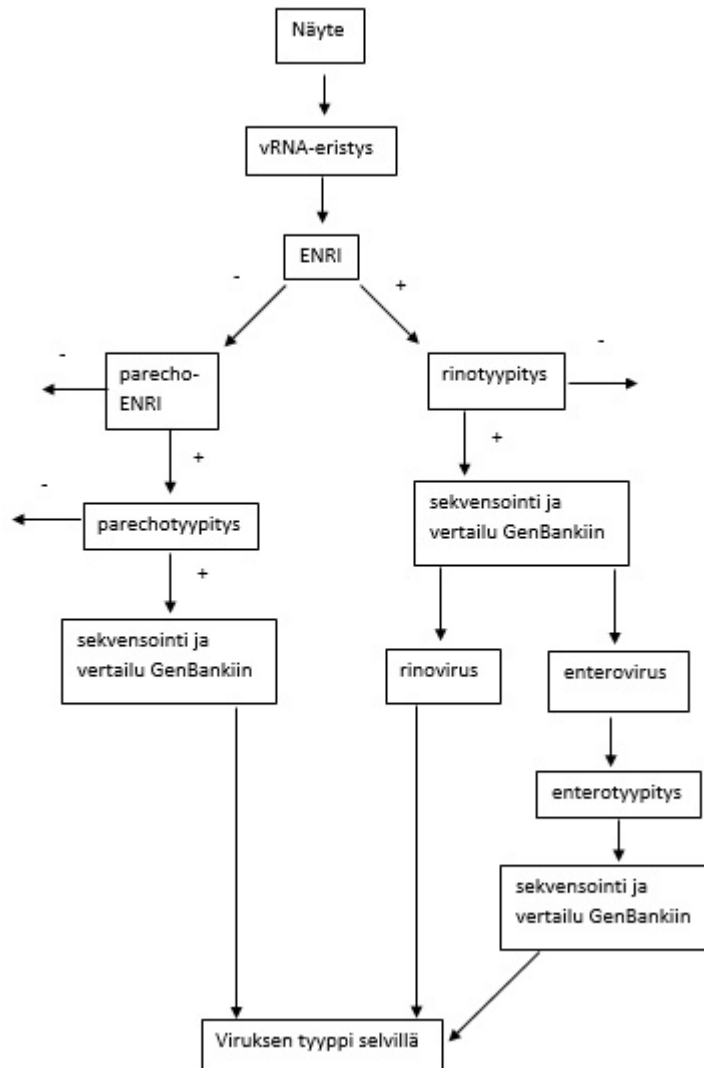
1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää vuokaavio entero-, rino- ja parechovirusten tunnistamiseksi ja tyypittämiseksi suurehkosta lukumäärästä klinisiä näytteitä.

Vuokaaviossa käytetään hyödyksi useita aiemmin esiteltyjä ja testattuja diagnostisia RT-qPCR -menetelmiä. Toimivuuden osoittamiseksi työssä pyrittiin tunnistamaan ja tyypittämään 71 virusnäytettä. Näytteet olivat peräisin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) FinOM Cohort study -tutkimuksesta. Näytteet olivat vuosilta 1995-1997 ja ennakkotietoina oli, että ne ovat happostabiileja, adenovirusnegatiivisia, Hela Ohio -solulinjassa kasvatettuja viruksia.

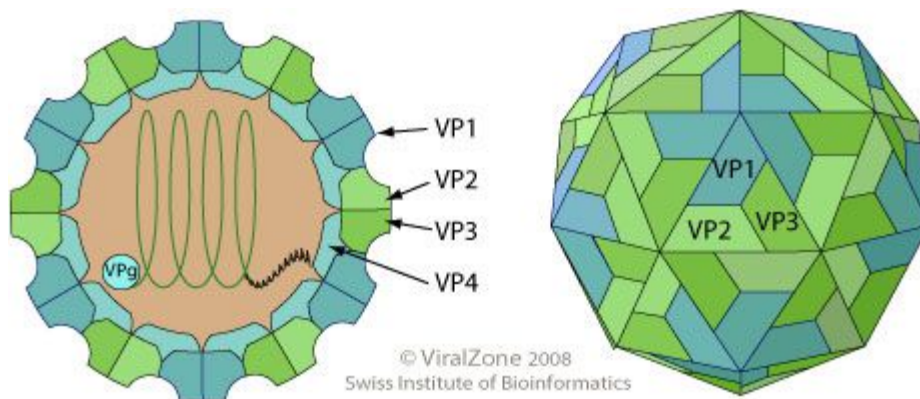
Lisäksi työssä testattiin kaupallisia vRNA:n eristysmenetelmiä sopivimman menetelmän löytämiseksi. Työ tehtiin Turun yliopiston Virusopin oppiaineessa, AIROPico-projektissa.

Kaava 1. Työssä testattava vuokaavio



2 PIKORNAVIRUKSET

Entero-, rino- ja parechovirukset kuuluvat *Picornaviridae*-heimoon, joka on jaettu 31 sukuun. Entero- ja rinovirukset kuuluvat *Enterovirus*-sukuun ja parechovirukset kuuluvat *Parechovirus*-sukuun.¹ *Enterovirus*-suvun virusten genomi on 7200-8500 emäsparia pitkä yksijuosteinen positiivissäikeinen RNA (+ssRNA), joka on ikosahedraalisen kapsidin sisällä. Kapsidi koostuu neljästä erilaisesta polypeptidistä (VP1-VP4), jotka muodostavat 60 protomeeria (Kuva 1). Halkaisijaltaan kyseiset virukset ovat noin 30 nm.² Rinovirukset replikoituvat hengitysteissä ja aiheuttavat useimmiten vain tavallisia lieviä ylähengitystieinfektioita. Lisäksi rinovirusten on todettu vaikuttavan astman puhkeamiseen. Enterovirukset pystyvät replikoitumaan muun muassa ohutsuolessa ja voivat aiheuttaa vakaviakin tauteja esimerkiksi poliota. Useimmat enterovirustartunnat ovat oireettomia tai aiheuttavat flunssan kaltaisia oireita.³



Kuva 1. Enteroviruksen rakennekuva.²

Parechovirusten genomi on 7300 emäsparia pitkä ja sekin on +ssRNA. Kapsidirakenne on muuten samanlainen kuin enteroviruksilla, mutta parechoviruksilla VP2 ja VP4 ovat rakenteessa VP0-fuusioproteiinina.⁴ Parechovirukset aiheuttavat lapsille hengitystie- ja keskushermostoinfektioita.⁵ Lisäksi parechovirukset aiheuttavat ripulia.⁶

3 RT-QPCR -MENETELMÄ

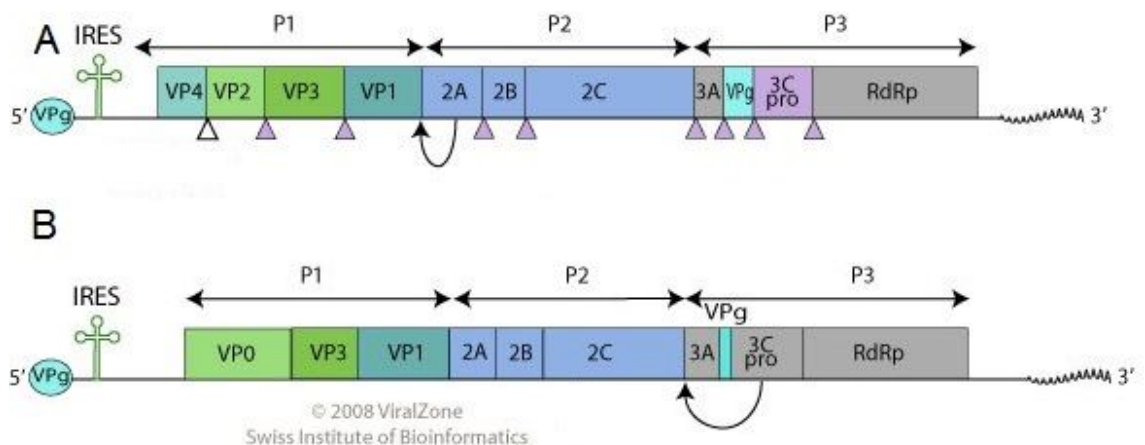
Työssä käytetyssä vuokaaviossa käytettiin kaksivaiheista RT-qPCR-menetelmää näytteen analysoinnissa. Kaksivaiheisessa menetelmässä RNA käännetään DNA:ksi erillisessä putkessa, josta tuote siirretään PCR-reaktioon. Yksivaiheisessa RT-qPCR:ssä sekä käänteistranskriptio että PCR tapahtuvat samassa putkessa. Tämän työn tapauksessa kohde, jota halutaan monistaa, on virus-RNA:ta (vRNA), joten se tulee kääntää ensin yksijuosteiseksi komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), jota voidaan monistaa qPCR-laitteella. Komplementaariseksi DNA:ksi vRNA:ta transkriptoidaan käyttämällä RT-entsyymiä. Genomin kohta, jonka entsyymi kääntää voidaan määrittää ns. reverse-primerilla (tunnetaan myös antisense-primerina). Samaa reverse-primeria käytetään RT-reaktion jälkeisessä PCR-reaktiossa.⁷ Valitsemalla primerit ja ajo-ohjelman oikein saadaan monistettua genomista spesifistä aluetta, jolla on diagnostinen merkitys. Esimerkiksi analysoitaessa näytettä entero- ja rinovirusten tunnistamiseksi, primerit on suunniteltu niin, että PCR-reaktio monistaa noin 120 emäsparia pitkän DNA-pätkän kyseisten virusten genomin ei-koodaavalta 5'-alueelta, joka on näillä viruksilla hyvin konservoitu.³ Ajo-ohjelmassa on yleensä kolme vaihetta:

1. denaturaatio. Lämpötila on tällöin yleensä yli 90 °C
2. primereiden kiinnittymisvaihe (engl. annealing). Lämpötila on 50-75 °C
3. pidentymisvaihe (engl. extension, elongation). Lämpötila 65-72 °C⁸

Näitä vaiheita toistetaan tarvittava määrä. Laite, jolla qPCR-reaktio tehdään, pystyy mittaamaan kaksijuosteisen DNA:n määrä kunkin syklin lopussa. Tässä työssä käytettiin SYBR Green -väriainetta, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han.³ Mitä enemmän DNA:ta kunkin syklin lopussa on, sitä suurempi on signaali. Ajon loppuksi laitteelle asetetaan raja-arvo, joka on noin 1/10 suurimman käyrän korkeudesta. Tämä raja-arvo määrittää Ct-arvot, joiden perusteella voidaan määrittää, missä näytteessä oli eniten virus-RNA:ta.⁹ Ajossa voidaan myös käyttää standardinäytteitä, joiden kopioluku tiedetään ja joista laite laskee näytteen kopioiden määrän. Standardeja käyttämällä voidaan myös verrata ajoja toisiinsa ja saada tietoa pipetoinnin onnistumisesta. Työssä käytettävällä RotorGene Q -laitteella voidaan lisäksi mitata DNA:n sulamispiste eli melt-arvo, jonka perusteella on mahdollista arvioida, minkälainen virus näytteessä on, jos tiedetään virustyypikohtainen melt-arvo.³ Melt-pisteessä DNA-kaksoisjuoste avautuu, jolloin SYBR Green irtoaa ja fluoresenssin muutos havaitaan.⁹

