



Tea Rostela

Enterovirusinfektiot lapsilla ja infektioiden yhteys tyypin 1 diabetekseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

10.2.2011

Tekijä Otsikko	Tea Rostela Enterovirusinfektiot lapsilla ja infektioiden yhteys tyypin 1 diabetekseen
Sivumäärä Aika	83 sivua + 5 liitettä 10.2.2011
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biotekniikka
Ohjaaja Ohjaava opettaja	Dosentti Merja Roivainen Filosofian tohtori Annika Järviluoma
<p>Tyypin 1 diabetes on elinspesifinen autoimmuunitauti, jonka puhkeamiseen uskotaan geneettisten tekijöiden ohella vaikuttavan myös ympäristötekijät. Enterovirusia pidetään tällä hetkellä yhtenä pääympäristötekijänä diabeteksen kehityksessä.</p> <p>Työssä määritettiin tyypin 1 diabetekselle geneettisesti alttiiden tutkimushenkilöiden nenäerite- ja ulostenäytteissä mahdollisesti esiintyviä ihmisen enterovirusia ja tyypitettiin ne geneettisesti. Työn tavoitteena oli selvittää, kuinka yleisiä enterovirusinfektiot ovat tyypin 1 diabetekselle geneettisesti alttiilla lapsilla ja miten infektiota esiintyy eri ikäluokissa. Tavoitteena on myös löytää tutkimushenkilöiden keskuudesta mahdollisia infektiokerkkiä lapsia ja lapsia, joilla enterovirusinfektiot ovat pitkittyneitä.</p> <p>Potilasnäytteistä detektoitiin enterovirusia käyttäen reaaliaikaista PCR-menetelmää. Näytteiden mahdollisesti sisältämät infektiiviset enterovirukset eristettiin soluviljelymenetelmällä. Työssä käytetty enterovirusten molekulaarinen tyypitys perustuu RT-PCR:ään ja VP1-kapsidiproteiinia koodaavan genomialueen sekvensointiin.</p> <p>Tutkimuksessa havaittiin, että suurin osa enterovirusinfektioista sairastettiin alle 18 kuukauden iässä. Enterovirusia esiintyi suolistossa eniten loppukesästä, kun taas hengitysteissä niiden (rino/enterovirusten) havaittiin aiheuttavan infektiota eniten loppukevällä ja alkusyksystä. Tutkimushenkilöistä löydettiin yksi lapsi, jonka epäiltiin sairastaneen pitkittynyt EV68-infektio. Työtä suoritettaessa heräsi myös epäily siitä, että hengitystievirukseksi leimattu EV68 voisi lisääntyä myös suolistossa. Työssä onnistuttiin tyypittämään CVA2-, CVA5-, EV68- ja HRV49-virusia. Työn tulokset ovat apuna suuremman tutkimuksen toteutuksessa, jossa pyritään kartoittamaan virusinfektiot, jotka tutkimuslapset sairastavat ennen tyypin 1 diabetekseen sairastumistaan.</p>	
Avainsanat	enterovirus, rinovirus, diabetes, PCR, VP1-kapsidiproteiini, tyypitys

Author Title Number of Pages Date	Tea Rostela Enterovirus infections among children and their association with type 1 diabetes 83 pages + 5 appendices 10.2.2011
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biotechnology
Instructor Supervisor	Merja Roivainen, Adjunct professor Annika Järviluoma, PhD
<p>Type 1 diabetes is an organ-specific autoimmune disease that may be triggered by genetical and environmental factors. Enteroviruses are considered as one of the main candidates for an environmental trigger of type 1 diabetes.</p> <p>In this thesis project the enteroviruses of the nasal swab and fecal samples collected from people having an increased genetic risk for type 1 diabetes were determined and genetically typed. The aim of this study was to investigate how common enterovirus infections are and how their straddle different ages groups. Another aim was to find among the study subjects potential children with higher susceptibility to enterovirus infections and children with prolonged enterovirus infections.</p> <p>Enteroviruses were detected from patient samples using real-time PCR assay. Infectious enteroviruses were isolated in cell cultures. Molecular typing used in the study is based on RT-PCR and amino acid sequencing of the VP1 capsid protein.</p> <p>The project found that the most of the enterovirus infections were suffered under the age of 18 months. Intestinal enterovirus infections occurred mainly at the end of summer. Rino/enteroviruses cause respiratory infections mainly at the end of spring and early fall. One of the subjects was suspected to have prolonged EV68-infection. Consequently, a suspicion arose that EV68, which is usually considered as a respiratory virus, could also replicate itself in the intestine. The results of this study are part of a larger research which aim is to detect virus infections that the study subjects have suffered before type 1 diabetes is potentially triggered.</p>	
Keywords	enterovirus, rhinovirus, diabetes, PCR, VP1 capsid protein, typing

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet

1 JOHDANTO	9
KIRJALLISUUSOSA	10
2 <i>PICORNAVIRIDAE</i> -HEIMO	10
2.1 Luokittelu	10
3 ENTEROVIRUS-SUKU	11
3.1 Luokittelu	11
3.2 Rakenne	11
3.3 Genomi	12
3.4 Lisäntymiskierto	13
3.5 Hapostabiilisuus	15
3.6 Ihmisen enterovirukset	15
3.6.1 Luokittelu	15
3.6.2 Epidemiologia	16
3.7 Ihmisen rinovirukset	17
3.7.1 Luokittelu	17
3.7.2 Epidemiologia	17
3.8 Patogeneesi	18
3.9 Inaktivointi	19
4 DIAGNOSTIIKKA	20
4.1 Virusten viljely	20
4.1.1 Solulinjat	20

4.1.2 Infektion eteneminen ja määräytyminen	21
4.2 Sekvensointi ja tyyppitys	22
5 ENTEROVIRUSINFEKTIO	23
5.1 Tartunnan saaminen	24
5.2 Esiintyvyys	26
5.3 Hengitystieinfektiot	27
5.3.1 Ihmisen enterovirusten aiheuttamat	27
5.3.2 Ihmisen rinovirusten aiheuttamat	27
6 TYYPIN 1 DIABETES	29
6.1 Yleistä	29
6.1.1 Beetasolutuho	29
6.1.2 Esiintyvyys	30
6.2 Taudin kehittyminen ja sen eteneminen	30
6.3 Geneettiset tekijät	32
6.4 Ympäristötekijät	33
6.5 Enterovirusten yhteys tyypin 1 diabetekseen	33
TUTKIMUSOSA	36
7 TUTKIMUKSEN TAUSTA	36
8 TYÖN TAVOITTEET	37
8.1 Tutkimuskohde	37
8.2 Työvaiheet	38
9 MENETELMÄT	40
9.1 Näytteiden esikäsittely	40
9.1.1 Ulosteen esikäsittely	40
9.1.2 Nenäeritteen esikäsittely	41
9.2 RNA-eristys	41
9.3 Reaaliaikaiset RT-PCR:t	42

9.3.1 Enterovirusten reaaliaikainen RT-PCR	42
9.3.2 Rinovirusten reaaliaikainen RT-PCR	47
9.4 Enteroviruseristys	50
9.5 PCR	53
9.5.1 Oberste-A-RT-PCR	53
9.5.2 PCR-tuotteen analysointi ja puhdistus	55
9.5.2.1 Etidiumbromidia sisältävän agarosigeelin elektroforeesi	55
9.5.2.2 PCR-tuotteen visualisointi Elchrom-geelien avulla ja suora sekvensointi ilman puhdistusta	56
9.6 Sekvensointi ja tyypitys	57
10 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	59
10.1 Näytteet ja tutkimushenkilöt	59
10.2 Enterovirusinfektioiden esiintyvyys	61
10.2.1 Eri vuodenaikoina	62
10.2.2 Eri ikävaiheissa	64
10.3 Tyypitetyt virukset	65
10.3.1 Suoliston enterovirusinfektiot	68
10.3.2 Hengitysteiden enterovirusinfektiot	70
10.4 Pitkittyneet enterovirusinfektiot	71
10.5 Enterovirusinfektioille alttiit lapset	72
10.6 Työn onnistumisen arviointi ja jatkotutkimusehdotukset	73
11 YHTEENVETO	74
LÄHTEET	77
LIITTEET	
Liite 1: Enteroviruslajit ja niiden alaiset serotyypit	
Liite 2: Infektiot taulukoituina	
Liite 3: Tyypitystulokset	
Liite 4: Pitkittyneen EV68-infektioepäilyn näytteet	
Liite 5: Käytetyt reagenssit	

Lyhenteet

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) = Virusten taksonomian kansainvälinen komitea

HEV = ihmisen enterovirus

HRV = ihmisen rinovirus

PV = poliovirus

CV = coxsackievirus (CVA = coxsackievirus A, CVB = coxsackievirus B)

EV = enterovirus

E = echovirus

VP1–VP4 = viruksen kapsidiproteiinit 1–4

VPg = genomiin kiinnittynyt virusproteiini

UTR (untranslated region) = ei-koodaava alue

IRES (internal ribosome entry site) = ribosomien kiinnittymiskohta

ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) = solun sisäinen adheesiomolekyylä 1

LDL-R (low-density lipoprotein reseptor) = alhaisen tiheyden lipoproteiinireseptori

PVR = poliovirusreseptori

CAR = coxsackievirus-adenovirusreseptori

DAF (decay-accelerating factor) = hajottamista kiihdyttävä tekijä

VLA-2 (very late antigen) = myöhäinen antigeeni 2

PCR (polymerase chain reaction) = polymeerasiketjureaktio

TYKS = Turun yliopistollinen keskussairaala

UV-valo = ultraviolettivalo

CPE (cytopathic effect) = sytopaattinen vaikutus

cDNA = komplementaarinen DNA

RT = käänteiskopioijaentsyymi

T1D = tyypin 1 diabetes

ICA = saarekesoluvasta-aineet

IAA = insuliiniautovasta-aineet

GADA = glutamiinihappodekarboksylaasivasta-aineet

GAD = glutamiinihappodekarboksylaasi

THL = Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

EV rRT-PCR = enterovirusten reaaliaikainen RT-PCR

HRV rRT-PCR = rinovirusten reaaliaikainen RT-PCR

MgCl₂ = magnesiumkloridi

PBS-liuos = kalsium- ja magnesiumsuoloja sisältävä fosfaattipuskuroitu suolaliuos

LATU = THL:n laboratoriotukiyksikkö

PeStG = penisilliinin, streptomysiinin ja gentamysiinin seos

rpm (revolutions per minute) = kierrosta minuutissa

Ct-arvo = (Cycle threshold) sykli-luku, jolla PCR-positiivinen näyte on ylittänyt asetetun kynnysarvon

bp (base pair) = emäspari

I = inosiini

1 Johdanto

Työ suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksella dosentti Merja Roivaisen johtamassa Suolistovirusyksilössä vuonna 2010. Merja Roivainen on virustutkimuksesta vastaava henkilö INDIS-tutkimuksessa, jonka näyteaineistosta insinööriä tehtiin. INDIS-tutkimuksessa pyritään selvittämään erilaisten tulehdustautien mahdollista vaikutusta nuoruusiän diabeteksen kehittymiseen. Tutkimuksen tavoitteena on löytää uusia keinoja diabeteksen ehkäisemiseen.

Tyypin 1 diabetes on yleistynyt viime vuosikymmenien aikana voimakkaasti, minkä vuoksi ympäristötekijöiden uskotaan geneettisten tekijöiden ohella vaikuttavan taudin kehittymiseen. Monet viimeaikaiset tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että lapsuuden enterovirusinfektiot lisäävät riskiä sairastua diabetekseen.

Tässä insinööriä tarkasteltiin geneettisesti tyypin 1 diabetekselle alttiiden tutkimuslasten sairastamia enterovirusinfektioita. Insinööriä tarkoituksena oli selvittää, kuinka yleisiä enterovirusinfektioita ovat eri ikäluokissa ja mihin vuodenaikoihin infektiot mahdollisesti rajoittuvat. Lisäksi tutkimushenkilöiden joukosta etsittiin enterovirusinfektioille herkkiä lapsia ja lapsia, jotka toipuvat enterovirusinfektioista tavallista hitaammin. INDIS-tutkimusta varten työssä pyrittiin myös tyypittämään geneettisesti kaikki tutkimuslasten näytteissä esiintyneet infektiiviset enterovirusisolatit.