3.1 Vuokaavio

Opinnäytetyössä käytettiin viittä erilaista RT-qPCR-menetelmää tuntemattomien näytteiden tunnistamiseksi ja pikornavirustyyppin selvittämiseksi. Ensimmäiseksi näytteistä ajettiin ns. ENRI. Tällä selvitettiin, oliko näytteessä entero- tai rinovirusia.³ Jos näyte oli ENRI-positiivinen, niin siitä ajettiin ns. rinotyyppitys (VP4/2 -tyypitys). VP4/2-tyypityksellä genomista monistetaan VP4-VP2-aluetta (Kuva 2A). Tämän alueen sekvenssistä voidaan määrittää rinoviruksen tyyppi. Myös enteroviruksen genomia monistuu VP4/2-tyypityksessä käytettävillä primereilla, mutta tätä aluetta ei voida käyttää enterovirusten tyyppittämiseen.¹⁰ Tyypityksestä saatava PCR-tuote sekvensoitiin ja analysoitiin. Jos näyte oli rinovirus, niin näytteen tyyppi oli saatu selville. Enteroviruksen tapauksessa näytteestä piti tehdä ns. enterotyyppitys (VP1-tyypitys), jonka PCR-tuotetta sekvensoimalla ja analysoimalla saatiin selville enteroviruksen tyyppi.¹¹ ENRI:ssä negatiivisista näytteistä ajettiin ns. PAR-ENRI, jolla selvitettiin, onko näytteessä parechovirusia.¹² PAR-ENRI:ssä positiivisista näytteistä tehtiin ns. parechotyyppitys, jonka avulla saatiin selville parechoviruksen tyyppi. Parechotyyppitys tehdään VP3:n ja VP1:n väliseltä alueelta (Kuva 2B).¹³ Mikäli näytettä ei saatu tyyppitettyä se jäi tuntemattomaksi. Sekvensointi tehtiin käyttämällä GATC Biotech:n LIGHTrun-palvelua. Sekvenssien analyysit tehtiin GenBank:n internetsivujen BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -työkalua käyttäen.



Kuva 2. A. enteroviruksen genomi B. parechoviruksen genomi (kuva muokattu)^{2,4}

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 RotorGene Q -laite

Tässä työssä käytettiin Qiagenin RotorGene Q -laitetta. Kyseisellä laitteella voidaan ajaa samanaikaisesti 72 näytettä. Laite pystyy mittaamaan fluoresenssia kuudella eri kanavalla eli kuudella eri fluoresoivalla aineella. Tässä työssä käytettiin vain SYBR Green -ainetta. Signaalin kehittymistä voidaan seurata reaaliaikaisesti tietokoneen ruudulta. Laite antaa Ct-arvon. Mitä pienempi Ct-arvo, sitä enemmän kohde-RNA:ta näytteessä oli.

4.2 Virus-RNA:n eristysmenetelmät

Työssä testattiin neljää eri vRNA:n eristysmenetelmää. Niiden suorituskykyä vertailtiin ENRI-testiä käyttämällä.

Taulukko 1. Työssä testatut eristysmenetelmät.

Valmistaja	Menetelmän nimi
Qiagen	QIAamp Viral RNA Mini Kit
Omega Bio-tek	E.Z.N.A. Viral RNA Kit
Zymo Research	ZR Viral RNA Kit
Biomerieux	easyMAG

Menetelmistä easyMAG eroaa muista, sillä kyseessä on automatisoitu laite, jolla voidaan kerralla eristää 24 näytettä. Tämän näytemäärän eristämiseen käyttäjältä kuluu 15 minuuttia. Laitteessa nukleiinihapot tarttuvat magneettisiin silikapartikkeleihin.¹⁴ Muissa menetelmissä eristys perustuu nukleiinihappojen kiinnittymiseen silikamembraaniin. ZR Viral RNA Kit eroaa muista siten, ettei eristämisessä käytetä ns. carrier-RNA:ta.^{15,16,17}

4.3 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)

Agaroosigeelielektroforeesilla varmistettiin, että tyyppitys-PCR-ajoissa syntyy vain yhtä ja halutunkokoista tuotetta. Kvantitatiivisessa PCR:ssä käytetty SYBR Green -väriaine tarttuu kaikkiin PCR:n aikana muodostuviin kaksinauhaisiin DNA-paloihin, joten se voi antaa väärää positiivisia tuloksia.

4.4 Virukset ja virus-plasmidit

Eristysmenetelmiä vertailtaessa käytettiin kasvatettuja echovirus 7 (E-7) Wallace- ja Rigvir-virusnäytteitä. ENRI-testissä käytettiin standardisuoraa varten E-7-plasmidia ja positiivisena RT-kontrollina E-7:n eristettyä RNA:ta. Lisäksi rinoviruskontrollina käytettiin HRV-1B-transkriptia kahdella pitoisuudella 1:100 ja 1:1000. PAR-ENRI:ssä standardisuoran saamiseksi käytettiin HPeV-1 plasmidia ja positiivisena kontrollina HPeV-1-viruksesta eristettyä RNA:ta. Tyyppityksissä käytettiin kuhunkin ajoon sopivaa plasmidia standardisuoraa varten. Vuokaavion toimivuuden todistamisessa käytettiin THL:n FinOM Cohort study -tutkimuksesta saatuja 71:ä näytettä. Näytteet oli kerätty vuosina 1995-1997 ja ne oli kasvatettu HelaOhio –solulinjassa ja ne oli määritetty happostabiileiksi ja adenovirusnegatiivisiksi.

4.5 Käytetyt alukkeet

Taulukossa 2 on työssä käytettyjen alukkeiden sekvenssit. R tarkoittaa ns. reverse-aluketta ja F ns. forward-aluketta. Käytettyjen alukkeiden konsentraatio oli 10 µM.

Taulukko 2. Työssä käytetyt alukkeet.

Alukkeen nimi	Sekvenssi
ENRI 4- (R)	5'-GAAACACGGACACCCAAAGTA-3'
ENRI 3+ (F)	5'-CGGCCCTGAATGCGGCTAA-3'
HPeV-F31 (F)	5'-CTGGGGCCAAAAGCCA-3'
HPeV-K30 (R)	5'-GGTACCTTCTGGGCATCCTTC-3'
VP4/2 T7-HEV/HRV OS (F)	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCGGCCCCT- GAATGYGGCTAA-3'
VP4/2 HRV/HEV OAS (R)	5'-ACATRTTYTSNCCAAANAYDCCCAT-3'
T7-AN89 (F)	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCAGCACTGA- CAGCAGYNGARAYNGG-3'
AN88 (R)	5'-TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT-3'
T7-HPeV-OS (F)	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAYAAT- GCYATMTAYACWATYTGTGA-3'
HPeV-IAS (R)	5'-DGGYCCATCATCYTGWGCTGA-3'

4.6 ENRI-testi

ENRI-testissä käytettiin seuraavia reaktioseoksia ja ajo-ohjelmaa. Tilavuudet ovat yhtä putkea kohden käytetty määrä.

Taulukko 3. ENRI-menetelmän RT-reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl)
Aqua	13,9
5*puskuri (Promega, M-MLV Reverse Transcriptase 5 x reaction Buffer)	8
dNTP mix 10 µM (2,5 µM kutakin nukleotidia)	8
ENRI 4-, reverse-primer 10 µM (Oligomer)	4,9
RNasin inhibiittori (Promega, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor)	0,1
RT-entsyymi (Promega, M-MLV Reserve Transcriptase RNase H Minus)	0,1
Näyte	5
Yhteensä	40

Putkia inkuboitiin 1 h 42 °C:seessa, jonka jälkeen putkesta otettiin PCR:ssä tarvittava määrä qPCR-seokseen (Taulukko 4).

Taulukko 4. ENRI-testin qPCR-reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl)
Aqua	6,5
ENRI 4- 10 µM (Oligomer)	0,5
ENRI 3+ 10 µM (Oligomer)	0,5
Maxima SYBR Green (Thermo Scientific, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x))	12,5
RT-tuote/plasmidi	5
Yhteensä	25

Taulukossa 4 esitetty reaktioseos laitettiin putkissa qPCR-laitteeseen ja ajettiin taulukossa 5 esitetyllä ajo-ohjelmalla.

Taulukko 5. ENRI:n qPCR ajo-ohjelma.

Lämpötila	Aika	Vaihe	Sykliden määrä
+ 95 °C	10 min	PCR-entsyymien aktivointi	1
+ 95 °C	15 s	denaturaatio	45
+ 65 °C	30 s	kiinnittyminen	45
+ 72 °C	40 s	pidennys/mittaus	45
+ 72 °C -> +95 °C		sulatus eli melt-pisteen mittaus	1

4.7 PAR-ENRI-testi

PAR-ENRI-testissä käytettiin seuraavia reaktioseoksia ja ajo-ohjelmaa. Tilavuudet ovat yhtä putkea kohden käytetty määrä.

Taulukko 6. PAR-ENRI:n RT-reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl)
Aqua	13,9
5*puskuri (Promega, M-MLV Reverse Transcriptase 5 x reaction Buffer)	8
dNTP mix 10 µM (2,5 µM kutakin nukleotidia)	8
HPeV-K30, reverse-primer 10 µM (Oligomer)	4,9
RNasin inhibiittori (Promega)	0,1
RT-entsyymi (Promega, M-MLV Reserve Transcriptase RNase H Minus)	0,1
Näyte	5
Yhteensä	40

Putkia inkuboitiin 1 h 42 °C:ssä, jonka jälkeen putkesta otettiin tarvittava määrä qPCR-seokseen.

Taulukko 7. PAR-ENRI:n qPCR-reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl)
Aqua	6,5
HPeV-K30 10 µM (Oligomer)	0,5
HPeV-F31 10 µM (Oligomer)	0,5
KAPA SYBR FAST Universal Mix (Kapa Biosystems)	12,5
RT-tuote/plasmidi	5
Yhteensä	25

Taulukossa 7 esitetty reaktioseos laitettiin putkissa qPCR-laitteeseen ja ajettiin taulukossa 8 esitetyllä ajo-ohjelmalla.

Taulukko 8. PAR-ENRI:n qPCR ajo-ohjelma.

Lämpötila	Aika	Vaihe	Sykliden määrä
+ 95 °C	5 min	PCR-entsyymin aktivointi	1
+ 95 °C	10 s	denaturaatio	45
+ 70 °C	30 s	kiinnittyminen	45
+ 72 °C	20 s	pidennys/mittaus	45
+ 72 °C -> +95 °C		sulatus eli melt-pisteen mittaus	1

4.8 Tyypitys RT-qPCR-testit

Tyypitys RT-qPCR-testeissä käytettiin seuraavia reaktioseoksia ja ajo-ohjelmia.

Taulukko 9. Tyypityksen RT-reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl)
5x Improm II -puskuri (Promega)	2
25 mM MgCl ₂ (Promega)	1
dNTP mix 10 µM (2,5 µM kutakin nukleotidia)	2
RNAasi-inhibiittori (Promega)	0,5
Improm-II –RT-entsyymi (Promega)	0,5
Kussakin tyypityksessä käytettävä R-primer	1
Näyte	3
Yhteensä	10

Putkia inkuboitiin 1 h 42 °C:seessa, jonka jälkeen putkesta otettiin tarvittava määrä qPCR-seokseen.

Taulukko 10. Tyypityksen qPCR-reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl)
Aqua	4
Kussakin tyypityksessä käytettävä R- aluke	1
Kussakin tyypityksessä käytettävä F- aluke	1
KAPA SYBR FAST Universal Mix (Kapa Biosystems)	10
RT-tuotetta	4
Yhteensä	20

Taulukossa 10 esitetty reaktioseos laitettiin putkissa qPCR-laitteeseen ja ajettiin taulukossa 11 esitetyllä ajo-ohjelmalla.

Taulukko 11. Tyypityksen qPCR ajo-ohjelma.

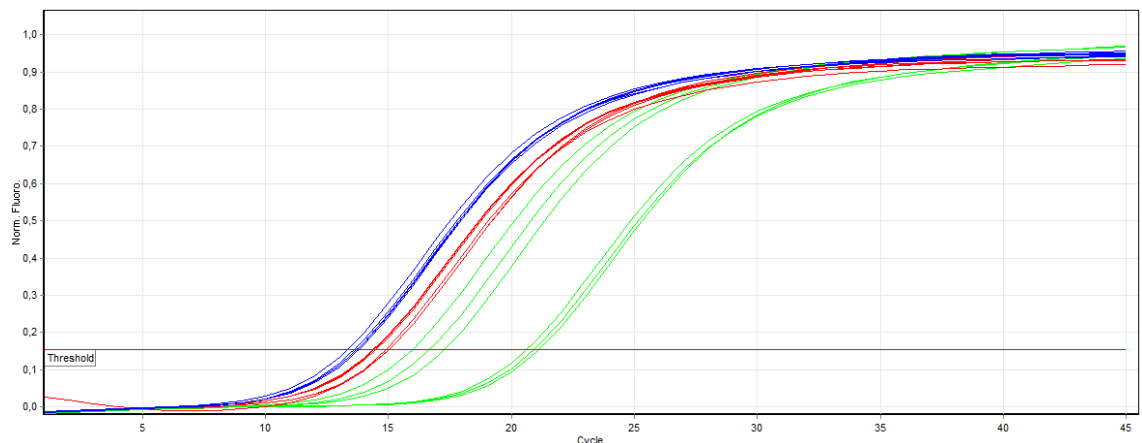
Lämpötila	Aika	Vaihe	Sykliden määrä
+ 95 °C	3 min	PCR-entsyymien aktivointi	1
+ 95 °C	10 s	denaturaatio	45
+ 52 °C	20 s	kiinnittyminen	45
+ 68 °C	10 s	pidennys/mittaus	45
+ 68 °C -> + 95 °C		sulatus eli melt-pisteen mittaus	1

5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

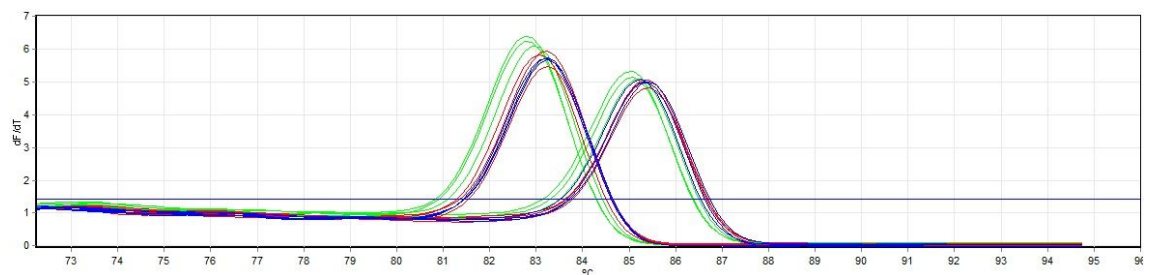
5.1 Virus-RNA:n eristys

Virus-RNA (vRNA) eristettiin kasvatetuista E-7 Wallace ja Rigvir-näytteistä taulukossa 1 esitetyillä eristysmenetelmillä. Kuhunkin eristykseen näytettä otettiin 100 µl ja vRNA eluoiitiin lopuksi 50 µl:aan. Eristykset tehtiin kunkin kitin ohjeiden mukaan. Jos ohjeissa mainittiin jokin muu näytetilavuus kuin 100 µl, näytteeseen lisättiin tarvittava määrä PBS:ää. ENRI-testissä tehtiin qPCR-reaktiot kolmena rinnakkaisena näytteenä. ENRI-testi tehtiin kuten taulukoissa 3,4 ja 5 on esitelty.

Tuloksista analysoitiin Ct-arvot ja melt-käyrät.



Kuva 3. ENRI-ajon kuvaajat. Kuvassa vihreällä on ZR Viral RNA Kit, punaisella QIAamp Viral RNA Mini Kit ja sinisellä E.Z.N.A. Viral RNA Kit.



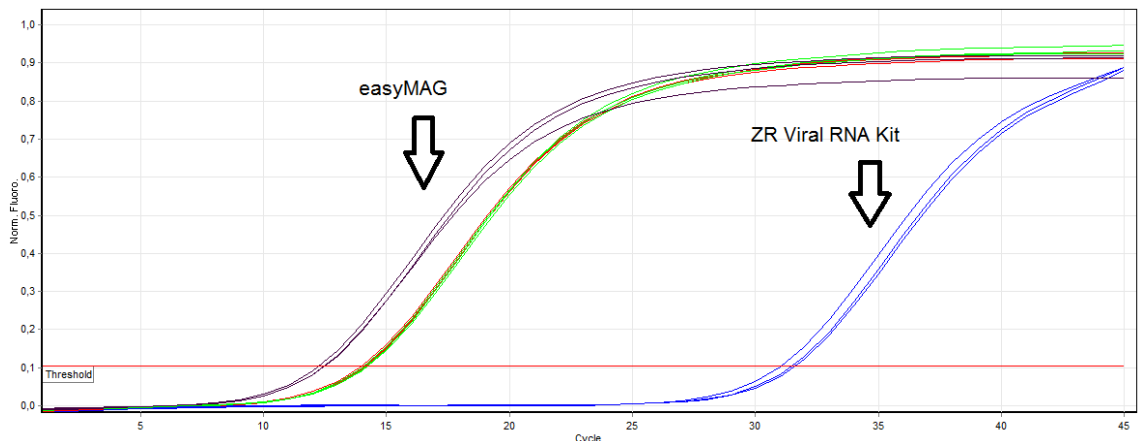
Kuva 4. ENRI-ajon melt-käyrät. vasemmalla E7 ja oikealla Rigvir

Taulukko 12. Eristystestin Ct-arvot.

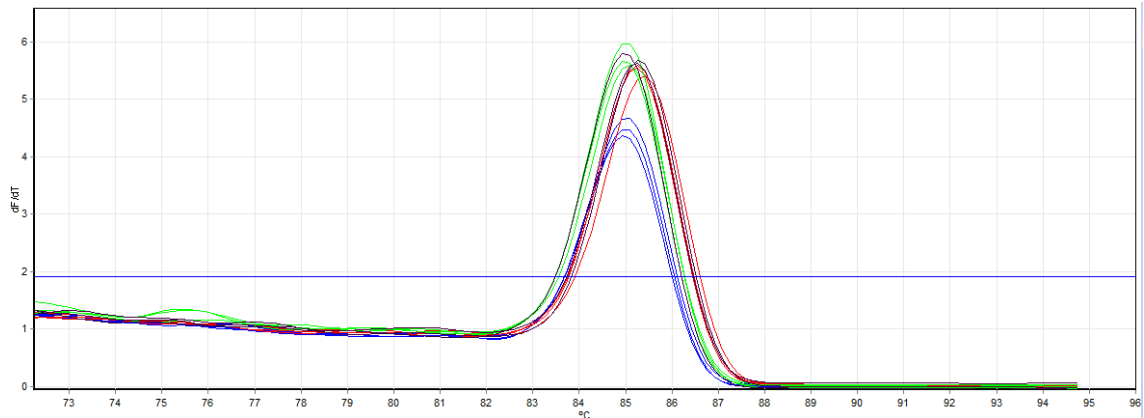
Eristysmenetelmä	Ct-arvo (tripletin keskiarvo)	
	E7 Wallace	Rigvir
QIAamp Viral RNA Mini Kit	15,00	14,47
E.Z.N.A. Viral RNA Kit	13,58	13,77
ZR Viral RNA Kit	16,66	20,90

Melt-testin tarkoilla arvoilla ei ole tässä ajossa muuta merkitystä kuin se, että havaitaan näytteiden erilaisuus ja käyrien muoto. Jos melt-käyrissä olisi monta huippua, voitaisiin epäillä kontaminaatiota tai qPCR-ajon epäonnistumista. Negatiivisista kontrolleista ei tullut signaalia, kuten ei olisi pitänytkään.

Eristysmenetelmien suorituskyky testattiin vielä uudelleen ja ENRI-ajoihin lisättiin mukaan easyMAG:lla tehty eristys.



Kuva 5. Eristysmenetelmien vertailu. Kokeessa käytettiin Rigvir-virusta.



Kuva 6. Eristysmenetelmien vertauksen melt-käyrät. Kokeessa käytettiin Riggvir-virusta.

Taulukko 13. Riggvir:illä tehdyn menetelmien vertailun Ct-arvot.

Eristysmenetelmä	Ct-arvo (tripletin keskiarvo)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	14,12
E.Z.N.A. Viral RNA Kit	14,21
ZR Viral RNA Kit	31,42
easyMAG	12,44

Eristysmenetelmien testaus tehtiin myös käyttäen E-7 Wallace-virusta ja tulokset olivat samanlaiset. Suorituskyvyltään easyMAG oli paras ja ZR Viral RNA Kit huonoin. E.Z.N.A. Viral RNA Kit:n ja QIAamp Viral RNA Mini Kit:n suorituskyvyt olivat hyvin lähellä toisiaan. Käytettävyydeltään ZR Viral RNA Kit oli helpoin ja siihen kului vähiten aikaa työntekijöiltä, jos easyMAG:ia ei oteta vertailuun mukaan. QIAamp Viral RNA Mini Kit oli käytettävyydeltään hankalin, sillä siinä on eniten erilaisia steppejä, joista esimerkiksi carrier-RNA:n liuotus vie jonkin verran aikaa.

Taulukko 14. Kittien hinnat

Eristysmenetelmä	Hinta (€) (kitissä olevien preppien määrä)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	1 080 (250)
E.Z.N.A. Viral RNA Kit	374,25 (200)
ZR Viral RNA Kit	450 (200)

Hinnat ovat Turun yliopiston virusopin hankintahintoja. EasyMAG:lle löytyi hinnaksi 79500 \$.¹⁸ Juoksevia kuluja per eristys ei pysty arvioimaan ilman pidempää käyttökokeusta ja tietoa käyttöreagenssien kulutuksesta. Vuokaavion eristyksissä käytettiin QIAamp Viral RNA Mini Kit:iä.