KIRJALLISUUSOSA

2 *Picornaviridae*-heimo

Pikornavirukset ovat nopeasti lisääntyviä ja niillä on suuri muuntelevuus. Yhden noin 6–10 tuntia kestävän lisääntymiskierron aikana virus pystyy tuottamaan jopa 10 000–100 000 uutta virusta. Koska viruksen RNA-polymeraasientsyymi tekee runsaasti virheitä, voi jokaisen uuden tytärviruksen genomi poiketa toisistaan ainakin yhden emäksen verran. Muuntelu auttaa virusta sopeutumaan uusiin kasvuympäristöihin ja mahdollistaa sen eri lajien laajan serotyypikirjon. Serotyypeillä tarkoitetaan viruslajin eri kantoja, joissa jaottelu on tehty viruksen pinnan antigeenien perusteella. [1; 2]

2.1 Luokittelu

Picornaviridae-heimoon kuuluu 12 virussukua ja niiden alaisia serotyyppejä tunnetaan yli 250. *Picornaviridae*-heimoon kuuluvia sukuja ovat *Enterovirus*, *Kardiovirus*, *Aftovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* ja *Avihepatovirus*. Vanhassa luokittelussa tunnettiin myös *Rinovirus*-suku, joka kuuluu nykyään *Enterovirusiin* niiden geneettisten samankaltaisuuksien vuoksi. Vanhassa luokittelussa ei myöskään tunnettu *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* ja *Avihepatovirus* -sukuja, mutta International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) tunnusti uudet virusryhmät virallisesti elokuussa 2009. Lähitulevaisuudessa *Picornaviridae*-heimoon on ehdotettu lisättäväksi kaksi uutta virussukua "*Seal picornavirus 1*" ja "*Human cosavirus*". [1; 3]

3 Enterovirus-suku

3.1 Luokittelu

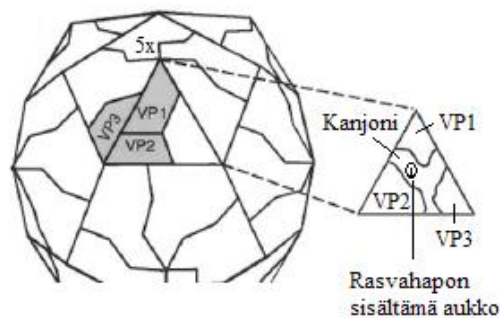
Uusimman luokittelun mukaan *Enterovirus*-sukuun kuuluu 10 lajia, joiden alaisia serotyyppejä tunnetaan yli 200 erilaista (liite 1). Enteroviruslajit ovat neljä ihmisen enteroviruslajia (HEV) A–D, kolme ihmisen rinoviruslajia (HRV) A–C, apinan enterovirus A, naudan enterovirus ja sian enterovirus B. Ennen *Enterovirus*-suvussa tunnettiin myös lajit poliovirus (PV) ja sian enterovirus A, mutta uudessa luokittelussa poliovirukset on siirretty kuuluvaksi HEV-C-lajiin ja sian enterovirus A (nykyään sian sapelovirus) sapelovirusiin, sillä niiden geneettiset ominaisuudet ovat lähempänä näiden edustajia. HEV-C on enterovirusten tyyppilaji eli se edustaa *Enterovirus*-sukua taksonomiassa. [3]

3.2 Rakenne

Enterovirukset ovat pieniä vaipattomia viruksia, joiden halkaisija on noin 30 nm. Niiden genomi koostuu lineaarisesta noin 7000–7500 emäksen mittaisesta yksijuosteisesta (single stranded RNA, ssRNA) RNA-molekyylisestä, jolla on positiivinen polariteetti. Genomia ympäröi kuori, joka koostuu 60 samanlaisesta rakenneyksiköstä ja joka noudattaa ikosahedraalista symmetriaa. Kukin kuoren rakenneyksikkö koostuu neljästä erilaisesta rakenneproteiinista: VP1:stä, VP2:sta, VP3:sta ja VP4:sta. Kuoren ulkopinnan muodostavat VP1-, VP2- ja VP3-proteiinit, kun taas VP4 sijaitsee kuoren sisäpinnalla. [1]

Pinnan muodostavat VP1-, VP2- ja VP3-proteiinit liittyvät kuorirakenteessa yhteen muodostaen polymeerin. Viisi tällaista polymeeriä muodostavat yhdessä tähdenmallisen rakenteen, jota ympäröi syvä painauma eli kanjoni, joka on muodostunut VP1-, VP2- ja VP3-proteiinien välille. Useat isäntäsolun pinnalla sijaitsevat enterovirusreseptorit, joiden avulla virus infektoi solun, sitoutuvat viruksessa kanjonin alueelle. Kanjonin pohjalla on ns. hydrofobinen tasku eli aukko, joka sisältää rasvahapon. Rasvahapon lopullinen merkitys infek-

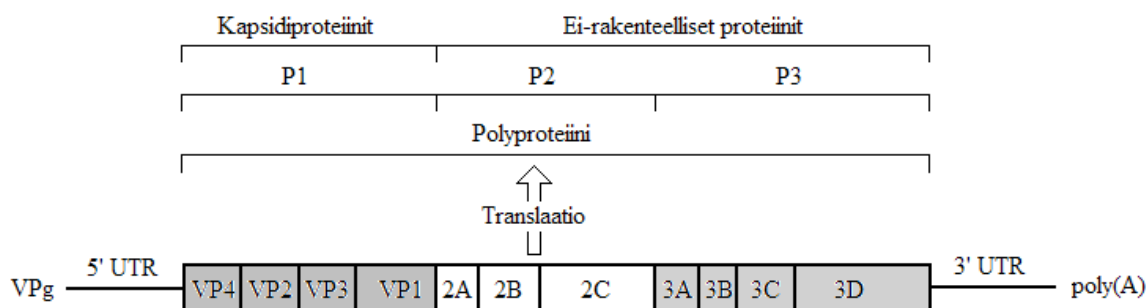
tiossa ei ole vielä selvinnyt, mutta sen uskotaan vaikuttavan viruksen stabiiliisuuteen. Enteroviruspartikkelin kuorirakenne on esitetty kuviossa 1. [1; 4, s. 451]



Kuvio 1. Enteroviruspartikkelin kuorirakenne. [Muokattu lähteestä 2.]

3.3 Genomi

Enterovirusten genomissa on kaikille pikornaviruksille ominainen virioniproteiini (VPg), joka on kovalenttisesti sitoutunut virusgenomin 5'-päähän. Enteroviruksilla tätä proteiinia koodaa yksi virusgeeni. VPg-proteiinin jälkeen genomin 5'-päässä on pitkä (620–1200 nukleotidia) ei-koodaava alue, joka sisältää replikaation ja translaation säätelyn kannalta tärkeitä sekvenssejä. Tämä ei-koodaava alue (untranslated region, UTR) sisältää myös IRES-kohdan (internal ribosome entry site), joka toimii translaatiossa ribosomien sitoutumiskohdaksi. Genomin proteiineja koodaava alue koodaa polyproteiinia, joka pilkotaan entsyymeillä pienemmiksi proteiineiksi translaatiossa. P1-alue koodaa viruksen kapsidiproteiineja, kun taas P2- ja P3-alueet koodaavat proteiineja, jotka osallistuvat replikaatioon ja proteiinin muokkaamiseen. Genomin 3'-päässä sijaitsee lyhyt (45–130 nukleotidia) ei-koodaava alue, joka tarjoaa RNA-polymeraasille (3D) sitoutumiskohdan replikaation alussa. Tämän jälkeen genomissa sijaitsee replikaation käynnistymiseen osallistuva 35–100 nukleotidin pituinen poly-A-häntä, joka on viruksen infektiivisyyden kannalta oleellinen. Genomin rakenne on esitetty kuviossa 2. [1]



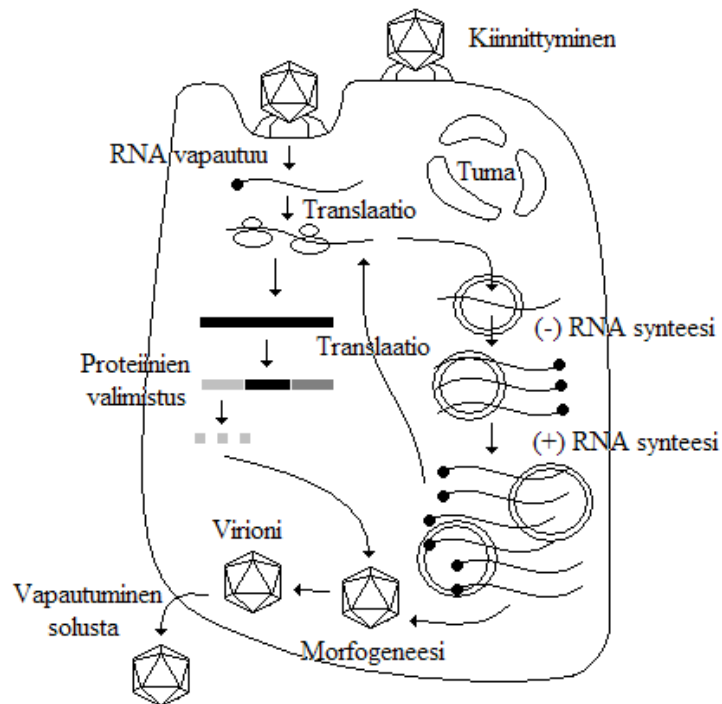
Kuvio 2. Enteroviruksen genominen rakenne ja sen koodaamat proteiinit. [Muokattu lähteestä 1, kuva 24.2.]

3.4 Lisääntymiskierto

Enterovirusten replikoituminen tapahtuu isäntäsolun solulimassa (kuvio 3). Replikaation alussa enterovirus kiinnittyy solukalvon reseptoriin. Infektiota välittävinä enterovirusreseptoreina toimivat useat erityyppiset solukalvon molekyylit, jotka on lueteltu taulukossa 1. Kiinnittyminen saa viruksen kapsidissa aikaan rakennemuutoksia, kuten VP4-proteiinin poistumisen spesifisesti viruspartikkelista. Näiden muutosten avulla viruksen sisältämä RNA saadaan vapautettua isäntäsolun solulimaan. Jotkin enterovirukset, kuten rinovirukset, kulkeutuvat solun sisään myös reseptorivälitteisellä endosytoosilla, jossa reseptoriin tarttunut virus kuljetetaan solun sisään solukalvosta kuroutuvan rakkulan eli endosomin sisällä. Tällaisessa tapauksessa RNA:n vapautuminen tapahtuu endosomin happamoitumisen avulla.

Välittömästi positiivijusteisen RNA-molekyylin päästyä sytoplasmaan alkaa translaatio, jossa valmistetaan replikaation kannalta välttämättömiä virusproteiineja sisältävä polyproteiini. Virusproteiinit tuotetaan polyproteiinista hajottavien entsyymien avulla. Tapahtumaan osallistuu pääasiallisesti kaksi viruksen omaa proteaasia, joista toinen on 2A^{pro} ja toinen joko 3C^{pro} tai 3CD^{pro}. Enterovirusten 2A-proteaasi saa lisäksi isäntäsolun oman proteiinisynteesin pysähtymään. Soluliman replikaatiokompleksissa, joka muistuttaa rakenteeltaan vesikkelejä, tapahtuvassa genomin replikaatiossa positiivisäikeisestä RNA:sta kopioidaan RNA-polymeraasin (3D) avulla komplementaarisia negatiivisäikeitä, joista kopioidaan uusia positiivijusteisia virusgenomin kopioita samaisen RNA-polymeraasin avulla. Osa

näistä toimii RNA:na uusien virusproteiinien tuotannossa osan pakkautuessa uusiin tytärviruksiin, joita alkaa muodostua kapsidiproteiineja ollessa tarvittava määrä. Uusien kapsidien ja RNA-molekyylien valmistuttua ne yhdistetään uusiksi virioneiksi morfogeneesissä, jolloin muodostuu uusia infektiivisiä viruksia odottamaan vapautumista solun hajoessa. Kuviossa 3 on esitetty syklin tapahtumien kulku. [1; 5, s. 514]



Kuvio 3. Enteroviruksen lisääntymiskierto. [Muokattu lähteestä 1, kuva 24.4.]

Yhteen replikaatiosykliin on arvioitu kuluvan 5–10 tuntia riippuen viruslajista ja ympäristötekijöistä, kuten lämpötilasta ja pH:sta. [1]

Taulukko 1. Tunnetut enterovirusreseptorit. [3; 6; 7]

Virus	Reseptori
HRV:n major ryhmä (90 serotyyppiä)	ICAM-1
HRV:n minor ryhmä (10 serotyyppiä)	LDL-R
PV (3 serotyyppiä)	PVR
CVB (6 serotyyppiä)	CAR, DAF
CVA21	ICAM-1
CVA9	$\alpha_v\beta_3$ integriini
E (yli 10 serotyyppiä) ja EV68	DAF
E-1	VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$ integriini)

Lyhenteet: ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) = solun sisäinen adheesiomolekyyli 1, LDL-R (low-density lipoprotein reseptori) = alhaisen tiheyden lipoproteiinireseptori, PVR = poliovirus reseptori, CAR = coxsackievirus-adenovirus reseptori, DAF (decay-accelerating factor) = hajottamista kiihdyttävä tekijä, VLA (very late antigen) = myöhäinen antigeeni

3.5 Happostabiilisuus

Enterovirukset ovat vakaita happamissa olosuhteissa, jolloin ne säilyttävät infektiivisyytensä ympäristössä, jonka pH on alle 3,0. Poikkeuksena tästä ovat rinovirukset, jotka eivät siedä niin korkeaa happopitoisuutta ja menettävätkin stabiilisuutensa pH:n laskiessa alle 6,0. Enterovirusten happamuuden sitokyky vaikuttaa niiden lisääntymispaikkaan. Happolabiilisuutensa vuoksi rinovirukset lisääntyvät hengitysteissä, kun taas muut enterovirukset voivat kulkea happaman mahalaukun läpi ja lisääntyä suolistossa. Sitä, miksi rinovirusten ja enterovirusten happamuuden sitokyvyt eroavat toisistaan, ei vielä toistaiseksi tiedetä.