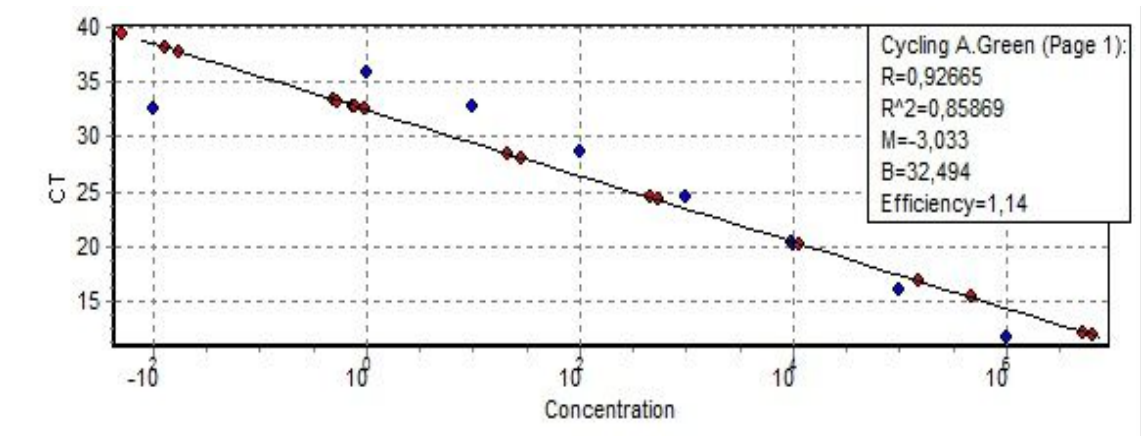
5.2 ENRI-testin ja PAR-ENRI-testin herkkyyskoe

Ennen kliinisten näytteiden ajoa testattiin, kuinka herkkiä menetelmiä ENRI- ja PAR-ENRI-testi ovat. ENRI:n herkkyys testattiin pE-7-plasmidilla (pE-7) ja PAR-ENRI:n HPeV-1 -plasmidilla (pHPeV-1), valmistamalla plasmideista laimennossarja. Laimennossarja valmistettiin mittaamalla virus-plasmidien nukleiinihappopitoisuus (ng/ μ l) NanoDrop 1000-laitteella. Saaduista nukleiinihappopitoisuuksista pystytään laskemaan plasmidin ns. kopiaoluku (kopiota/ μ l) ja valmistamaan käyttöläimennos, jonka kopiaoluku on 10^8 kopiota/ μ l (kpl/ μ l). Tämä ei ole aivan tarkka arvo, sillä kopiaolukua laskiessa tehdään jonkin verran pyöristyksiä. Käyttöläimennoksesta laimennettiin pE-7 10^{-1} asti.

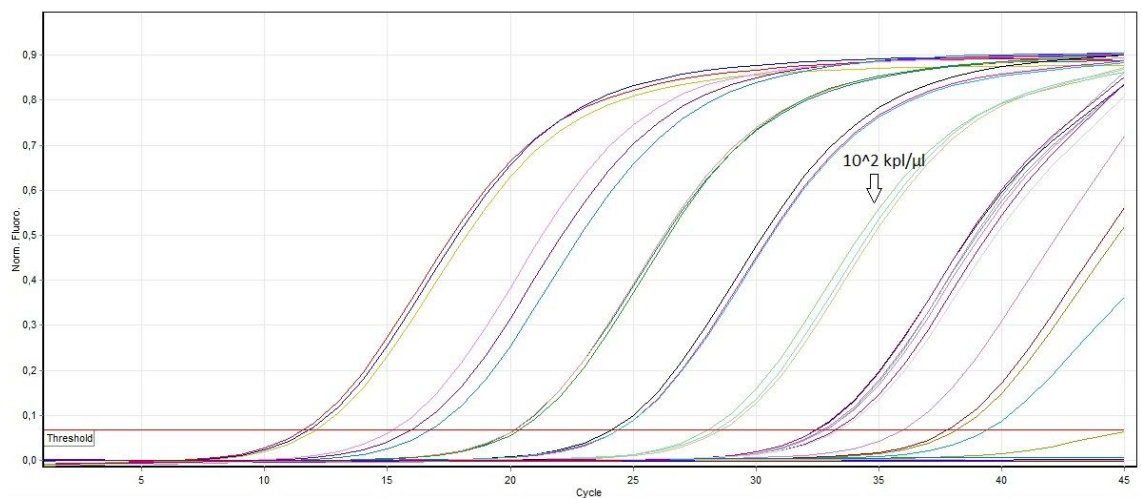
ENRI-testi pE-7:llä tehtiin, kuten taulukossa 5, sillä poikkeamalla, että kiinnittymisaika oli 20 s. Reaktioseos oli kuten taulukossa 4, sillä erolla, että plasmidia oli putkessa 2,5 μ l ja 2,5 μ l enemmän vettä. Tällä saadaan putkiin ns. tasaluku. Esimerkiksi jos putkeen laiteaan 2,5 μ l 10^7 kpl/ μ l plasmidia, niin putkessa kokonaispitoisuus on 10^6 kpl/ μ l. Näin toimittiin aina, kun käytettiin pE-7:ia.

Taulukko 15. ENRI-herkkyystestin Ct-arvot.

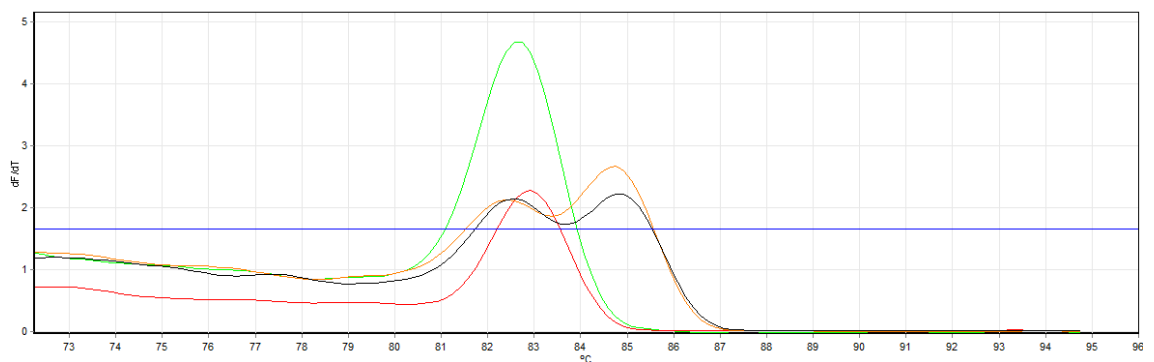
Pitoisuus	Ct-arvot			Keskiarvo
10^6	11,62	12,12	11,87	11,87
10^5	16,04	15,29	16,81	16,04
10^4	20,20	20,19	20,41	20,26
10^3	24,45	24,18	24,44	24,36
10^2	28,65	28,10	28,46	28,40
10^1	32,87	32,80	32,90	32,86
10^0	36,00	37,85	38,21	37,35
10^{-1}	39,45	-	-	
10^{-2}	32,50	33,31	32,55	32,79
qPCR aqua	33,45			



Kuva 7. ENRI-herkkyystestin standardisuora.



Kuva 8. ENRI-herkkyystestin kuvaaja



Kuva 9. ENRI-herkkyystestin melt-käyrät. Vihreä 10^1 , punainen 10^0 , oranssi 10^{-2} ja musta qPCR aqua.

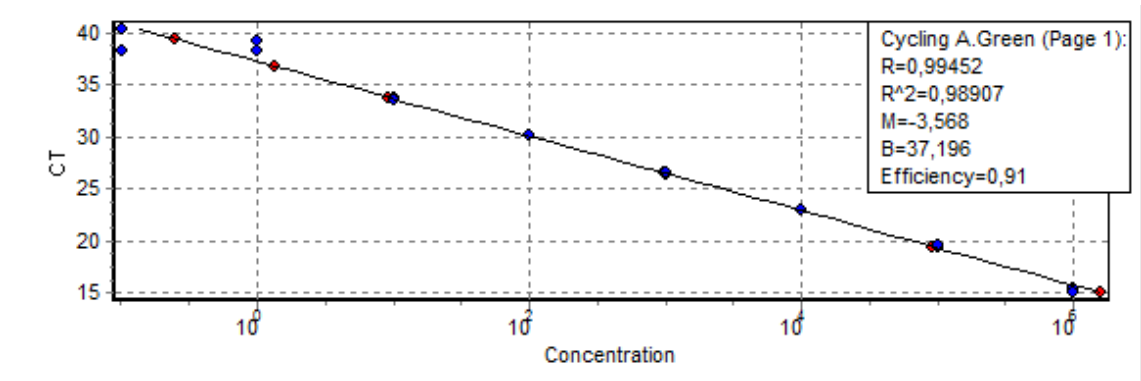
Kuten kuvista 8 ja 9 nähdään, niin jossain oli kontaminaatio, sillä Ct- ja melt-käyrä antaa signaalia vesikontrollilla. Tämä ei välttämättä haittaa, kun ollaan jo testin epävarmalla alueella. Periaatteessa menetelmä oli herkkä aina 1 kopiota/ μl , mutta käytännössä kuvaa 11 tulkitsemalla alaraja on 10^2 kopiota/ μl (kpl/ μl). Standardisuoran selitysaste R^2 oli myös melko huono, joten pipetoinnin tarkkuuteen jäi toivomisen varaa. Melt-arvo näyttäisi olevan herkempi kuin Ct-arvo, sillä pitoisuudella 10 kpl/ μl melt antaa vielä hyvän tuloksen.

Vastaava testaus tehtiin myös PAR-ENRI:lle käyttäen taulukoissa 6,7 ja 8 esitettyjä reaktioseoksia ja ajo-ohjelmaa.

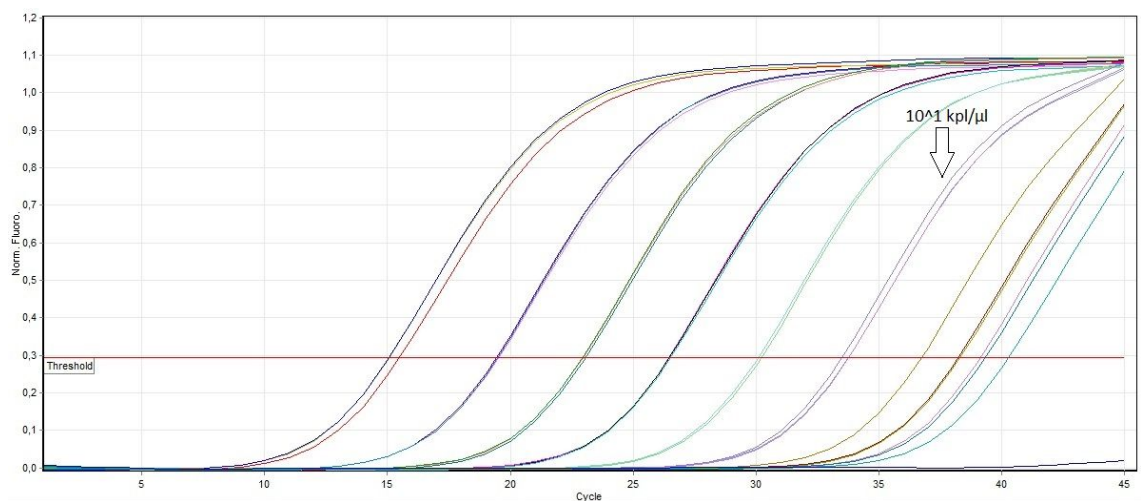
HPeV-1 -plasmidin käyttölaimennoksesta laimennettiin $5 \cdot 10^7$ - $5 \cdot 10^0$, jolloin voidaan suoraan qPCR-reaktioseokseen pipetoida 5 μl ja saadaan tasaluku. Esimerkiksi kun pipetoidaan 5 μl $5 \cdot 10^7$ kpl/ μl -plasmidia, saadaan qPCR-seoksen pitoisuudeksi 10^6 kpl/ μl .

Taulukko 16. PAR-ENRI:n herkkyystestin Ct-arvot

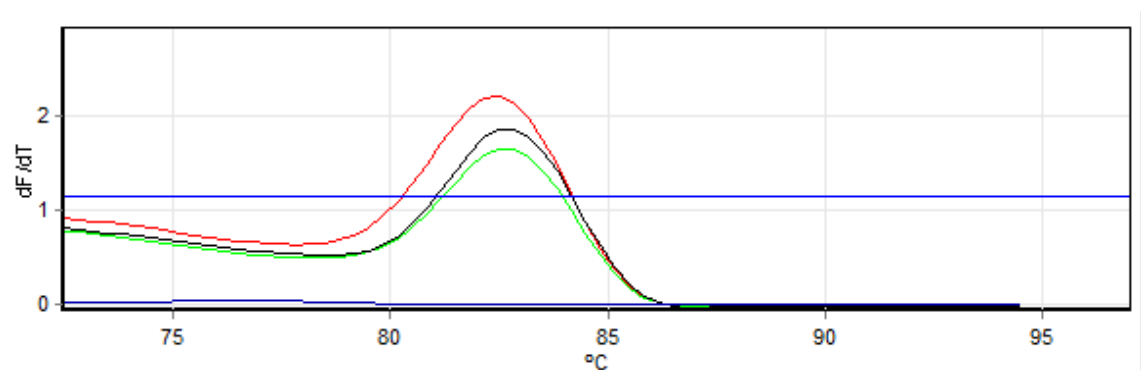
Pitoisuus	Ct-arvot			Keskiarvo
10^6	15,52	15,10	15,09	15,24
10^5	19,45	19,54	19,50	19,50
10^4	23,08	22,98	22,96	23,01
10^3	26,47	26,48	26,54	26,50
10^2	30,23	30,23	30,10	30,19
10^1	33,78	33,51	33,80	33,69
10^0	39,15	38,26	36,75	38,05
10^{-1}	38,33	40,31	39,36	39,33
qPCR aqua	-			



Kuva 10. PAR-ENRI herkkyystestin standardisuora.



Kuva 11. PAR-ENRI-herkkyystestin kuvaaja.



Kuva 12. PAR-ENRI herkkyystestin melt-käyrät. Punainen 10^1 , vihreä 10^0 , musta 10^{-1} ja qPCR aqua sininen.

Tällä kertaa ajossa ei ollut kontaminaatiota ja standardisuoran selitysaste R^2 oli tyydyttävä. Kuvaa 11 ja tuloksia tulkitsemalla todettiin menetelmän alarajaksi 10 kpl/ μ l. Melt-

käyrä antoi selkeitä tuloksia vielä pitoisuudella 10^{-1} , ollen myös PAR-ENRI:ssä herkempi kuin Ct-arvo. Kummassakin herkkyystestissä käytettiin plasmidia, joten RT-reaktion toimivuudesta ei ole tietoa.

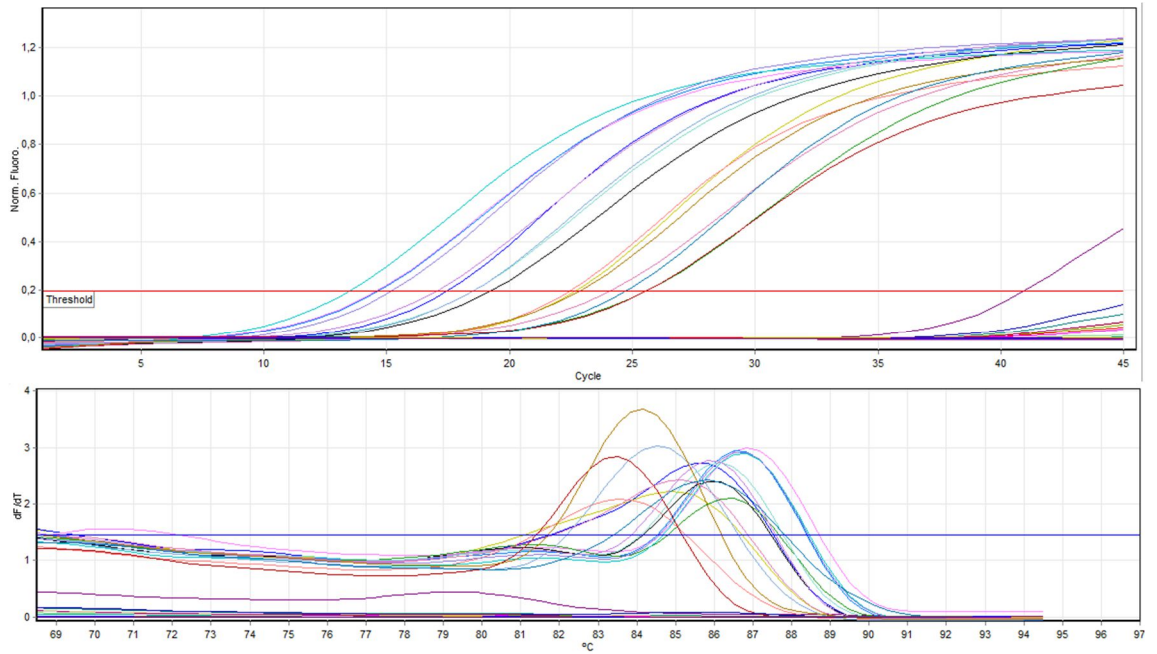
5.3 Kliinisten näytteiden analysointi ENRI- ja PAR-ENRI-menetelmillä

Kliinisistä näytteistä (n=71) eristettiin vRNA QIAamp Viral RNA Mini Kit:ä käyttäen. Eristysten jälkeen näytteille tehtiin ENRI-testi. Reaktioseokset olivat samat kuin taulukoissa 3 ja 4 esitetyt. Ajo-ohjelma erosi taulukossa 5 esitetystä primerien kiinnittymisaajan suhteen. Kliinisille näytteille käytettiin 20 s kiinnittymisaikaa. Tuloksista tulkittiin Ct-arvoja ja melt-käyriä ENRI-positiivisuuden ja -negatiivisuuden määrittämiseksi. Lisäksi melt-arvosta arvioitiin, onko näyte mahdollisesti entero- tai rinovirus. Ajoissa oli kontaminaatio, joka vaikeutti tulosten tulkintaa. Näytteistä positiivisiksi tulkittiin 38 kpl, joista selkeästi positiivisia oli 30 kpl.

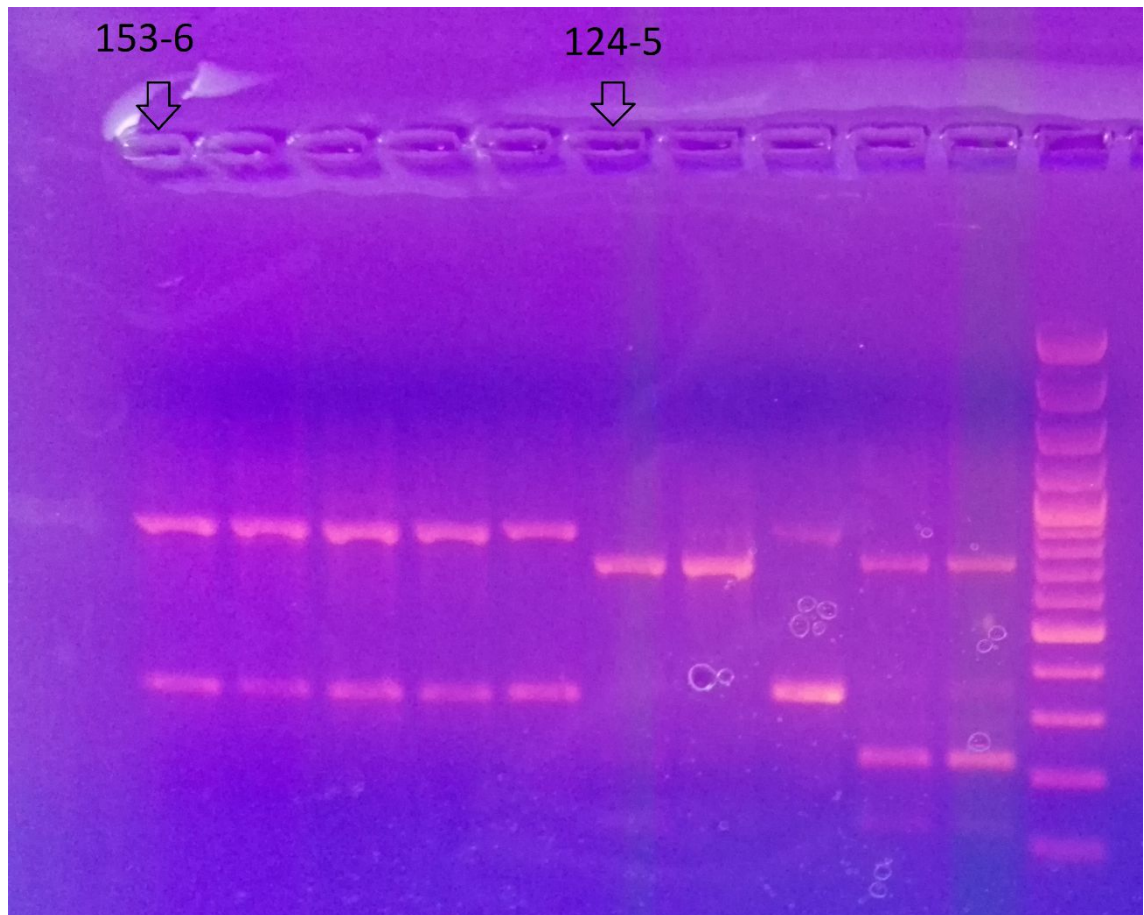
ENRI:ssä negatiivisiksi tulkituista näytteistä ajettiin PAR-ENRI taulukoissa 6 ja 7 esitetyillä reaktioseoksilla ja taulukossa 8 esitettyllä ajo-ohjelmalla. PAR-ENRI-ajoissa ei ollut kontaminaatioita häiritsemässä tulosten tulkintaa. Tuloksista tulkittiin 14 positiivisiksi, joista seitsemän oli selkeästi positiivisia.

5.4 Tyypitys-RT-qPCR:t kliinisistä näytteistä

ENRI-testissä positiivisista ajettiin ns. rinotyypitys. Rinotyypityksen reaktioseokset ja ajo-ohjelma olivat kuten taulukoissa 9, 10 ja 11 muutamilla poikkeuksilla. Käytetyt alukkeet olivat VP4/2 HRV/HEV OAS ja VP4/2 T7-OS. Ajo-ohjelmassa kiinnittymislämpötila oli 54 °C. Tuloksista tulkittiin Ct-arvoja ja melt-käyriä. Rinotyypityksissä ei ollut juurikaan kontaminaatioita negatiivisissa kontrolleissa. Melt-käyrät olivat ns. toispuoleisia, joten positiivisiksi tulkitut näytteet tarkistettiin agarosigeelillä. Rinotyypityksessä positiivisiksi tulkittiin 26 näytettä.