[1]

3.6 Ihmisen enterovirukset

3.6.1 Luokittelu

Ihmisen enterovirusiin (enteroviruslajit HEV A–D) kuuluvia viruksia on yli 100 erilaista serotyyppiä, ja ne jaotellaan perinteisesti poliovirusiin, coxsackievirusiin, echovirusiin ja

uudempiin enteroviruksen serotyyppeihin. Ihmispatogeenien lisäksi mukana on kuusi HEV-A- ja HEV-B-lajeihin kuuluvaa serotyyppiä, jotka eivät pysty infektoimaan ihmistä vaan joiden isäntä on apina. [6]

Enterovirusten lajiluokittelussa on käytetty seuraavia sääntöjä: niillä on keskenään yli 70 % samankaltaisuus P1-alueen eli viruksen kapsidiproteiineja koodaavan alueen aminohapoissa, yli 70 % samankaltaisuus polyproteiinin rakennetta pilkkovien proteiinien 2C ja 3CD aminohapoissa, niillä on keskenään rajallinen määrä virusreseptoreita ja luonnollisia isäntiä, niiden glutamiini-sytosiinimäsparien osuus genomissa vaihtelee korkeintaan 2,5 % ja niiden replikaatioon liittyvät prosessit ovat keskenään yhteneviä. [6]

3.6.2 Epidemiologia

Useimmat enterovirusinfektiot ovat oireettomia eivätkä aiheuta merkittäviä sairauksia, mutta toisaalta ne voivat aiheuttaa vakaviakin sairauksia pienillä lapsilla ja henkilöillä, joilla on puutteellinen immuunipuolustus. Enterovirukset on yhdistetty useisiin akuutteihin ja kroonisiin sairauksiin. Enterovirukset ovat yleisimpiä aseptisen aivokalvontulehduksen aiheuttajia, joka on keskushermoston yleisin infektio. Niiden tiedetään liittyvän myös moniin muihin tauteihin, joista on kerrottu luvussa 5. [6]

Infektioiden vakavuudella on havaittu olevan yhteys ikään, jossa infektio sairastetaan. Esimerkiksi lapsilla runsaasti esiintyvät coxsackie B-virusinfektiot ovat lapsilla tyypillisesti vähäoireisia, kun taas aikuisella ne johtavat vakavampiin tauteihin. Infektiot ovat puolestaan yleisempiä miehillä kuin naisilla. Lisäksi miehillä on suurempi taipumus sairastua vakaviin enteroviruksen aiheuttamiin sairauksiin, kuten keskushermoston sairauksiin ja sydänlihastulehduksiin. Syitä tähän ei ole löydetty. [8; 9]

Enterovirusta voi erittyä ulosteeseen joidenkin tietojen mukaan kuusi viikkoa varsinaisen infektion alkamisesta, mutta todellisuudessa sitä voi erittyä ulosteeseen vieläkin pidempiä aikoja. Viruserityksen määrää ja kestoa voi vähentää immuniteetti, jonka potilas on saanut saadessaan poliorokotteen tai sairastettuaan aiemmin poliovirusinfektion tai jonkin muun

enterovirusinfektion. Sylkeen virusta erittyy huomattavasti lyhyemmän aikaa kuin ulosteeseen, minkä vuoksi viruksen detektio suoritetaankin yleensä ulostenäytteestä. [6]

3.7 Ihmisen rinovirukset

3.7.1 Luokittelu

Ihmisen rinovirukset (HRV) on tottumuksesta jaettu "major"- ja "minor"-ryhmiin reseptorityypin mukaan. Major-ryhmän rinovirukset käyttävät soluja infektoidessaan solunsisäistä adheesiomolekyyli 1:tä (ICAM-1), kun taas minor-ryhmän rinovirukset käyttävät virusreseptorinaan jotain LDL (low-density lipoprotein) -reseptoriperheen jäsenistä. Geneettisen rakenteen perusteella rinovirukset jaetaan A-, B- ja C-ryhmiin. On myös ehdotettu, että eräät rinovirustyyppit luokiteltaisiin erilliseen D-ryhmään, jota ICTV ei toistaiseksi ole tunnustanut olevan olemassa. [18; 19; 20]

Ihmisen enterovirusten kanssa geneettisesti hyvin samankaltaiset rinovirukset tunnettiin aiemmin omana sukunaan, mutta nykyään niiden katsotaan kuuluvan enterovirussukuun. Ihmisen rinovirusia (HRV) luultiin pitkään olevan 101 serotyyppiä, sillä ennen polymeerasiketjureaktio (polymerase chain reaction, PCR) -menetelmien kehittämistä ensisijaisena diagnostisena menetelmänä käytettiin virusviljelyä. Virusviljelyn avulla onnistuttiin löytämään vain HRV-A-ryhmän virukset ja osa HRV-B-ryhmän viruksista. Nykyaikaiset molekyyli-tason tyyppitystekniikat mahdollistivat HRV-C-ryhmän virusten löytämisen, jotka eivät kasva soluviljelmissä, ja paljastivat HRV-genotyyppijä olevan kaikkiaan yli 150 erilaista. Ihmisen rinovirusten ja ihmisen enterovirusten välisiä suhteita ja niiden geneettisiä ominaisuuksia on tutkittu runsaasti viime vuosina, sillä uudet geneettiset tyyppitysmenetelmät ovat tehneet sen mahdolliseksi. [21; 22; 23]

3.7.2 Epidemiologia

Rinovirus on yleisin flunssan aiheuttaja, mutta aiheuttaa myös vaikeampia tauteja. Aikuisilla rinovirusinfektiot eivät aina ole oireellisia, kun taas pikkulapsilla infektio on usein oireel-

linen. Pienet lapset erittävät virusta paljon ja täten myös levittävät sitä tehokkaasti. Tämä lienee syy siihen, miksi rinovirus on yleisin lasten ylempien ja alempien hengitystieinfektioiden aiheuttaja ja puolet aikuisten kaikista flunssasairauksista ovat puolestaan rinoviruksen aiheuttamia. [18; 22; 24]

Enteroviruksista poiketen rinovirus ei yleensä esiinny ulosteessa. Rinovirusta erittyy nenäeritteeseen jopa kolmen viikon ajan infektion saamisesta, ja sitä on täten havaittavissa viikkojen kuluttua infektion jälkeenkin. [16]

3.8 Patogeneesi

Infektoidakseen kohdesolun enterovirusten ja rinovirusten tulee tarttua solun pinnalla sijaitseviin spesifisiin reseptoreihin. Infektoimiseen tarvitaan virusreseptorien lisäksi myös useita avustavia molekyylejä. Se, millaista reseptoria virus infektoidessaan käyttää, määrää pitkälti sen, missä kudoksessa viruksen replikaatio tapahtuu, mihin infektiio elimistössä leviää ja minkälaisen taudinkuvan se aiheuttaa. Viruksen replikaatiopaikkaan vaikuttavat myös kohdesolun sisäiset ja ulkoiset tekijät. [7; 25; 26]

Enterovirukset lisääntyvät ensinnä limakalvojen epiteelisoluissa (etenkin nielurisoissa ja ohutsuolen Peyerin levyissä, joissa on runsaasti lymfosyyttejä sisältäviä imukeräsiä). Replikoituessaan kohdunkaulassa ja suoliliepeen imusolmukkeissa enterovirus voi aiheuttaa systemaattisen infektion ja lievän viremian eli virusten esiintymisen veressä. Rinovirukset aiheuttavat harvoin viremiaa. Retikuloendoteliaaliset (RES) kudokset, kuten imusolmukkeet, luuydin, maksa ja perna infektoituvat myös, ja virus replikoituu lisää. Tämän jälkeen virus levittyy sekundäärisiin kohde-elimiin kuten keskushermostoon, sydänlihakseen ja haimaan aiheuttaen virusinfektioille tyypillisiä oireita niissä replikoituessaan. Vaikka enterovirus voi lisääntyä monissa eri elimissä, on syytä muistaa, että enterovirusten pääasiallinen lisääntymispaikka on kuitenkin suolisto. [6; 27]

Enterovirusinfektio käynnistää elimistössä humoraalisen immuunivasteen. B-solut käynnistävät vasta-ainetuotannon, jossa ne muodostavat reseptoriensa kaltaisia vasta-aineita.

Muodostuvia vasta-aineita ovat IgM, IgG ja IgA, joista IgM muodostuu ensimmäisenä. IgG ja IgA antavat pitkäaikaisen suojan infektion aiheuttanutta enterovirusta vastaan. [6; 28]

3.9 Inaktivointi

Enterovirukset säilyttävät infektiivisyytensä suhteellisen hyvin, vaikka niitä käsiteltäisiin tavallisilla laboratorion desinfiointiaineilla kuten 70-prosenttiselle etanolilla, isopropanolilla ja kvaternäärisillä ammoniumyhdisteillä. Se ei ole myöskään kovin herkkä rasvaliukoisille liuottimille, kuten eetterille ja kloroformille, eikä monille puhdistusaineille. Enteroviruksia voidaan inaktivoida formaldehydillä, glutaraldehydillä, vahvoilla hapoilla, natriumhypokloriitilla ja vapailla klooriyhdisteillä. Näiden yhdisteiden aiheuttaman inaktivaation taso riippuu liuoksen konsentraatiosta, pH:sta, vaikutusajasta ja ulkopuolisista orgaanisista materiaaleista. Useimpien enteroviruksia inaktivoivien reagenssien vaikutus perustuu viruksen aktiiviseen kemialliseen muokkaamiseen. Samoin kuin muutkin enterovirukset, myös rinovirukset ovat resistenttejä rasvaliukoisille liuottimille, kuten etanolille, eetterille, kloroformille ja fluorihilipolymeereille. Ne sietävät myös ionittomia detergenttejä eli aineita, jotka alentavat pintajännitystä. [6; 20]

Enterovirukset ovat suhteellisen termostabiileja. Valtaosa enteroviruksista on inaktivoitavissa 42 °C:ssa, mutta rinovirukset inaktivoituvat tavallisesti jo matalammassa lämpötilassa. Rinovirukset säilyvät suhteellisen stabiileina 24–37 °C:ssa, mutta jotkin rinovirustyyppit, kuten 12, 15, 18 ja 19, voivat säilyttää aktiivisuutensa lyhyen aikaa jopa 50 °C:n lämpötilassa. Rinovirus säilyttää infektiivisyytensä –70 °C:ssa jopa vuosien ajan. Enterovirusten inaktivointi voidaan suorittaa etenkin pinnoilta myös ultraviolettivalon (UV-valo) avulla. [6; 20]

4 Diagnostiikka

4.1 Virusten viljely

4.1.1 Solulinjat

Kaikkia tunnettuja enterovirusia voidaan kasvattaa joko soluviljelmissä tai hiirenpoikaisissa. Suurin osa enterovirusten eri serotyypeistä voi kasvaa yhdessä tai useammassa ihmisen tai kädellisten jatkuvissa solulinjoissa. Kuitenkaan ei ole olemassa yhtä solulinjaa, jossa kaikki viljelykelpoiset enterovirukset kasvasivat. Ihmisen enteroviruksille (HEV A–D) luonnollinen isäntä on ihminen, mutta myös eräät apinalajit. Enterovirusten on havaittu aiheuttavan laboratorionkokeissa infektiota myös imeväisikäisillä hiirillä. [6]

Solujen infektoituminen vaatii viruksen tarttumisen solun pinnan virusreseptoreihin. Viruksen käyttämä virusreseptori määrää sen, missä kudoksessa virus voi kasvaa. Enterovirukset voivat käyttää useita eri reseptoreita. Toisaalta ne voivat myös adaptoitua kasvamaan jossain niille epätavallisessa kohdesolussa esimerkiksi viruksen geneettisten muutosten seurauksena, jolloin niiden ominaisuudet virusreseptoriin kiinnittymiseksi muuttuvat. [6]

Ihmisen enterovirusten tiedetään kasvavan solulinjoissa, jotka ovat peräisin ihmisen karsinomasoluista, kuten paksusuolen adenokarsinomasolusta, kohdunkaulan karsinomasolusta ja rabdomyosarkoomasolusta. Koska jotkin enterovirukset lisääntyvät luonnollisesti eräissä apinalajeissa, on ihmisten enterovirusten viljelyssä mahdollista käyttää myös apinasta peräisin olevia solulinjoja, kuten vihhermarakatin (green monkey) munuaisen soluja. [6; 29]

Rinovirus kasvaa tehokkaasti solulinjoissa, jotka ovat peräisin ihmisistä tai muista kädellisistä. Näistä kahdesta ihmisen solulinjat ovat rinoviruksille huomattavasti herkempiä. HRV-A- ja HRV-B-ryhmien virukset kykenevät lisääntymään monissa ihmisperäisissä soluissa. Näitä ovat muun muassa alkion munuaisen ja sikiön verikalvon solulinjat sekä kohdunkaulan karsinomasolun solulinja. Solulinjojen joukosta ei ole löydetty yhtä linjaa, joka olisi muita tehokkaampi rinovirusten kasvatuksessa. HRV-C-ryhmän viruksia ei ole onnistuttu

viljelemään missään solulinjassa, vaan niiden diagnosointi tulee suorittaa PCR-menetelmällä nenäeritenäytteestä. [6]

4.1.2 Infektion eteneminen ja määrittäminen

Enteroviruksille on ominaista aiheuttaa soluviljelmässä kasvaessaan sytopaattisia muutoksia viljelmän soluihin. Tällainen enterovirusinfektion aiheuttama sytopaattinen vaikutus (cytopathic effect, CPE) voidaan havaita mikroskoopilla yleensä 1–7 vuorokauden aikana, jolloin soluviljelmässä havaitaan solujen kutistumista, hajoamista ja tuman kutistumista. Muutokset voivat olla näitä kaikkia tai vain jotain näistä. Ensimmäisiä muutoksia voidaan havaita jo 24 tunnin kuluttua viruksen istutuksesta, mikäli pieni solumäärä sisältää paljon infektoivia partikkeleja. Pieni virusmäärä ei kuitenkaan aina aiheuta soluviljelmässä näkyviä muutoksia useankaan päivän aikana, vaikka soluja olisikin infektoitunut suuri määrä. On myös enterovirusia, jotka eivät aiheuta lainkaan CPE:tä soluviljelmään tai aiheuttavat sen vasta usean pasaasin jälkeen. Tämän vuoksi negatiivisen istutustuloksen antamat näytteet olisi syytä jatkoistuttaa. [6; 30]

Kuten muutkin enterovirukset, myös rinovirukset aiheuttavat CPE:n infektoidessaan soluviljelmän soluja. Niiden aiheuttama CPE voidaan havaita osittain myös solumaton riekalotumisena. Rinovirusten viljelyolosuhteet kuitenkin poikkeavat ihmisen enterovirusten vastaavista. Viljelmät, joihin on istutettu rinovirusia, tulee inkuboida 33 °C:n lämpötilassa alustoilla, joiden pH on 7,0–7,2. [20]

Infektio leviää yleensä heti merkittävän CPE:n havainnoinnin jälkeen koko soluviljelmään aiheuttaen yksikerroksisen maton tuhoutumisen kokonaan. Joissain tapauksissa tämä tuhoutuminen voi tapahtua jopa tunneissa. [6]

Jotkin soluviljelmään istutettavan näytteen komponentit voivat olla myrkyllisiä soluille. Nämä komponentit voivat aiheuttaa sytopaattiseen vaikutukseen helposti sekoitettavia muutoksia, jotka ilmaantuvat soluviljelmään ensimmäisen 24 tunnin aikana. Muita virusviljelyä haittaavia tekijöitä voivat olla näytteen mahdolliset bakteeri- tai sienikontaminaatiot. Niistä pyritään pääsemään eroon näytteen esikäsittelyvaiheessa, mutta joissain tapauksis-

sa näytteeseen saattaa jäädä mikrobeita, jotka tuhoavat soluviljelmän ja estävät näin virusten lisääntymisen viljelmän soluissa. [6]

4.2 Sekvensointi ja tyypitys

Viruksen tunnistus perustuu sen genomisekvenssin tuntemiseen. Nukleiinihappojen sisältämää informaatiota voidaan käyttää apuna viruksen tyypityksessä. Tarvittavat viruksen tiedot saadaan suoraan PCR:n ja nukleiinihappojen sekvensoinnin avulla. Molekulaarinen tyypitys perustuu RT (reversiibeli transkriptaasi) -PCR:ään ja VP1-kapsidiproteiinia koodaavan alueen nukleotidisekvenssin joko osittaiseen tai kokonaan sekvensointiin. VP1-sekvenssin määrittämiseen perustuvalla tyypityksellä voidaan korvata perinteinen virusviljelyyn perustuva tyypitys, jossa tulos varmistettiin neutralisaatiotestin avulla. Neutralisaatiotestissä virukset tunnistetaan niihin kohdistuvien vasta-aineiden avulla. [6]

Tuntematon virusisolaatti tunnistetaan vertaamalla sen VP1-sekvenssiä tietokannan enterovirusprototyyppien ja -kantavarianttien vastaavaan sekvenssiin. Isolaatin VP1-nukleotidisekvenssillä tulee olla vähintään 75 % samankaltaisuus (aminohappotasolla 85 %) serotyypin prototyypin kanssa, jotta tuntematon virus voidaan määrittellä kyseiseksi serotyypiksi. Seuraavaksi yhtenevän serotyypin prototyypin kanssa samankaltaisuuden tulee olla samanaikaisesti alle 70 %. Jos vertailussa saatu yhdenmukaisuus samankaltaisimman serotyypin kanssa on kuitenkin alle 70 %, se voi tarkoittaa uuden toistaiseksi tuntemattoman serotyypin löytymistä. Jos samankaltaisuus on 70 %:n ja 75 %:n välillä, tulee tyypitys suorittaa uudelleen. Näiden rajausten avulla voidaan homologiset serotyypit erottaa heterologisista, ja uusia serotyyppisiä voidaan tunnistaa. Tämä menetelmä mahdollistaa myös niiden enterovirusisolaattien tunnistuksen, joita on hankala tai mahdoton tunnistaa standardoitujen immunologisten reagenssien avulla. [6]

5 Enterovirusinfektiot

Suurin osa enterovirusinfektioista on oireettomia, jolloin immuunipuolustus estää infektion etenemistä merkittävästi tai viruksen lisääntymisessään käyttämät mekanismit eivät aiheuta oireita. Se, aiheuttaako enterovirus oireita, riippuu myös siitä, pääseekö virus kulkeutumaan sekundäärisiin kohde-eliimiin, joilloin aiheutuu oireellinen infektio. Enterovirukset voivat aiheuttaa kliinisesti erilaisia oireyhtymiä ohittaessaan elimistön puolustusmekanismit. Yksittäinen enteroviruksen serotyyppi voi johtaa useisiin eri oireisiin ja tautiprosesseihin. Toisaalta yhden sairauden takana voi olla monta eri enteroviruksen serotyyppiä. Vain harvoissa tapauksissa tietyt oireet yhdistetään johonkin spesifiseen enterovirukseen. Näistä harvoista tapauksista esimerkkinä ovat poliovirus, joka on akuutin velttohalvauksen aiheuttaja, ja CVA16, joka aiheuttaa varhaislapsuudessa yleisesti esiintyvää lievää enterorokkoa. [6; 31, s. 436 ja 437]

Enterovirusten aiheuttamia tauteja ovat muun muassa poliomyeliitti, aivokalvontulehdus, aivokuume, sydänlihastulehdus, Bornholmin tauti, diabetes, silmän sidekudostulehdus, erilaiset hengitystieinfektiot, enterorokko ja herpangina. Luultavasti suurin osa enterovirusinfektioista on kuitenkin oireettomia tai lieväoireisia. Enterovirusinfektioihin liittyy usein myös makulopapulaarista ihottumaa tai nokkosrokkoo, jota esiintyy vartalon ja raajojen alueella. Ihmispatogeenien enteroviruslajien aiheuttamat kliiniset piirteet on koottu taulukoon 2. [32]

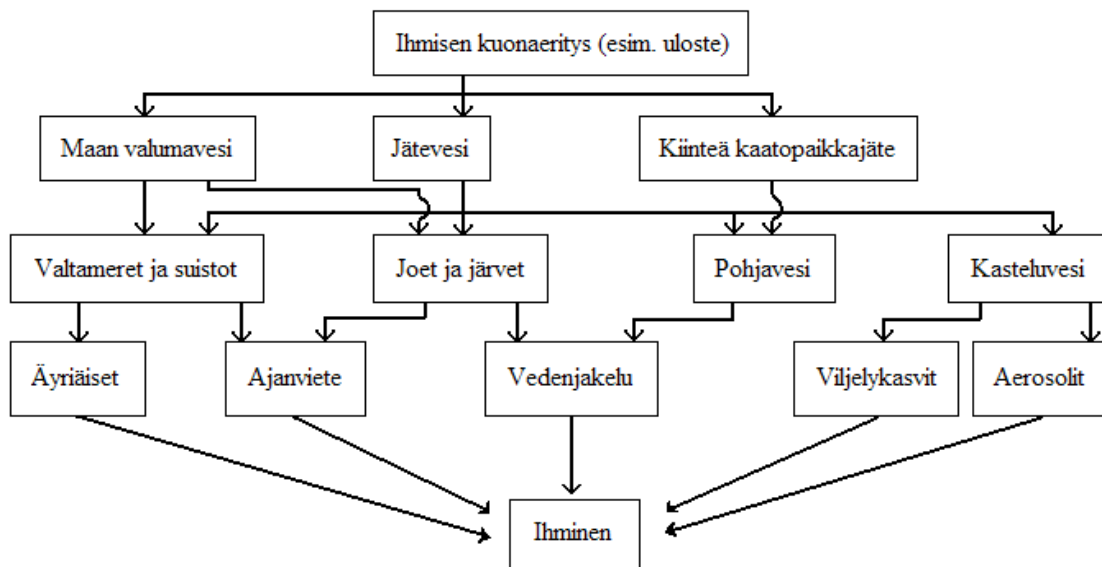
Taulukko 2. Ihmispatogeenien enteroviruslajien aiheuttamat kliiniset piirteet. [3; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17]

Laji	Kliiniset piirteet
HEV-A	aivokalvontulehdus, aivotulehdushalvaus, sydänlihastulehdus, ihottuma, lasten hermostosairaudet, ripuli, enterorokko, herpangina
HEV-B	aivokalvontulehdus, aivotulehdushalvaus, sydänlihastulehdus, rintakipu, maha-suolitulehdus, hengitystieinfektiot, Bornholmin tauti, haimatulehdus, vastasyntyneen yleistynyt infektio, ihottuma, ripuli
HEV-C	poliomyeliitti, maha-suolitulehdus, hengitystieinfektiot, sidekalvotulehdus, herpangina, aivokalvontulehdus
HEV-D	Sidekalvotulehdus
HRV-A	flunssa, korvatulehdus, sivuontelotulehdus, krooninen keuhkoputken tulehdus, astman vaikeutuminen
HRV-B	flunssa, korvatulehdus, sivuontelotulehdus, krooninen keuhkoputken tulehdus, astman vaikeutuminen
HRV-C	flunssa, korvatulehdus

5.1 Tartunnan saaminen

Enterovirukset ovat tehokkaita infektoijia. Niiden tärkein tartuntareitti on feko-oraalinen eli ne kulkeutuvat ulosteista käsiin, käsistä toisiin ihmisiin ja lopulta suuhun. Pissatartuntana tapahtuva hengitystietartunta ja kontaminoituneen ruoan kautta tapahtuva tartunta ovat myös mahdollisia. Enterovirukset säilyvät infektiivisinä elimistön ulkopuolella, kuten jäteveissä, useita kuukausia. Enterovirusten tyypilliset tartuntareitit ympäristöstä ihmiseen on esitetty kuviossa 4. Rinovirukset tarttuvat pääasiallisesti pissatartuntana tai käsien kautta. [5, s. 515; 6; 24; 32]

Jotkin enterovirusten tartuntareitit ovat yhdistettävissä selkeästi taudin fenotyyppeihin eli ilmiöihin. Esimerkiksi CVA21, joka aiheuttaa suolistoinfektioiden lisäksi hengitystieinfektioita, leviää hengitysteiden eritteistä kontaminoituneen ilman kautta, ja puolestaan äkillistä silmän verenvuotoista sidekalvotulehdusta (akuutti hemorrhaginen konjunktiviitti) aiheuttava EV70 leviää joko suoraan silmien tai hengitysteiden eritteiden kautta tai epäsuorasti kontaminoituneiden esineiden kautta. [6]



Kuvio 4. Yleisimmät enterovirusten tartuntareitit ympäristöstä ihmiseen. [Muokattu lähteestä 6, kuva 25.7.]

Ihmisen enterovirus pääsee elimistöön joko hengitysteiden tai ruoansulatuskanavan limakalvojen kautta. Ne ovat happostabiileja, joten ne voivat kulkeutua mahalaukun kautta ohutsuoleen tuhoutumattomina. Enterovirusten primääristä kohdesolua ruoansulatuskanavan limakalvoilla ei vielä tunneta, mutta M-soluilla (membraneous cell) uskotaan olevan vaikutusta virusten suoraan pääsyyn suolistosta limakalvonlaiseen imukudokseen. Tämän seurauksena virus voi päästä verenkierron kautta sekundääriseen kohdekudokseen, esim. sydänlihakseen. Rinovirus puolestaan pääsee elimistöön silmän kyynelkanavan ja nenän kautta. Koska rinovirukset inaktivoituvat mahalaukun matalassa pH:ssa helposti, ne lisääntyvät suoliston sijasta ylemmissä hengityselimissä, joissa pH on korkeampi ja ympäristön lämpötila matalampi. Niiden replikoituminen tapahtuu pääasiallisesti silmän sädekehän ja nenän limakalvon soluissa, mutta ne replikoituvat myös suun ja kurkun alueilla. [5, s. 515; 6; 33; 34, s. 27]

Enterovirustaudeissa oireiden ilmaantumiseen kuluva aika vaihtelee taudista riippuen yhdestä vuorokaudesta 15 vuorokauteen. Silmän sidekudostulehdus oireilee tyypillisesti jo vuorokauden jälkeen tartunnasta, kun taas sydänlihastulehdus kehittyy kahdessa viikossa. [5, s. 515]

Lapsi saa äidiltään vasta-aineita, jotka suojaavat lasta infektioilta heti syntymän jälkeen, mutta näiden äidiltä saatujen vasta-aineiden taso alkaa laskea nopeasti. Tässä laskuvaiheessa lapsen omat vasta-aineet ovat vielä kovin vähäiset, jolloin lapsella on lisääntynyt riski sairastua enterovirusinfektioihin. Sairastetun enterovirusinfektion jälkeinen immuni- teetti on tyyppispesifinen, ja neuroloivat vasta-aineet ovat sen toiminnassa tärkeitä. [6]

5.2 Esiintyvyys

Enteroviruksen aiheuttamia tauteja esiintyy Suomessa ja muissa lauhkean vyöhykkeen maissa eniten loppukesällä ja syksyllä, kun taas trooppisen ilmaston maissa niitä esiintyy ympäri vuoden. Ne voivat aiheuttaa satunnaisia infektioita tai laajoja epidemioita. Ne aiheuttavat epidemioita kaikkialla maailmassa, mutta etenkin huonoissa hygieenisissä olosuh- teissa, kuten kehitysmaissa. Kehitysmaissa lapset sairastuvat enterovirusinfektioihin myös nuorempina kuin kehittyneissä maissa. Enterovirusten eri serotyypeille on tyyppillistä maan- tieteellisesti rajoittunut esiintyminen, jolloin niitä tavataan luonnollisesti vain tietyissä pai- koissa. Tämä vuoksi epideemisen tartunnan alkuperä on yleensä helppo jäljittää. [5, s. 514–516; 6]