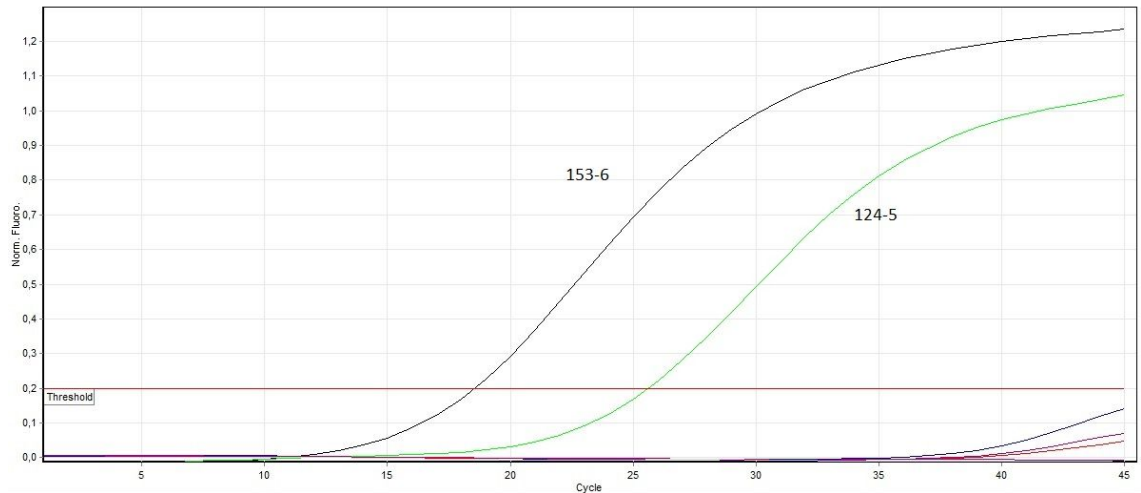


Kuva 13. Yhden rinityypitysajon Ct- ja melt-käyrät.

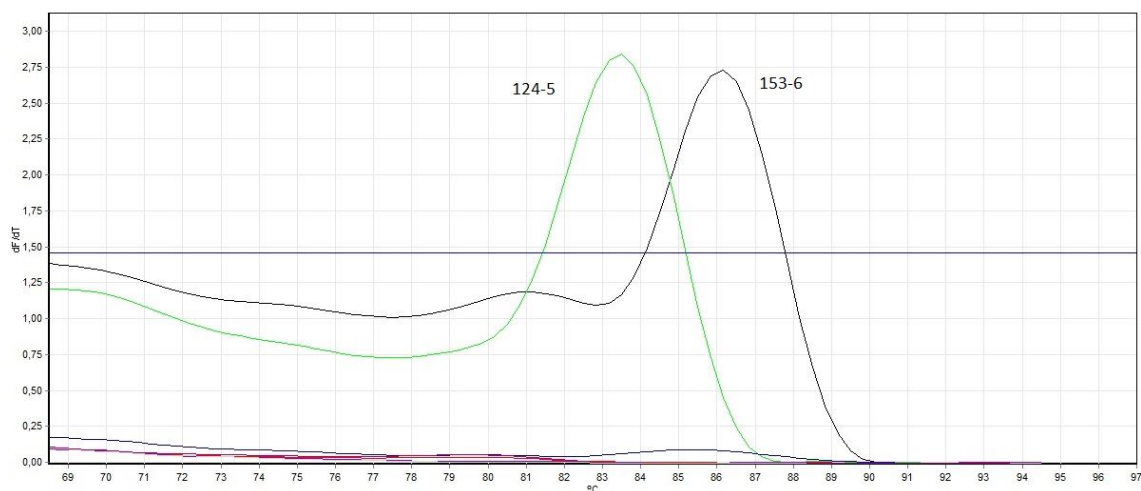


Kuva 14. Osa rinityypityksen tuotteista geelillä. Numerosarjat ovat näytetunnuksia.

Kuten kuvasta 14 nähdään, osa näytteistä muodostaa kaksi erikokoista PCR-palaa. Kaikista näytteistä ei tullut kahta erikokoista DNA-palaa, eikä ilmiötä voinut päätellä melt-käyrältä tai Ct-käyrältä (kuvat 15 ja 16).



Kuva 15. Kahden rinoviruksen tyypityskäyrä. Numerosarjat ovat näytetunnuksia

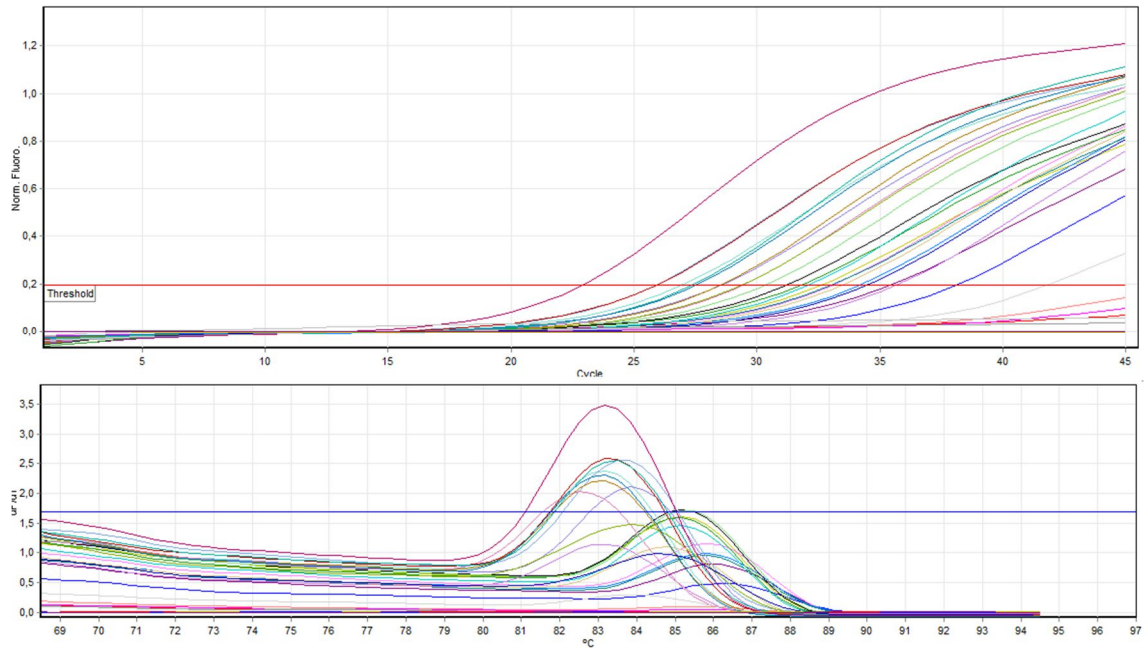


Kuva 16. Melt-käyrä kuvassa 15. ajetuista rinovirusnäytteistä. Numerosarjat ovat näytetunnuksia.

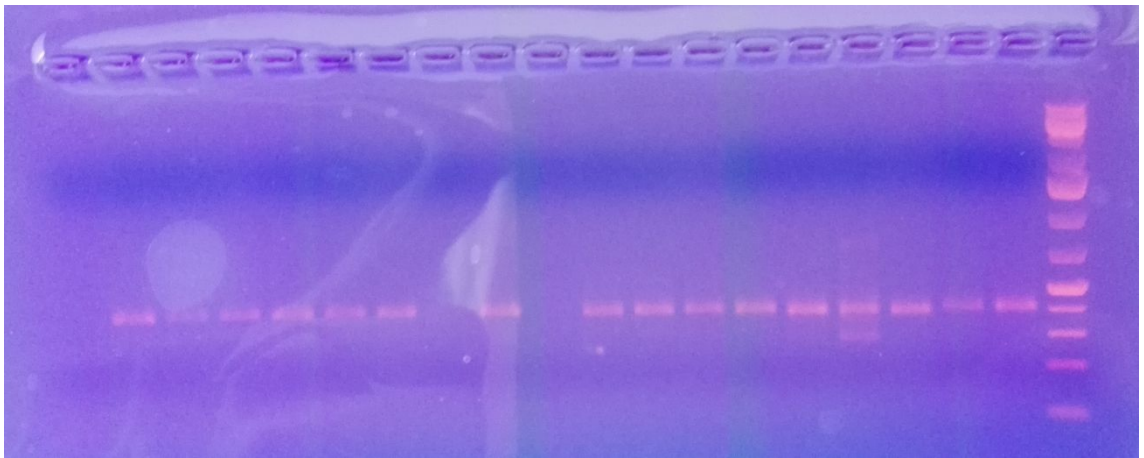
Näytteistä, joista tuli kaksi erikokoista DNA-palaa, kummatkin palat eristettiin geeliltä ja lähetettiin GATC Biotech:n LIGHTrun-palveluun sekvensoitavaksi. Näytteet, joista tuli yksi DNA-pala, PCR-tuote käsiteltiin ExoSap-protokollalla ja lähetettiin samaan paikkaan sekvensoitavaksi. Sekvenssien analysoinnin jälkeen todettiin, että näytteistä kaksi oli ri-

novirusia. Näiden kahden tyyppiä saatiin määritetyksi. Näytteistä 24 osoittautui enterovirusiksi, joille tehtiin tämän jälkeen enterotyyppitys. Näyte 124-5 osoittautui rinovirusiksi, kuten myös kuvassa 14 oikealla puolella ollut näyte. Näyte 153-6 osoittautui rinotyyppityksessä enterovirusiksi. Tästä voisi osittain päätellä, että rinovirukset eivät muodosta kahta erikokoista DNA-palaa rinotyyppitys-PCR:ssä. Tämän varmasti toteamiseksi tarvittaisiin enemmän kokeita. Se ei tosin selity, miksi osa enterovirusista muodostaa kaksi erikokoista DNA-palaa ja osa ei. Tämän tutkimiseen pitäisi tarkastella primerien sitoutumisaluetta enterovirusgenomissa. On mahdollista, että tietyissä virustyypeissä on vastaava sekvenssi muualla genomia, johon primerit myös tarttuvat. Kahdesta erikokoisesta DNA-palasta yritettiin päästä eroon erilaisilla ajo-ohjelmilla, mutta se ei onnistunut. Melt-arvojen perusteella ENRI:stä oletettiin, että kolme näytteistä oli selkeästi positiivisia rinovirusia, mutta sekvenssit analysoimalla yksi näistä todettiin enterovirusiksi. Rinotyyppitys ei osoittautunut kovin herkäksi menetelmäksi, sillä pE-7-plasmideista toimi ainoastaan 10^6 kpl/ μ l.

Enterovirusiksi rinotyyppityksessä todetut näytteet laitettiin ns. enterotyyppitykseen. Enterotyyppityksen reaktioseokset ja ajo-ohjelma olivat kuten taulukoissa 9, 10 ja 11. Käytetyt alukkeet olivat AN88 (reverse primer) ja T7-AN89. Enterotyyppitys oli epäherkkä ja ensimmäisten positiivisten näytteiden Ct-arvot ovat yli 25 (vertaa ENRI kuva 8, kummankin kuvan 7 ja 17 vasemman puoleisin käyrä on samaa virusplasmidia). Lisäksi melt-käyrät olivat melko matalia. Plasmidikontrolleista toimi ainoastaan 10^6 kpl/ μ l.



Kuva 17. enterotypityksen Ct- ja melt-käyrät.