Suomessa vuosina 1971–1992 kerätyistä jätevesinäytteistä eristetyistä enteroviruksista yleisimmät olivat Hovin ym. 1996 tekemän tutkimuksen mukaan CVB5 (15 %), echovirus 11 (12 %), CVA9 (9 %), echovirus 22 (1,8 %), CVB3 (7 %), echovirus 30 (7 %) ja CVB2 (5 %). Echovirus 22 kuuluu nykyään ihmisen parechovirusiin, mutta muut tutkimuksessa detektoidut virukset kuuluvat HEV-B-ryhmään. [35]

Rinovirukset aiheuttavat infektioita ympärivuoden, mutta niiden esiintyvyys on suurinta syksyllä syys-marraskuussa ja keväällä huhti-toukokuussa. Syitä tähän vuodenaikaisvaihte- luun ei tiedetä. Väestössä kiertää yleensä useita eri enterovirustyyppisiä samanaikaisesti. Muista enteroviruksista poiketen rinovirusia voi saman perheen sisällä esiintyä useita eri serotyyppejä samanaikaisesti. [19; 36]

Rinovirukset aiheuttavat infektiota kaikenikäisille, mutta infektiolle herkimpiä ovat lapset. Blomqvistin ym. vuonna 2002 julkaistussa tutkimuksessa havaittiin, että rinovirusinfektion oli sairastanut lähes kaikki tutkimuksen alle kaksivuotiaat lapset. Kylmällä ei ole havaittu olevan osuutta flunssan etiologiassa, mutta stressin sen sijaan on havaittu lisäävän rinovirusinfektioiden esiintyvyyttä. Lisäksi Jenista ym. vuonna 1984 huomasivat alhaisen sosio-ekonomisen aseman ja rintaruokinnan puutteen lisäävän riskiä sairastua enterovirusinfektiin. [37; 38; 39; 40]

5.3 Hengitystieinfektiot

5.3.1 Ihmisen enterovirusten aiheuttamat

Enterovirukset ovat yleisiä hengitystiesairauksien aiheuttajia. Infektiot aiheuttavat vähäisiä oireita, mutta voivat aiheuttaa myös klinisen sairauden. Itämisaika näillä infektioilla on 1–3 vuorokautta. Eri tutkimukset ovat osoittaneet CVA-, CVB- ja echovirusten olevan useissa enteroviruksen aiheuttamissa hengitystieinfektioissa taudin aiheuttajia. Enterovirusten on todettu aiheuttavan infektiota useammin ylemmissä hengitysteissä kuin alemmissä hengitysteissä. Ylempiä hengitystieinfektioita ovat muun muassa flunssa, kuristustauti (kruppi) ja kurkunkannen tulehdus, kun taas alempiin hengitystieinfektioihin kuuluu muun muassa keuhkokuume. [6; 41]

5.3.2 Ihmisen rinovirusten aiheuttamat

Yleisin ihmisten akuuttisairaus on hengitystieinfektio ja sen yleisin esiintymismuoto on flunssa. Rinovirus on yleisin lasten ylempien ja alemmien hengitystieinfektioiden aiheuttaja, ja aikuisilla se selittää noin puolet flunssatapauksista. Yleisimpinä oireina esiintyy kurkkukipua, aivastelua, nenän tukkoisuutta ja vuotamista, mutta myös päänsärkyä, yskää, kuumetta ja huonovointisuutta voi esiintyä. Infektio kestää yleensä 7–14 vuorokautta, mutta voi kestää pidempäänkin. [20; 22]

Rinovirukset aiheuttavat myös välikorvatulehdusta ja nenän sivuontelotulehdusta. Välikorvatulehdus on lasten rinovirusinfektion yleisin bakteerikomplikaatio. Koska rinovirukset kiertävät väestössä ympäri vuoden ja aiheuttavat täten jatkuvasti infektoita, se liittyy suurimpaan osaan korvatulehduksista. Rinoviruksen aiheuttaman infektion yhteydessä esiintyy nenän sivuontelontulehdusta, ja se katoaa itsestään ilman hoitoa. [22]

Bronkioliitti, obstruktiivinen bronkiitti ja astman vaikeutuminen, jotka ovat niin sanottuja ”vinkutauteja”, ovat usein rinoviruksen aiheuttamia. TYKS:n lastenkliniikka määrittelee bronkioliitiksi alle 2-vuotiaan lapsen ensimmäisen uloshengitysvaikeuden, ja mikäli oireet jatkuvat, kutsutaan sitä obstruktiiviseksi bronkiitiksi. Mikäli potilaalla on todettu astma, puhutaan astman vaikeutumisesta. Kaksi kolmasosaa kouluikäisillä lapsilla esiintyvistä astman vaikeutumisista liittyvät rinovirusinfektioihin. Suurin osa sairaalahoitoa vaativista rinovirusinfektioista ovat HRV-C-ryhmän virusten aiheuttamia. [22]

Rinovirusta löydetään usein myös keuhkokuumetta (pneumoniaa) sairastavilta lapsilta. Siihen liittyvä patogeneesi vaikuttaisi olevan viruksen, bakteerin ja isännän immuunivasteen yhteisen toiminnan tulos. Immuunipuutteisille henkilöille rinovirus voi aiheuttaa vakavia ja kroonisia alahengitystieinfektioita. [22; 42; 43]

6 Tyypin 1 diabetes

6.1 Yleistä

Tyypin 1 diabetes (diabetes mellitus) on elinspesifinen autoimmuunitauti, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia erittävät beetasolut ovat tuhoutuneet elimistön immuunijärjestelmän vaikutuksesta joko osittain tai kokonaan. Beetasolujen tuhoutumisen seurauksesta insuliinintuotanto häiriintyy, mikä puolestaan johtaa verensokerin hallitsemattomaan nousuun ja siitä aiheutuviin useisiin oireisiin. Hoitamattomana diabetes voi johtaa vieläkin vakavampiin sairauksiin ja aiheuttaa potilaalle mm. diabeettisen ketoasidoosin, jossa rasvat muuttuvat ketoaineiksi solujen kärsiessä glukoosin puutteesta. Diabeettinen ketoasidoosi voi pahimmillaan johtaa jopa kuolemaan. Vaikka geneettinen alttius on välttämätön tyypin 1 diabeteksen kehittymiselle, on kyseessä kuitenkin monitekijäinen sairaus. Kuten muissakin autoimmuunitaudeissa, diabeteksessä on taudin puhkeamiseen epäilty liittyvän geneettisten tekijöiden ohella myös useita ympäristötekijöitä. [44, s. 18; 45]

6.1.1 Beetasolutuho

Beetasolujen tuhoutumisen uskotaan johtuvan jostain ulkoisesta tekijästä, joka laukaisee haimassa autoimmuuniprosessin. Patogeneettinen mekanismi, jonka seurauksena ihmisen haiman beetasolut tuhoutuvat, on vielä epäselvä. Useita patogeneesiä selittäviä malleja on kuitenkin kehitetty. Eläinmallien avulla on saatu selville, että kyseessä on T-soluvälitteinen autoimmuunitauti. Varsinainen beetasolujen tuhoutuminen johtuu useimmiten siitä, että puolustusjärjestelmän valkosolut hyökkäävät beetasoluja kohtaan. Joissain tapauksissa tuhoutumisen uskotaan johtuvan myös beetasolujen virusinfektiosta, joista enterovirusten aiheuttamat ovat vahvasti epäiltyjä. [44, s. 19; 46; 47; 48; 49]

Tällä hetkellä näyttää siltä, että viruksen aiheuttamat insuliinia tuottavan kudoksen vauriot voivat syntyä eri mekanismeilla. Virus saattaa aiheuttaa beetasolujen tuhoutumisen suo-

raan infektoimalla solut. Virus voi beetasoluissa lisääntyessään myös häiritä niiden toimintaa, jolloin insuliinin erityks käärsii. Beetasoluista voi virusinfektion seurauksena tulla esille sen omia autoantigeeneina toimivia rakenteita, jolloin immuunijärjestelmä saa aikaan autoimmuunivasteen niihin reagoiessaan ja johtaa näin beetasolujen tuhoutumiseen. Näin voi tapahtua myös immunologisessa ristireaktiossa, jossa viruksen aikaansaama immuunivaste reagoi ristiin viruksen ja elimiston proteiinien samankaltaisten osien välillä. Ristireaktio on ehkä eniten tutkittu mekanismi, sillä beetasolujen autoantigeeneillä (glutamiinihappodekarboksylaasi eli GAD65, tyrosiinifosfataasisukuiset IA-2- ja IAR-proteiinit sekä lämpöshokkiproteiini HSP-60) ja enterovirusten proteiineilla (2C, VP1 ja VP0, josta kapsidiproteiinit VP2 ja VP4 muodostuvat) on havaittu olevan samanlaiset aminohappojakot. Tämän patogeneettinen merkitys ei kuitenkaan ole vielä lopullisesti selvinnyt. Mekanismit on esitetty kuviossa 6, joka kuvaa virusten vaikutusta tyypin 1 diabeteksen kehityksessä. [41; 50; 51, s. 11; 52]

6.1.2 Esiintyvyys

Tyypin 1 diabetesta (T1D) esiintyy maailmanlaajuisesti, ja se voi puhjeta missä tahansa elämänvaiheessa, mutta yleensä kuitenkin ennen 15 vuoden ikää. Maailmanlaajuisesti suurinta taudin esiintyvyys on Suomessa, Ruotsissa ja Norjassa, joissa tautia tavataan 2–4 kertaa useammin kuin Virossa ja 2–3 kertaa useammin kuin Islannissa. [44, s. 18; 45]

T1D:n esiintyvyyden vaihtelevuus maantieteellisten ryhmien sisällä on selitettävissä etnisten väestöjen laajalla levittäytyneisyydellä, sillä se mahdollistaa populaation sisällä havaittavat erilaiset geneettisen alttiuden tasot. Esiintyvyyden vaihtelevuus eri maantieteellisillä alueilla viittaa myös siihen, että ympäristötekijöillä on selkeä rooli T1D:n etiologiassa. [53]

6.2 Taudin kehittyminen ja sen eteneminen

Perinnöllisten tekijöiden ei uskota vaikuttavan diabeteksen kehittymiseen, vaan niiden katsotaan olevan ainoastaan taudin kehityksen kannalta sallivia tekijöitä. Tämänhetkisen tiedon mukaan tautiprosessin käynnistävät ja vievät eteenpäin ulkoiset tekijät. Laukaisevana

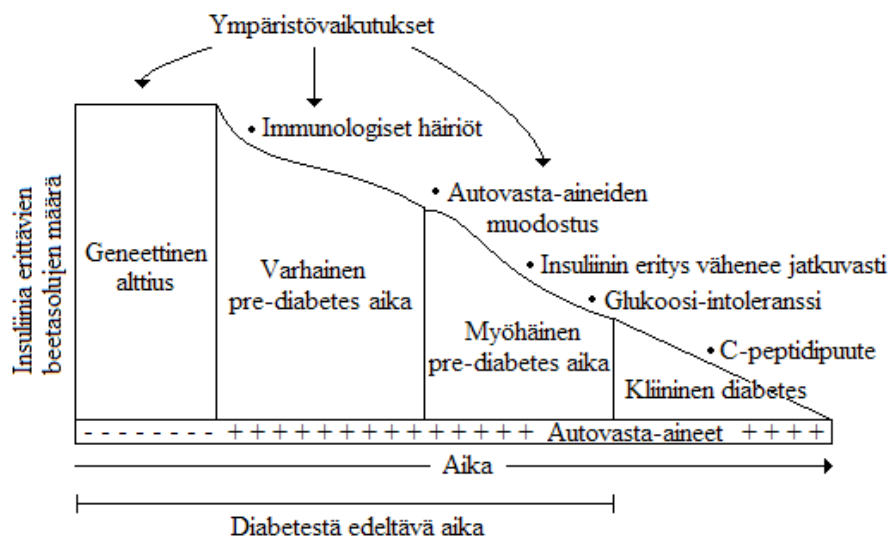
tekijänä voi toimia sopivasti ajoittunut enterovirusinfektio, ja tautiprosessia eteenpäin vievänä tekijänä voi toimia jokin ravintotekijä, kuten runsas lehmän maidon juominen. Lisäksi joukko muita ulkoisia tekijöitä voi muunnella tautiprosessin etenemistä. Prosessi etenee oireettomana, kunnes 80–90 % haiman beetasoluista on tuhoutunut. Kun insuliinia tuottavia soluja on jäljellä enää 10–20 %, tauti on edennyt jo kliiniseksi diabetekseksi. [54; 55]

T-lymfosyyteillä on keskeinen asema taudin synnyssä. Niiden uskotaan kohdistuvan insuliinia tuottavia beetasoluja vastaan ja tuhoavan niitä vähitellen. Eläinmalleissa on havaittu, että sairaan hiiren T-lymfosyyttien siirtäminen terveelle yksilölle saa aikaan diabeteksen kaltaisen taudin alun perin terveessä hiiressä. Nämä autoreaktiiviset T-lymfosyytit, jotka hyökkäävät haiman beetasoluja vastaan, ovat tutkimuksissa osoittautuneet suoliston puolustusjärjestelmään kuuluviksi. [49; 54]

Immuunijärjestelmän aiheuttama beetasolutuho alkaa yleensä vuosia ennen varsinaisen T1D:n diagnosointia. Oireeton prekliininen vaihe, jossa diabeteksen kehitysprosessi on käynnissä, voi kestää yksilöstä riippuen muutamasta kuukaudesta jopa yli kymmeneen vuoteen. Prekliinisessä vaiheessa beetasolujen tuhoutumisen myötä insuliinin eritysvähennee, mikä johtaa lopulta glukoosi-intoleranssiin. Insuliinin tuotannon tasoa voidaan seurata määrittämällä verestä C-peptidiä, joka on insuliinin esiasteesta irtoava jakso. [54; 56]

Prekliinisessä vaiheessa verenkiertoon ilmestyy tautiprosessin käynnistymisestä kertovia autovasta-aineita, joita seuraamalla voidaan tunnistaa sellaiset henkilöt, jotka ovat vaarassa sairastua kliiniseen diabetekseen. Yhden autovasta-aineen ilmaantuminen verenkiertoon näyttää viittaavan vain pieneen sairastumisriskiin. Sen sijaan kahden tai useamman autovasta-aineen ilmaantuminen verenkiertoon pidetään kriittisenä käännekohtana diabeteksen kehityksessä. Näiden vasta-aineiden muodostus on yleensä ensimmäinen prekliinisestä vaiheesta kertova merkki. Näitä elimistön omia proteiineja vastaan kohdistuvia vasta-aineita ovat saarekesoluvasta-aineet (ICA), insuliiniautovasta-aineet (IAA), glutamiinihap-podekarboksylaasivasta-aineet (GADA), tyrosiinifosfataasisukuisen IA-2-proteiinin vasta-aineet (IA-2A) ja sinkin kuljettajaproteiiniautovasta-aineet (sinkin kuljettaja 8, ZnT8A). Autovasta-aineiden ei uskota vaikuttavan beetasolujen tuhoutumiseen, vaan niiden katsotaan heijastavan etenevää tautiprosessia. Autovasta-aineiden ilmaantumisessa verenkiertoon

toon on havaittu olevan vuodenaikaisvaihtelua, minkä vuoksi uskotaankin, että virusinfektiot voisivat aiheuttaa tautiprosessin käynnistymisen. Taudin kehitysvaiheet on esitetty kuviossa 5. [54; 56; 57; 58; 59]



Kuvio 5. Diabeteksen kehittyminen. [Muokattu lähteestä 56.]

6.3 Geneettiset tekijät

Vaikka geneettisten tekijöiden arvellaan olevan taustalla korkeintaan puolessa uusista tyyppin 1 diabetes tapauksista, voi todellisuudessa geneettisten tekijöiden selittävät tautitapaukset olla vieläkin vähäisempiä. Kupila ym. 2001 huomasivat, että uusista diabetestapauksista vain 10 %:lla oli diabetespositiivinen perhetausta. [44, s. 18; 46; 60]

T1D:lle altistavat geenit sijaitsevat ihmisen 6. kromosomin lyhyessä haarassa (6p). Nämä geenit koodaavat ihmisen leukosyyttiantigeeniä (human leukocyte antigen, HLA), jotka toimivat immunologisessa puolustuksessa solujen tunnistusmolekyyleinä. Tämä selittää osin myös sen, miksi niillä on keskeinen rooli myös beetasolujen tuhoutumisessa ja täten myös T1D:n patogeneesissä. Diabetekselle altistavat geenialleelit eli geenin vaihtoehdot eivät kuitenkaan aina johda diabetekseen sairastumiseen. Ihmisen genomista on löydetty myös alleleja, joilla tiedetään olevan diabeteksen puhkeamisen suhteen suojaavia vaikutuksia. Näitä suojaavia ja altistavia alleleja on olemassa eriasteisia, minkä vuoksi

varsinainen sairastumisriski määräytyykin eri alleelien yhdistelmien perusteella. Lisäksi diabetekseen liittyvät eri geeniyhdistelmät ovat erilaisia toisissa kansoissa. [46; 47; 61]

6.4 Ympäristötekijät

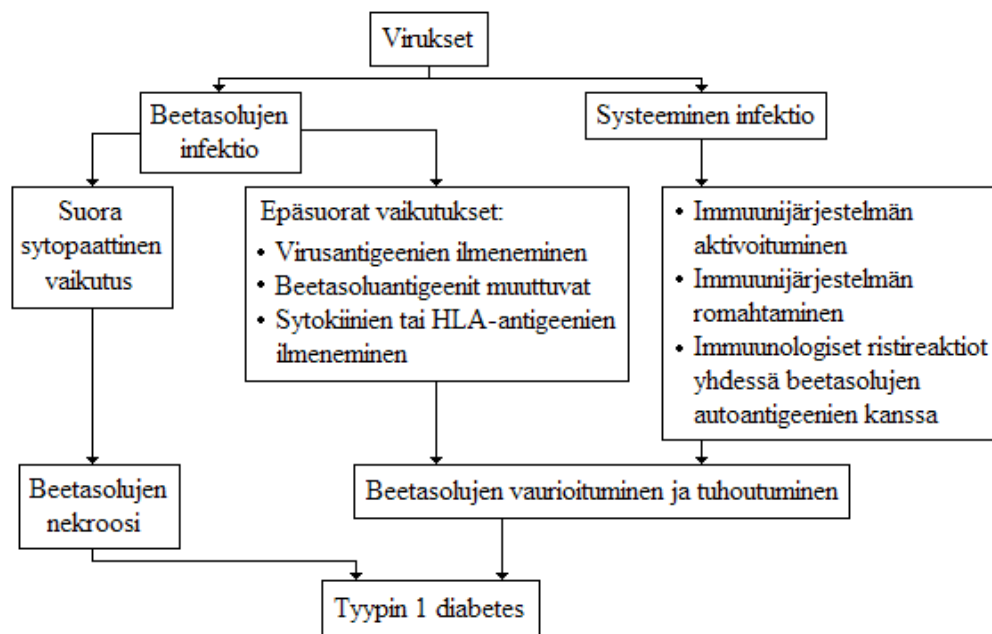
Useiden ympäristötekijöiden uskotaan vaikuttavan T1D:n puhkeamiseen, minkä puolesta puhuvat useat eri tutkimukset ja se, että T1D on viime vuosikymmenien aikana voimakkaasti yleistynyt. Pelkät perinnölliset syyt eivät riitä selittämään taudin nopeaa yleistymistä, sillä alttiuseenit eivät ole voineet rikastua väestössä niin nopeasti kuin diabetes on yleistynyt. Lisäksi identtisillä kaksosilla toteutetut kaksoistutkimukset ovat osoittaneet ympäristötekijöillä olevan merkittävä altistava vaikutus tyypin 1 diabetekselle, ja samaan johtopäätökseen on päästy myös tutkimalla maahanmuuttajien tauti-ilmaantuvuutta. [46; 47; 62; 63; 64; 65]

Kuten perinnöllisissäkin tekijöissä, myös ympäristötekijöissä on diabetekselle altistavia ja siltä suojaavia tekijöitä. Useista tutkimuksista huolimatta tieto taudin puhkeamiseen vaikuttavista ympäristötekijöistä on vielä vähäistä, mutta suurimman epäilyn alla ovat kuitenkin eräät ravintotekijät, kemikaalit ja virusinfektiot. Myös psyykkisellä stressillä on epäilty olevan osuutta taudille altistumisessa. Tautialttiuteen vaikuttavia ravintotekijöitä uskotaan olevan mm. lehmänmaito, viljavalmistet, vähäinen D-vitamiinin saanti, nitriitit ja nitrosoyhdisteet, ja virusinfektioista puolestaan enterovirusten aiheuttamat ovat epäilyimpiä. Mahdollisia diabetekselta suojaavia ympäristötekijöitä ovat rintaruokinta, nikotiniamidi (B3-vitamiini), sinkki sekä C-, D- ja E-vitamiinit. [46; 53; 55; 63; 66]

6.5 Enterovirusten yhteys tyypin 1 diabetekseen

Enterovirusia pidetään tällä hetkellä yhtenä pääympäristötekijänä diabeteksen kehityksessä. Koska T1D:n beetasoluja vaurioittava prosessi etenee hyvin hitaasti, virusten osuutta taudin synnyssä on syytä tutkia prospektiivisesti. Näin voidaan kartoittaa ne infektiot, jotka ajoittuvat juuri tautiprosessin käynnistymisvaiheeseen. Ensimmäiset ihmisillä toteutetut prospektiiviset tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että enterovirukset, etenkin cox-

sackievirukset, voivat käynnistää beetasoluja tuhoavan prosessin jo sikiökaudella tai varhaisessa lapsuudessa. Mekanismit, joilla virukset voivat aiheuttaa tyypin 1 diabetesta, on esitetty kuviossa 6. [67; 68]



Kuvio 6. Mekanismit, joilla virukset voivat vaikuttaa tyypin 1 diabeteksen kehittymiseen. [Muokattu lähteestä 50.]

Useat tutkimukset ovat osoittaneet diabeetikoilla esiintyvän verrokkeja useammin enterovirusinfektioita. Ensimmäisen kerran enterovirusten ja tyypin 1 diabeteksen välillä raportoitiin olevan yhteys 40 vuotta sitten, kun coxsackievirus B:tä (CVB) vastaan olevia vasta-aineita havaittiin esiintyvän diabeetikoilla useammin kuin verrokeilla. Sen jälkeen suoritetuissa tutkimuksissa on havaittu, että potilailla, joilla on äskettäin puhjennut diabetes, olisi huomattavasti suurempi määrä vasta-aineita coxsackievirusa, etenkin serotyyppiä CVB4, vastaan kuin verrokeilla. Uusien diagnosoitujen diabetespotilaiden verinäytteistä on lisäksi onnistuttu eristämään enterovirusa. [50; 67; 69]

Enterovirusinfektioiden on havaittu olevan yleisiä etenkin silloin, kun diabetekseen liittyvät autovasta-aineet ilmaantuvat verenkiertoon. Salmisen ym. 2004 tutkimus paljasti diabetekselle geneettisesti alttiiden lasten olevan muita lapsia herkempiä enterovirusinfektioille. Lisäksi tutkimus puolsi ajatusta enterovirusinfektioiden vaikutuksesta beetasoluja vaurioitavassa prosessissa. Merkittävä todiste enterovirusten ja diabeteksen yhteydestä saatiin,

kun Ylipaasto ym. 2004 löysivät tutkittavista diabeetikkojen haimojen saarekesoluista enterovirusgenomia. Niiden, joilla diabetesta ei ollut, saarekesoluista ei vastaavia löydöksiä tehty. Tutkimuksessa havaittiin myös enterovirusreseptoreiden ilmenevän beetasoluissa, mikä tukee ajatusta, että enterovirus voisi replikoitua haimasoluissa. [67; 69; 70; 71]

Vain muutamia diabetogeenisiä viruskantoja on julkaistu kirjallisuudessa. Yksi näistä on CBV4-kanta, joka onnistuttiin eristämään diabeettiseen ketoasidoosiin kuolleen lapsen haimasta 1970-luvulla. Kun tämä kanta siirrettiin hiireen, se aiheutti tälle ihmisen diabetekseen verrattavissa olevan taudin. Nämä tulokset on saatu hiirikokeiden avulla, mutta haiman saarekesoluilla tehdyt tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että myös echovirukset, jotka eivät kasva hiirissä, voisivat aiheuttaa diabetesta. Myös coxsackie A-virusten osuudesta tyypin 1 diabeteksen kehityksessä on olemassa epäsuoria todisteita. [50; 53; 72; 73]

TUTKIMUSOSA

7 Tutkimuksen tausta

Työn aineisto koostuu INDIS-tutkimusta varten kerätyistä uloste- ja nenäeritenäytteistä. Näytteet saadaan Terveyden ja hyvinvoinnin laitokselle (THL) yhteistyössä Turun yliopiston ja Turun yliopistollisen keskussairaalan (TYKS) lastenklinikan Olli Simellin kanssa. [74]

INDIS-tutkimus on DIPP ja TEDDY -tutkimusprojektien osatutkimus, jonka tarkoituksena on kartoittaa niiden lasten sairastamat infektiot, joilla on suurentunut perinnöllinen alttius sairastua diabetekseen. INDIS-tutkimuksessa pyritään selvittämään erilaisten tulehdustautien mahdollista vaikutusta diabeteksen kehittymiseen. Lisäksi tutkitaan, millaisia muutoksia puolustusjärjestelmässä ja aineenvaihdunnassa tapahtuu infektioiden yhteydessä. Tutkimuksesta saatujen tietojen avulla toivotaan löytyvän uusia keinoja diabeteksen ehkäisemiseen. INDIS-tutkimuksen tutkimusalueena toimii Turun seutu. Virustutkimuksesta vastaava henkilö on dosentti Merja Roivainen Terveyden ja hyvinvoinnin laitokselta. [74]

INDIS-tutkimukseen ovat voineet osallistua sellaiset lapset, jotka ovat jo mukana DIPP/TEDDY-tutkimuksissa. INDIS-tutkimuksessa seurataan kaikkia tutkimuslasten sairastamia infektioita tarkasti kolmen kuukauden iästä 15 ikävuoteen saakka. Itse tutkimus kestää viisi vuotta. Tavoitteena on saada tutkimukseen osallistumaan 200–400 lasta. [74]