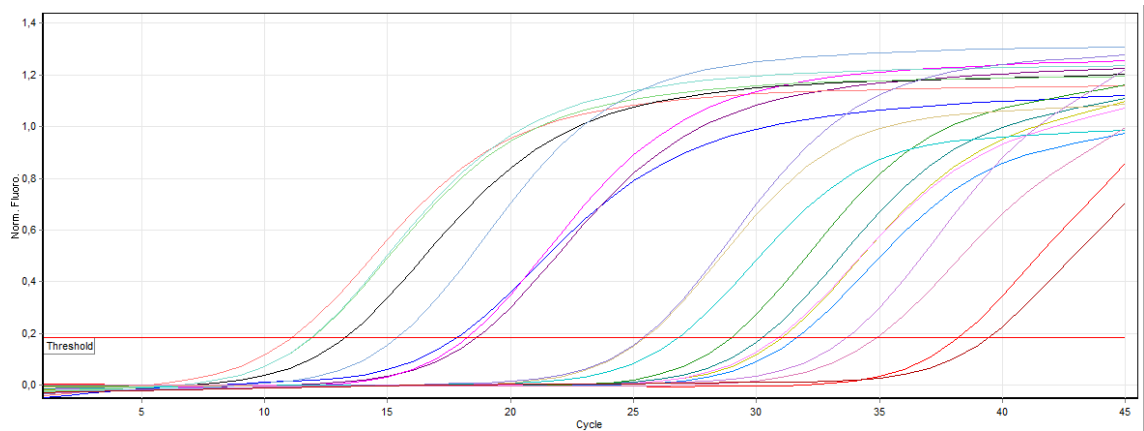


Kuva 18. Osa enterotypityksen PCR-tuotteista geelillä.

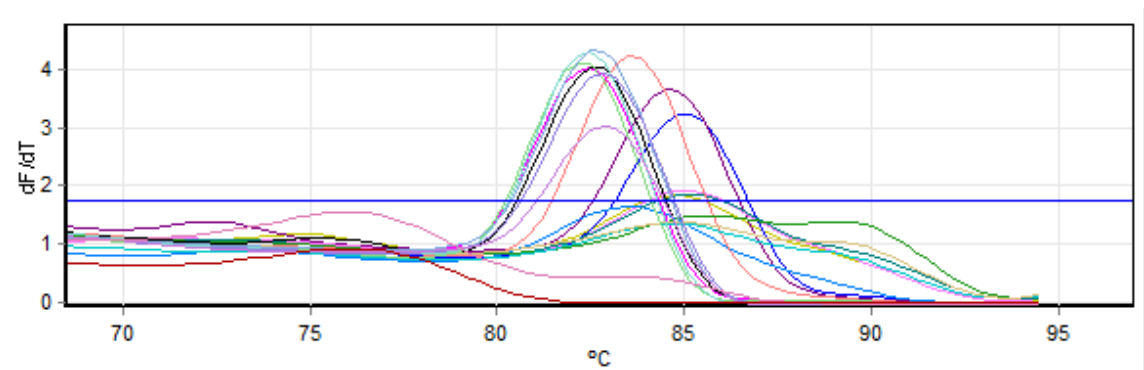
Positiiviset näytteet käsiteltiin ExoSap-menetelmällä ja lähetettiin sekvensoitaviksi. Enterotypityksen tuloksista todettiin 22 näytettä positiivisiksi eli kahdesta näytteestä ei saatu enterotypityksessä tulosta, vaikka niistä saatiin tulos rinotypityksessä.

PAR-ENRI-testissä positiivisiksi tulkituista näytteistä ajettiin ns. parechotypitys. Parechotypityksessä käytettiin taulukoissa 9, 10 ja 11 esitettyjä reaktioseoksia ja ajo-ohjelmia. Käytetyt alukkeet olivat HPeV-IAS ja T7-HPeV-OS.

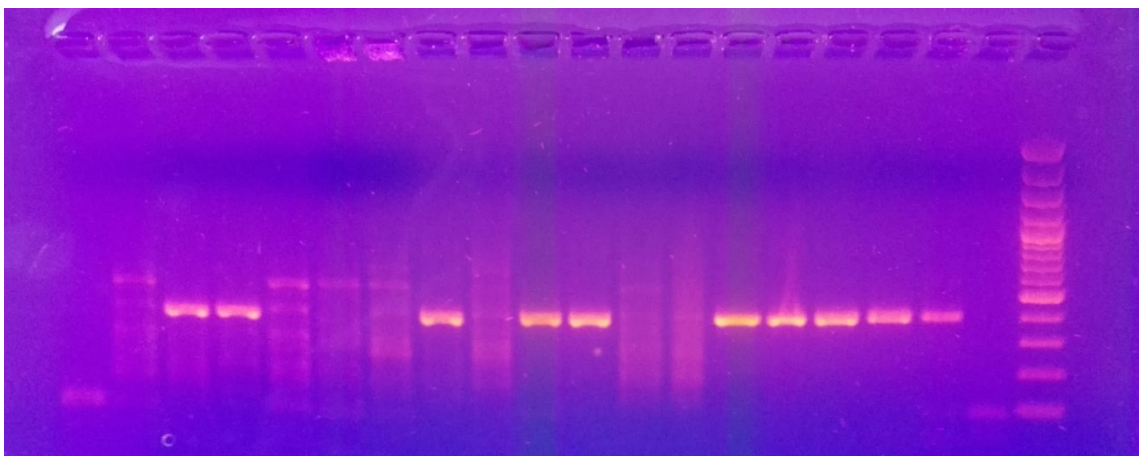
Ajossa oli tälläkin kerralla kontaminaatio ja kaikista putkista tuli Ct-arvo, mutta ei melt-arvoa.



Kuva 19. Parechotyyppityksen Ct-käyrät.



Kuva 20. Parechotyyppityksen melt-käyrät.



Kuva 21. parechotyyppityksen PCR-tuotteet geelillä.

Näytteistä ne, joista tuli selkeä melt-käyrä, ovat myös agaroosigeelillä (kuva 21) selkeitä nauhoja. Tällaisia näytteitä oli seitsemän ja ne tulkittiin positiivisiksi. Nämä seitsemän näytettä olivat myös selkeästi positiivisia PAR-ENRI:ssä. Positiiviset näytteet käsiteltiin ExoSap-protokollalla ja lähetettiin GATC Biotech:n LIGHTrun-palveluun sekvensoitavaksi. Kuudesta näytteestä saatiin tyyppi selville sekvenssiä GenBank:iin vertaamalla.

5.5 Sekvenssien analyysit

Sekvenssit analysoitiin käyttäen National Center for Biotechnology Information (NCBI) tarjoamaa selainpohjaista BLAST-työkalua. Osa sekvensseistä avattiin FinchTV-ohjelmalla ennen BLAST-analyysiä. Identtisyysprosentti on otettu ensimmäiseen tulokseen BLAST:sta.

Taulukko 17. Parechotyyppityksen tulokset.

Näyttenumero	PAR-ENRI melt (°C)	Parechotyyppi-tys-melt (°C)	Viruksen tyyppi	Identtisyys -%
101-17	83,5	85	HPeV-1	92
103-2	83,0	84,5	HPeV-1	93
125-17	81,7	83,5	HPeV-1	95
145-8	82,7	82,5	HPeV-3	97
145-12	82,3	82,5	-	
150-8	82,4	82,3	HPeV-1	94
153-20	82,2	82,5	HPeV-1	94

Näytteestä 145-12 ei jostain syystä saada tyyppitystulosta. Avaamalla sekvenssi FinchTV:llä ja muuttamalla BLAST:in hakuetoja tyypiksi saadaan HPeV-1, mutta tämä tulos tulee vain 42 emäsparin pituudelta. Erikoista on se, että HPeV-3:n melt-arvo on hyvin samankaltainen muiden kanssa. Lisäksi jostain syystä näytteiden 101-17 ja 103-2 melt-arvot ovat korkeampia.

Taulukko 18. Rinotyyppityksen tulokset. Taulukossa ovat vain rinoviruksiksi todetut näytteet.

Näytenumero	ENRI -melt (°C)	Rinotyyppitysmelt (°C)	Viruksen tyyppi	Identtisyys -%
124-5	80,85	83,5	RV-B6	97
124-15	81,15	84,2	RV-B6	97

Rinovirusten tapauksessa melt-arvot olivat hyvin lähellä toisiaan. Oli odotettavissa, että rinoviruksia ei hirveästi löytyisi näiden klinisten näytteiden joukosta, sillä näytteet olivat happostabiileja.

Taulukko 19. Enterotyyppityksen tulokset.

Näyttenumero	ENRI (°C)	-melt	Enterotyyppi- tys-melt (°C)	Viruksen tyyppi	Identtisyys -%
93-2	84,35			CV-B2	97
93-3	85,35			CV-B2*	96
100-9	85,5			CV-B2	97
100-20	85,75			CV-B2	96
100-21	85,25			CV-B2	94
100-22	85,85			CV-B2	96
141-12	84,65			CV-B2	97
142-9	84,65		85,2	CV-B2	96
145-7	84,6			CV-B2	97
145-16	84,6			CV-B2	96
145-18	84,9		85,3	CV-B2	96
148-8	85,65		83,2	CVB5*	90
148-9	85,6		83,7	CV-B5*	89
149-4	84,15		83,8	CV-B3	92
149-7	85,35			CV-B5*	82
150-22	85,35		82,5	CV-B5*	89
150-23	85,4		83,3	CV-B5*	91
153-6	85,25		83	CV-B5*	90
153-22	84,75			CV-B4	96
156-13	85,1		83,5	CV-B5	88
156-14	85		83	CV-B5	91
117-16	82,4			-	

* sekvenssi on avattu FinchTV-ohjelmalla ja syötetty sen jälkeen BLAST:iin. Näytteeseen 149-7 myös BLAST:in hakueitoja löyhennettiin.

Sekvenssiä saatiin, vaikka enterotyyppitys onnistui heikosti. Näytteestä 117-16 tuli tyyppitystulokseksi kaksi vaihtoehtoa, kun sekvenssi avattiin FinchTV:llä ja BLAST:in hakueitoja löyhennettiin. Tuloksissa kummallakin identtisyys-% oli 77, joten näytteen tyyppistä ei voi sanoa mitään varmaa.

Kaikista näytteistä, joista saatiin tyyppitystulos sekä rino- että enterotyyppityksessä, oli tyyppitystulos sama kummallakin tyyppityksellä. Rinotyyppityksen sekvenssitulosten joukossa

oli kuitenkin mukana myös muunlaisia viruksia, mutta ensimmäinen osuma oli jokaisessa tapauksessa sama.

Erikokoiset DNA-palat samasta näytteestä antoivat jokaisessa tapauksessa saman tyyppitytuloksen kuin halutun kokoinen pala.

Näytteistä 111-13 ja 142-1 saatiin rinotyyppityksessä, muttei enterotyyppityksessä, tulos. Näytteen 111-13 tyyppi rinotyyppityksessä oli echovirus 30 (93 identtisyys-%). Voi siis olla, että enterotyyppityksen alukkeet eivät kunnolla tartu tämäntyyppiseen virukseen. Näyte 142-1 oli rinotyyppityksen perusteella CV-B2, joten tämän näytteen kohdalla on ajossa mennyt todennäköisesti jokin pieleen.

Taulukko 20. Osa entero- ja rinovirusten tuloksista poimittuna.