Lokakuun 2010 loppuun mennessä tutkimukseen osallistuneita lapsia oli 85, joista kolme lopetti tutkimuksen kesken. Lopettaneista kahdelta ei tullut osallistumisaikanaan yhtään näytettä, joten tutkimuksessa varsinaisesti oli mukana 83 lasta, joista yksi lopetti 28.9.2010. Tutkimuksen ensimmäiset näytteet otettiin 19.10.2009. Tässä insinöörityössä käsitellään tutkimukseen saapuneet 200 ensimmäistä nenäerite- ja ulostenäytettä. Viimeinen tässä työssä huomioitava näyte on otettu 6.9.2010. [74]

Tutkimusohjelmassa vanhempia on neuvottu ottamaan lapselta nenäeriteestä ja ulosteesta näytteet infektion ensimmäisien päivien aikana eli heti, kun lapsella alkaa ilmaantua oireita (esimerkiksi kuumetta, yskää, nuhaa, kurkkukipua, oksentelua tai ripulia). Lasten vanhempien tulee pitää oireista päiväkirjaa. Lapsesta otetaan näytteitä kerran kunkin taudin aikana. Tosin tutkimuksessa saattaa olla mukana myös lapsia, jotka on rekrytoitu tutkimukseen ennen tutkimusohjelman muuttamista, jolloin heillä ohjeistus näytteiden ottoon on ollut erilainen. Heillä näytteenotto on huomattavasti tiheämpää muun muassa kuukausittaisten seurantanäytteiden lähettämisen vuoksi ja infektion seurantanäytteiden vuoksi. [74]

8 Työn tavoitteet

Työssä määritetään INDIS-tutkimuksen potilasnäytteissä (nenäerite ja uloste) mahdollisesti esiintyviä ihmisen enterovirusia ja tyypitetään ne geneettisesti. Työn tavoitteena on selvittää, kuinka yleisiä ihmisen enterovirusinfektioita ovat tyypin 1 diabetekselle geneettisesti alttiilla lapsilla, ja miten infektoita esiintyy eri ikäluokissa. Tavoitteena on myös löytää tutkimushenkilöiden keskuudesta mahdollisia infektiokerkkiä lapsia, joilla infektoita esiintyy huomattavasti muita enemmän.

8.1 Tutkimuskohde

Tutkimuskohdeena ovat 200 ensimmäistä näytettä, jotka ovat saapuneet INDIS-tutkimukseen. Työssä käsiteltäviä nenäeritenäytteitä on 198 ja ulostenäytteitä 196, sillä tutkimukseen saapuneista näytepaketeista kuusi oli sellaisia, että ne sisälsivät vain nenäerite- tai ulostenäytteen. Tässä työssä tutkittavia näytteitä on kerätty yhteensä 53 lapselta, joista yksi lopetti tutkimuksen kesken. Tutkimushenkilöt ovat syntyneet vuosina 2000, 2002, 2004–2010, mutta suurin osa tutkimuksen lapsista on syntynyt vuonna 2009.

8.2 Työvaiheet

Saapuneet potilasnäytteet esikäsiteltiin, ennen kuin niiden mahdollisesti sisältämät viraaliset RNA:t voitiin eristää. Näytteiden esikäsitelyllä tässä työssä tarkoitetaan nenäeritenäytteiden jakamista ja ulosteravisteiden valmistusta. Esikäsitelyn jälkeen näyte on sellaisessa muodossa, että kaikki sen sisältävät nukleinihapot on eristettävissä kaupallisen kitin (E.Z.N.A.[®] Total RNA -kitti, Omega Bio-Tek) avulla.

Kun näytteistä oli eristetty niiden sisältämät RNA:t, suoritettiin kaikilla RNA-eristysnäytteillä enterovirusten reaaliaikainen RT-PCR (EV rRT-PCR). Tämän avulla saatiin selville, mitkä kaikki potilasnäytteet sisälsivät enteroviruksen genomia. Koska nenäeritenäytteissä voi esiintyä enterovirusia ja rinovirusia, suoritettiin niille EV rRT-PCR:n lisäksi myös rinovirusten reaaliaikainen RT-PCR (HRV rRT-PCR). Näiden PCR:ien tiedetään nenäeritteiden kohdalla tunnistavan toisiaan ajoittain myös ristiin (esim. HRV rRT-PCR voi tunnistaa näytteestä enteroviruksen ja antaa täten positiivisen tuloksen). Selitys tälle löytyy kohdasta 9.3.1.

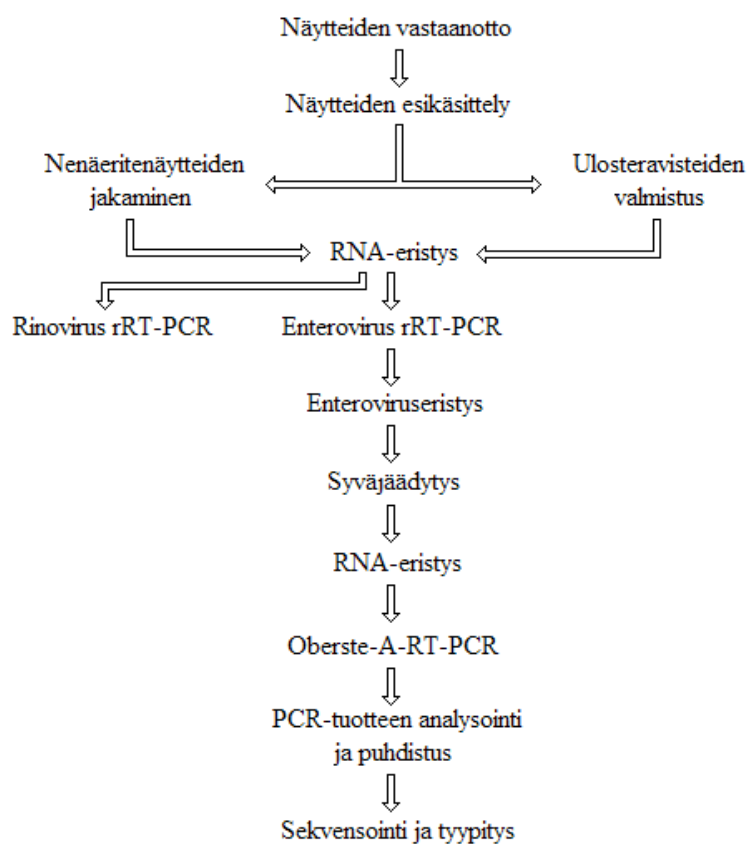
Kaikki näytteet, jotka osoittautuivat positiivisiksi EV rRT-PCR:ssä, istutettiin solulinjoihin, joissa enterovirusten tiedetään yleisesti kasvavan. Istutuksen tarkoituksena oli saada eristettyä infektiivinen enterovirusisolaatti ja samalla kasvattaa sen määrää. Inkuboinnin jälkeen mahdollisesti infektoituneet solumatot raaputettiin pois soluputken pinnalta ja syväjäädettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

Syväjäädätyksellä ja sen jälkeisellä sulatuksella pyrittiin hajottamaan solut niiden mahdollisesti sisältämän viraalisen RNA:n vapauttamiseksi. Solususpensiolle suoritettiin sulatuksen jälkeen uudelleen RNA-eristys. Näille RNA-eristysnäytteille suoritettiin niin sanottu Oberste-A-RT-PCR, joka on tyyppitykseen kehitetty PCR-menetelmä enterovirusille.

Oberste-A-RT-PCR:stä saadut DNA-tuotteet analysoidaan agarosigeelielektroforeesia käyttäen. Siinä positiivisiksi tunnistautuneet näytteet ajettiin myös Elchrom-geelille, josta oikeankokoiset DNA-fragmentit leikattiin talteen ja uutettiin magnesiumkloridiin (MgCl_2).

DNA-fragmentit lähetettiin ulkoiselle sekvensointipalvelulle (Molecular Medicine Sequencing Laboratory, SeqLab) sekvensoitaviksi.

Sekvensoinnista saadut elektroferogrammit käsiteltiin Vector NTI:n ContigExpress (Invitrogen) -ohjelmalla. Saatua nukleotidisekvenssiä verrattiin geenipankin (Nucleotide BLAST, NCBI) sekvensseihin, ja tiettyjen rajaehtojen avulla suoritettiin virustunnistus. Kuviossa 7 on kuvattu työn eri vaiheet. Työvaiheiden yksityiskohtaiset kuvaukset löytyvät luvusta 9.



Kuvio 7. Työvaiheet näytteen saapumisesta lähtien.

9 Menetelmät

9.1 Näytteiden esikäsittely

9.1.1 Ulosteen esikäsittely

Ulostenäytteiden esikäsittelyllä näyte saadaan nestemäiseen muotoon eli ns. ravisteeksi. Mahdollisten virusten lisäksi uloste sisältää tavallisesti bakteereja ja joskus myös homeita. Kalsium- ja magnesiumsuoloja sisältävään fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS-liuos, THL:n laboratoriotukiyksikkö eli LATU) lisättävä penisilliinin, streptomysiinin ja gentamysiinin yhdistelmä (PeStG, LATU) poistaa ulosteesta bakteereja ja sieniä. Osa ulosteen bakteereista ja homeista saadaan inaktivoitua myös kloroformilla. Kloroformi poistaa mahdollisesti myös sytotoksisia eli solulle myrkyllisiä lipidejä ja hajottaa virusaggregaatteja. Ravisteena näyte on sellaisessa muodossa, että sitä voidaan käyttää viruseristykseen ja solujen infektointiin sellaisenaan. [75]

Kloroforminkestävään muoviputkeen kaadettiin 5–10 lasihelmeä. Putkeen lisättiin kylmää (2–8 °C) antibiootteja sisältävää PBS-liuosta (PBS-PeStG) käsiteltävästä ulostemäärästä riippuen 5 ml tai 2 ml. Ulosteraviste pyrittiin tekemään noin grammasta ulostetta, mutta mikäli näytettä oli vähän, otettiin ulostetta arviolta 0,4 g, jolloin PBS-PeStG:tä lisättiin muoviputkeen vain 2 ml verran. Seuraavaksi putkeen lisättiin näytemäärästä riippuen 0,5 ml tai 0,2 ml kloroformia (Merck). Jäisestä ulostenäytteestä siirrettiin tikulla noin 1 g ulostetta (tai 0,4 g) muoviputkeen. Ennen varsinaista sekoitusta putkea ravisteltiin voimakkaasti käsin, jolloin uloste saatiin karkeasti sekoitettua ympäröivään nesteseokseen. Näin saatiin silmämääräisesti tarkistettua ulosteen oikea määrä vielä liuoksen värin perusteella. Varsinainen sekoittuminen saatiin aikaan ravistamalla (Flow Laboratories TiterTek 541307 Shaker) putkea tämän jälkeen noin 20 minuutin ajan 1 200 kierroksen nopeudella. Jotta PBS-PeStG:iin liukenematon ulosteosa saatiin erilleen, putkia sentrifugoitiin (Jouan CR3i Sentrifugi, Swing out roottori T40) ravistelun jälkeen 20 minuutin ajan. Sentrifugointi suoritettiin jäähdytetyssä (4–10 °C) sentrifugissa 2 500 rpm (revolutions per minute eli kierrosta minuutissa) nopeudella. Tämä jälkeen ylin faasi pipetoitiin talteen. Tästä talteenotetusta ulosteravisteesta otettiin 100 µl näyte steriiliin eppendorffputkeen RNA-eristystä varten. Näytteet säilytettiin –70 °C:ssa pakastimessa.

9.1.2 Nenäeritteen esikäsittely

Nenäeritenäyte on otettu potilaalta näytteenottotikulla sivellen sillä nenän limakalvon pintaa. Näytteenoton jälkeen tikku on suljettu muoviseen näytteenottoputkeen, jossa on näytteen säilytysliuosta. Tutkimuksessa käytettiin ensin putkia, joissa kasvuliuksen tilavuus oli 3 ml, mutta myöhemmin siirryttiin käyttämään 1 ml kasvuliusta sisältäviä putkia. Putkien sisältämän kasvuliuksen tilavuutta muutettiin, sillä jo 1 ml liuosta riittää säilömään nenäeritenäytteen kuljetuksen ajaksi. Näin varmistetaan myös se, etteivät nenäeritenäytteet ole liian laimeita.

Nenäeritenäyteputkea sekoitettiin koeputkisekoittimella (IKA Labortechnik VF 2) ensin täydellä teholla noin minuutin ajan, jolloin kaikki näytteen solut ja niiden mahdollisesti sisältämät virukset saatiin siirrettyä näytteenottotikusta ympäröivään kasvuliukseen. Tämän jälkeen näytteestä otettiin 100 µl steriiliin eppendorffputkeen RNA-eristystä varten. Näytteet säilytettiin -70 °C:ssa pakastimessa.