Näytenu- mero	ENRI arvo	Ct-	ENRI las- kettu ko- pioluku (kpl/μl)	Tyyppitys- PCR:n Ct- arvo (ri- notyyppitys)	Tyyppitys- PCR:n Ct- arvo (ente- rotyypitys)	Tyyppi sel- villä
100-9	16,3		126 649	29,45	35,48	CVB2
145-7	14,31		1 369 675	21,45	32,15	CVB2
124-5	13,09		832 853	25,6		HRV-B6
124-15	15,37		788 157	22,88		HRV-B6
153-22	16,26		102 639	18,54	29,41	CVB4
123-12	35,2		2	40,21 (-)	-	
152-17	32,76		12	-	-	
145-5	37,34		8	40,32 (-)	-	
111-13	21,9		4 760	30,54	-	
pE7 10 ⁶ kpl/μl	12,73			24,50	22,93	
pE7 10 ⁴ kpl/μl	20,72			44,91	41,81	
pE7 10 ² kpl/μl	28,44			-		

Suluissa (-) tarkoittaa, että näyte todettu negatiiviseksi. Virusplasmidiin tulokset ovat vain yhdestä ajosta. ENRI-testi oli huomattavasti herkempi kuin rino- tai enterotyyppitys.

Virusplasmideista ei käytännössä tyypityksissä toiminut kuin 10^6 kpl/ μ l eikä standardisuuraa saatu näihin ajoihin. Näytteen 153-22 kopioluku 102639 on pienin kopioluku, jolla näyte saatiin tyypitetyksi tässä työssä. Outoa on, että plasmideilla on pienempi Ct-arvo enterotyypityksessä kuin rinotyypityksessä, mutta näytteillä arvot menevät toisin päin. Se voi tosin johtua virustyypeistä ja tätä pitäisi testata tunnetuilla näytteillä. Ero plasmideilla on tosin niin pieni, että ero saattaa johtua pipetointivirheestä.

Taulukko 21. Parechovirusten tuloksia.

Näytenu- mero	PAR-ENRI Ct-arvo	PAR-ENRI laskettu ko- pioluku (kpl/ μ l)	Tyypitys- PCR:n Ct- arvo	Tyypitys- PCR:n ko- pioluku (kpl/ μ l)	Tyyppi selvillä
101-17	22,21	21786	17,82	345 116	HPeV-1
145-8	24,22	6 231	18,26	276 788	HPeV-3
153-20	17,64	371 675	11,89	6 874 372	HPeV-1
125-17	21,37	43 698	11,09	10 283 430	HPeV-1
117-18	36,75	3	31,65	322	ei
144-14	38,23	1	28,98	1 241	ei
pHPeV-1 10^6 kpl/ μ l	15,96		15,42		
pHPeV-1 10^4 kpl/ μ l	23,64		25,42		
pHPeV-1 10^2 kpl/ μ l	30,78		33,68		

Parechovirusten tyypitys-PCR:llä näytteiden Ct-arvot olivat pienemmät kuin PAR-ENRI:ssä.. Parechovirusten tapauksessa 24,22 oli suurin Ct-arvo, josta näyte saatiin vielä tyypitettyä. Ct-arvo vaihtelee ajojen välillä, joten näiden tulosten valossa voidaan todeta, että parechoviruksen tyypitys onnistuu, jos kopioluku on noin 6000 PAR-ENRI-testissä.

6 LOPUKSI

Opinnäytetyön tarkoituksena oli osoittaa, että laittamalla näytteet vuokaavion osoittamiin testeihin saadaan näytteissä mahdollisesti olevien pikornavirusten tyypit selville loogisella tavalla. Näytteistä saatiin tyypitettyä 28/71 eli onnistumisprosentiksi tuli noin 39 %.

Tämän työn tulosten perusteella vRNA:n eristämässä kannattaa käyttää Omega Biotekin E.Z.N.A. Viral RNA Kit:iä, kun halutaan tai on pakko käyttää ”käsin” eristystä. Bio-merieux'in easyMAG-laitteella on parempi suorituskyky, mutta kyseinen laite on huomattavasti kalliimpi kuin eristyskitit. E.Z.N.A. Viral RNA Kit:illä oli testatuista kiteistä paras hinta-, laatu- ja käytettävyyssuhde. Suorituskyvyltään se oli samaa tasoa kuin Qiagenin QIAamp Viral RNA Mini Kit, mutta huomattavasti halvempi ja helpompi käyttää. Zymo Researchin ZR Viral RNA Kit oli käytettävyydeltään paras, mutta jäi suorituskyvyltään E.Z.N.A. Viral RNA Kit:in ja QIAamp Viral RNA Mini Kit:in taakse. Tulosten perusteella ZR Viral RNA Kit eristi huonosti Rigvir-virusta, vaikka viruksen tyyppillä ei olettaisi olevan merkitystä, sillä Rigvir:kin on E-7 -virus.

Jatkossa vuokaavion toimivuutta voisi testata eri näytteillä tai toistaa samoilla näytteillä sokkona uudelleen ja eri tekijällä, jotta saadaan tekijän aiheuttama virhe pois. Myös potilasnäytteillä voisi testata menetelmän toimivuutta.

Tämän työn tapauksessa pienin kopioluku, jolla tyypitystulos saatiin, oli noin 100000 kpl/μl. Tätäkin voisi testata jatkossa erilaisilla tunnetuilla näytteillä tekemällä näistä laimennossarjat. Tässä työssä käytetyissä näytteissä suurin osa näytteistä osoittautui erilaisiksi Cocksackie-viruksiksi, minkä takia on vaikea arvioida menetelmän herkkyyttä muut enterovirukset huomioiden.

Standardisuoran muodostamiseksi kannattaisi jatkossa käyttää jotain muuta kuin virusplasmidia, jos mahdollista. Virusplasmidilla ei saada tietoa RT-reaktion toimivuudesta ja virusplasmidi tuntui muutenkin käyttäytyvän jossain tapauksissa eri tavalla kuin virusnäytteet. RNA-transkriptilla, jonka pitoisuus tunnetaan, olisi plasmidia parempi, sillä silloin saataisiin tietoa kopioluku jo RT-reaktiosta asti. Transkripti toimisi myöskin positiivisena kontrollina RT-reaktion toimivuuden suhteen. Standardisuora kannattaisi jatkossa tehdä rinnakkaisilla näytteillä, jotta saadaan standardisuoran selitysaste ja siten tietoa pipetoinnin onnistumisesta.

Kun halutaan tyypittää näytejoukko, niin kannattaisi mahdollisesti harkita tyypitystesteillä aloittamista. Näytejoukon voisi laittaa ensiksi esimerkiksi VP 4/2-testiin ja negatiiviset parechotyyppitykseen. VP 4/2-testin perusteella enteroviruksiksi tulkitut laitettaisiin VP1-enterotyyppitykseen. Näytteet, joista ei saada tyypityksissä tulosta, voitaisiin testata ENRI:llä ja ENRI:ssä negatiiviset PAR-ENRI:llä, jotta saataisiin selville, onko näytteissä tämän tyyppisiä viruksia. Tällä tavalla saataisiin heti selville näytteiden tyyppi ja tämän jälkeen voitaisiin tarkistaa ENRI:llä ja PAR-ENRI:llä, onko näytteissä yhtään kyseisiä viruksia. Jos näyte osoittautuisi ENRI:ssä tai PAR-ENRI:ssä positiiviseksi voitaisiin virusta yrittää kasvattaa, jos esimerkiksi ENRI:n Ct-arvo on ollut suuri, mutta näyte muuten selkeästi positiivinen.

Vuokaaviossa selkeästi huonoiten toimivaksi RT-qPCR -menetelmäksi osoittautui enterotyyppitys. Tuloksista suurta osaa ei olisi tulkittu positiivisiksi muissa testeissä vastaavilla Ct-arvoilla ja melt-käyrillä, mutta sekvensointi näytti toimivan, vaikka Ct-käyrä ei saavuttanut huippua ja melt-käyrä jäi rajan alle (kuva 17). Tässä tyypityksessä kannattaisi käyttää muita alukkeita tai ajo-ohjelmaa, jos mahdollista, tulosten parantamiseksi.

Tuntemattomiksi jääneitä näytteitä voidaan analysoida muilla testeillä. Näytteitä voisi myös yrittää tyypittää käyttämällä parempia alukkeita tai RT/PCR-entsyymejä.

Vuokaavio toimii ainakin jossain määrin, sillä tuntemattomista näytteistä saadaan osa tyypitettyä. Tyypitettyjä viruksia voidaan jatkossa mahdollisesti kasvattaa ja käyttää hyödyksi tutkimuksessa.

LÄHTEET

1. The Pirbright Institute 2016. Viitattu 6.5.2016 www.picornaviridae.com
2. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Viitattu 6.5.2016 http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/97.html
3. Österback R., Tevaluoto T., Ylinen T., Peltola V., Susi P., Hyypiä T., Waris M. Simultaneous Detection and Differentiation of Human Rhino- and Enteroviruses in Clinical Specimens by Real-Time PCR with Locked Nucleic Acid Probes. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(12):3960
4. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Viitattu 6.5.2016 http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/657.html
5. Merilahti P., Tauriainen S., Susi P. Human Parechovirus 1 Infection Occurs via $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ Integrin. *PLoS ONE.* 2016, 11(4)
6. Bubba L., Pellegrinelli L., Pariani E., Primache V., Amendola A., Binda S. A Novel Multiplex One-Step Real-Time RT-PCR Assay for the Simultaneous Identification of Enterovirus and Parechovirus in Clinical Fecal Samples. *J. Prev. Med. Hyg.* 2015, 56:E57-E60
7. Pfaffl M. Quantification Strategies in Real-Time PCR. *A-Z of Quantitative PCR.* 2004, Chapter 3
8. Mackay I., Arden K., Nitsche A. Real-Time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research.* 2002, Vol. 30, no. 6
9. RotorGeneQ_UserManual_012009
10. Wisdom A., McWilliam Leitch E. C., Gaunt E., Harvala H., Simmonds P. Screening Respiratory Samples for Detection of Human Rhinoviruses (HRVs) and Enteroviruses: Comprehensive VP4-VP2 Typing Reveals High Incidence and Genetic Diversity of HRV Species C. *J. Clin. Microbiol.* 2009, Vol. 47, No.12
11. Allan Nix W., Steven Oberste M., Pallansch M. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006, Vol. 44, No. 8
12. Benschop K., Molenkamp R., van der Ham A., Wolthers K., Beld M. Rapid Detection of Human Parechoviruses in Clinical Samples by Real-Time PCR. *J. Clin. Virology.* 2008, 41 p. 69-74
13. Harvala H., Robertson I., McWilliam Leitch E. C., Benschop K., Wolthers K. C., Templeton K., Simmonds P. Epidemiology and Clinical Associations of Human Parechovirus Respiratory Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2008, Vol. 46 No. 10
14. Biomerieux USA. Viitattu 10.5.2016 <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/nuclisenseasytag>
15. Qiagen. Viitattu 10.5.2016 <https://www.qiagen.com/fi/shop/sample-technologies/rna/rna-preparation/qiaamp-viral-rna-mini-kit#resources>
16. Omega Bio-tek. Viitattu 10.5.2016 <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/09/R6873-HP-Viral-RNA-DNA-Kit-Combo-Online.pdf>
17. Zymo Research. Viitattu 10.5.2016 <http://www.zymoresearch.com/rna/total-rna-purification/viral-rna/zr-viral-rna-kit>

18. CAP TODAY. Viitattu 11.5.2016 <http://www.captodayonline.com/productguides/instruments/automated-molecular-platforms-october-2015/nuclisens-easymag-auto-molecular-2015.html>