9.2 RNA-eristys

RNA:n eristyksen ensimmäisessä vaiheessa solut hajotetaan yleensä joko mekaanisesti, kemiallisesti tai entsyymaattisesti. Solut voidaan myös hajottaa jäädyttämällä ja sulattamalla. Tämän yhteydessä tai välittömästi hajotuksen jälkeen on syytä inaktivoida RNA:ta hajottavat ribonukleaasit. Inaktivointi toteutetaan usein käyttämällä eristyksessä RNAasi-inhibiittoreita. Tämän jälkeen RNA on menetelmästä riippuen suodatettavissa tai saostettavissa. Eristetty RNA tulee lisäksi puhdistaa, sillä näyte sisältää tavallisesti runsaan määrän epäpuhtauksia, kuten proteiineja. Yleensä puhdistus suoritetaan pesemällä RNA:ta epäpuhtauksia liuottavilla tai saostavilla puskuriliuksilla. [76]

Tutkittavana materiaalina käytettiin esikäsiteltyä potilasnäytettä (nenäerite- tai ulostenäyte) tai viruksilla infektoitua soluviljelmää. Käytettäessä solususpensiota näytteenä on sille tehty syväjäädyttämällä ja sulattamalla solujen esihajotus. Käsiteltävä näytetilavuus on 100 µl. Työssä RNA-eristys suoritettiin käyttämällä E.Z.N.A.[®] Total RNA -kittiä (Omega Bio-

Tek). Menetelmä perustuu RNA:n sitoutumiseen silikageelimembraanille, josta se pesujen jälkeen eluoidaan talteen. Työssä negatiivisena kontrollina käytettiin kitin mukana tullutta RNAasi-vapaaksi käsiteltyä vettä. Negatiivinen kontrolli on merkinä työn onnistumisesta eli tässä tapauksessa kontaminoitumattomuudesta. [77]

RNA:n eristyksen ensimmäisessä vaiheessa solut hajotettiin TRK-hajotuspuskurin avulla. TRK-puskurin lisäksi näytteen sekaan lisättiin 70-prosenttista etanolia, jotta RNA:n sitoutuminen silikageelimembraanille olisi mahdollista. Etanolin lisäyksen jälkeen liuosta sekoitettiin (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) hetken. Näyte ja siihen lisätyt liuokset pipetoitiin pylvääseen, jonka keskellä on RNA:n eristyksen kannalta oleellinen silikageelimembraani. Tämän jälkeen epäpuhtaudet poistettiin kahden eri puskuriliuoksen avulla. Ensin suoritettiin pesu kahdesti RNA-pesupuskuri I:llä, ja tämän jälkeen vielä kahdesti RNA-pesupuskuri II:lla. Kaikki työssä käytettävät puskuriliuokset lisättiin näytteen sisältävään pylvääseen membraanin yläpuolelle. Sentrifugoimalla (Eppendorf 5424 -mikrosentrifugi) saatiin liuokset siirtymään membraanin läpi pylvään alla sijaitsevaan keräysputkeen. Pesujen jälkeen näytteestä eristetty RNA eluoidaan talteen 50 µl:aan RNAasi-vapaan veden avulla. Eluoidut RNA:t säilytettiin -70 °C:ssa pakastimessa. [77]

9.3 Reaaliaikaiset RT-PCR:t

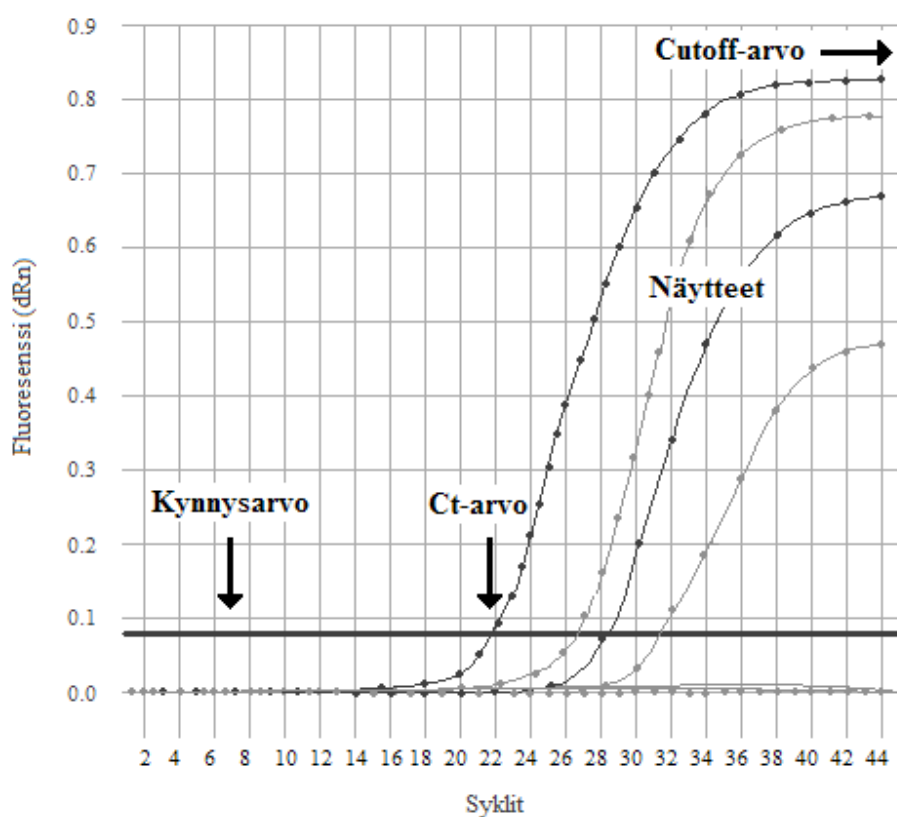
Työssä käytettävät reaaliaikaiset PCR:t ovat Centers for Disease Control and Preventionin (CDC) validoimia menetelmiä, joita on pyritty noudattamaan sellaisenaan.

9.3.1 Enterovirusten reaaliaikainen RT-PCR

Enterovirusgenomi detektoidaan näytteestä reaaliaikaisen RT-PCR:n avulla. Tutkittavana materiaalina käytetään esikäsitellystä potilasnäytteestä eristettyä RNA:ta.

Enteroviruksen genomisen RNA kopioidaan komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) ns. yhden putken menetelmällä, jossa molemmat suoritettavat reaktiot suoritetaan samaan aikaan yhdessä koeputkessa, käänteiskopioijaentsyymien ja reverse-alukkeen avulla. Muodos-

tuneesta cDNA:sta monistetaan enteroviruspesifisten forward- ja reverse-alukkeiden välinen jakso moninkertaiseksi reaaliaikaisella PCR:llä. Reaaliaikainen PCR on PCR, jossa DNA:n monistumista voidaan seurata reaaliaikaisesti. Kuviossa 8 on esitetty reaaliaikaisen PCR:n periaate. Templaattikopioiden määrä kasvaa PCR:ssä sykleittäin, ja niiden määrä on suoraan verrannollinen havaittavaan fluoresenssiin. PCR:ää suoritettaessa jokin fluoresenssitaso tulee asettaa kynnsarvoksi, jolloin sen ylittävät näytteet tulkitaan positiivisiksi. Ct-arvo (cycle threshold) on se sykliluku, jossa näyte ylittää kynnsarvon. Cutoff-arvolla tarkoitetaan syklilukua, jota ennen näytteen fluoresenssin on täytynyt ylittää kynnsarvo, jotta se tulkittaisiin positiiviseksi.

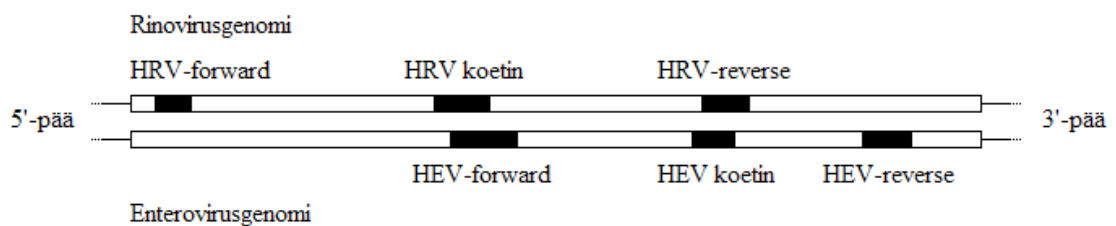


Kuvio 8. Reaaliaikaisen PCR:n periaate. Näytteen fluoresenssi kasvaa genomien kopioituessa.

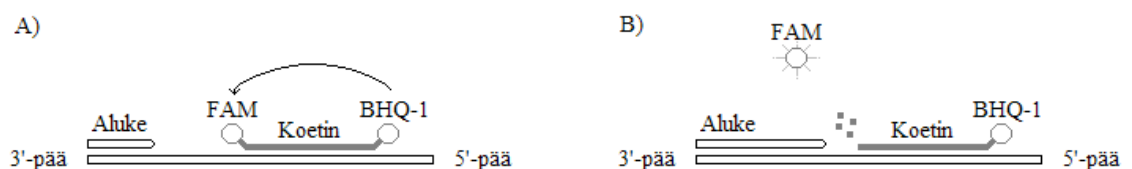
Menetelmän käyttö enterovirusten detektiossa perustuu osin enterovirusgenomin 5'-päässä sijaitsevaan noin 400 emäsparin (base pair, bp) pituiseen vahvasti konservoituneeseen alueeseen. Tämä jakso on pysynyt evoluutiossa lähes muuttumattomana, jolloin se on kaikilla enteroviruksilla lähes samanlainen. Työssä käytettävät alukkeet on suunniteltu niin, että ne tarttuvat spesifisesti konservoituneeseen alueeseen monistaen siitä 150 bp

mittaista jaksoa. Kuviossa 9 on karkeasti kuvattu HRV:n reaaliaikaisen RT-PCR:n ja EV:n reaaliaikaisen RT-PCR:n alukkeiden ja koettimien sijoittuminen genomien alueilla. Menetelmä saattaa tunnistaa nenänäytteiden kohdalla myös rinovirusia, sillä sen forward-alue tarttuu genomissa alueeseen, joka eroaa HRV-A:n ja HRV-B:n vastaavasta vain yhden nukleotidin verran ja HRV-C:n vastaavasta se puolestaan ei eroa lainkaan.

Varsinainen detektio tapahtuu kuitenkin kaksoisleimatus fluorogeenisen koettimen avulla, jonka toiminta on esitetty kuviossa 10. Toisena leimana toimiva FAM on fluoresenssisignaalin vapauttava ryhmä eli ns. reportteri, kun toinen leima BHQ-1 puolestaan toimii sen vaimentajana. Mikäli DNA-juostetta ei PCR:ssä muodostu lainkaan, BHQ-1 vaimentaa FAMia jatkuvasti, jolloin fluoresenssia ei tapahdu. Vastaavasti uutta DNA-juostetta rakennettaessa reportteri vapautuu, jolloin sen etäisyys vaimentajaansa (BHQ-1) kasvaa. Tämän seurauksena BHQ-1:n vaimentava vaikutus lakkaa, jolloin reportterin fluoresoivaa valoa voidaan mitata. Fluoresenssin määrä näytteessä lisääntyy syklien edetessä, ja sen intensiteetti on mitattavissa reaaliaikaisella PCR-laitteella. [78]



Kuvio 9. Rinovirusuksen rRT-PCR:n ja enterovirusuksen rRT-PCR:n alukkeiden ja koettimien sijoittuminen genomien alueille. Kuvan 5'-pää kuvaa genomia 342. nukleotidin kohdalla, ja 3'-pää loppuu 642. nukleotidin kohdalle.



Kuvio 10. Kaksoisleimatus fluorogeenisen koettimen toiminta. A) Kun PCR ei tuota uutta juostetta BHQ-1 vaimentaa jatkuvasti FAMia, jolloin fluoresenssiä ei tapahdu. B) Uuden juosteen muodostuessa FAM irtoaa koettimesta, jolloin sen etäisyys vaimentajaansa (BHQ-1) kasvaa ja FAM voi emitoida valoa. [Muokattu lähteestä 79, s. 11.]

Työn suorituksessa käytettiin SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System -kittiä (Invitrogen).

Alukkeet (DNA Technology A/S):

AN350 (forward) 5'- GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C -3'

AN351 (reverse) 5'- GCG ATT GTC ACC ATW AGC AGY CA -3'

jossa Y = T tai C

W = A tai T

Y ja W ovat synteettisiä nukleotidejä, jotka voivat suorittaa kahden eri nukleotidin virkaa juosteessa.

Alukkeista valmistettiin 10 µM käyttölaimennokset Sigma-veteen.

Koetin (DNA Technology A/S):

AN234 5'- FAM - CC GAC TAC TTT GGG WGT CCG TGT - BHQ-1 -3'

jossa W = A tai T

Koettimesta valmistettiin 5 µM käyttölaimennos Sigma-veteen. Koetin tuli fluorogeenisyytensä vuoksi säilyttää valolta suojattuna.

Positiiviseksi kontrolliksi valittiin sellaisen näytteen RNA, jonka tiedettiin olevan vahvasti enteroviruspositiivinen. Tässä työssä positiivisena kontrollina oli CVB5:stä eristetty RNA. Positiivisesta kontrolli-RNA:sta tehtiin laimennokset 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ja 10^{-5} , joiden avulla saatiin muodostettua standardisuora. Tällä on merkitystä tarkasteltaessa yksittäisen työn onnistumista ja koko menetelmän luotettavuutta. Lisäksi sen avulla voidaan laskea näytteiden RNA-pitoisuus.

Aluksi valmistettiin reaktioseos kaikille työssä tehtäville reaktioille. Huolellisesti sekoitettua reaktioseosta pipetoitiin 45 µl kuhunkin reaktiokuoppaan reaaliaikaisen PCR:n liuskalle eli ns. stripille. Kutakin RNA-eristysnäytettä lisättiin reaktiokuoppiin 5 µl sekoituksen jälkeen. Näytteiden lisäämisen yhteydessä lisättiin omiin reaktiokuoppiinsa myös 5 µl kutakin positiivisen kontrollin laimennosta sekä Sigma-vettä negatiiviseksi PCR-kontrolliksi. RNA:n lisäämisen jälkeen PCR-liuskat suljettiin, niiden sisältö sekoitettiin (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) ja sentrifugoitiin (Apollo Instrumentation, C-1301) kuoppien pohjaan. Kaikki PCR:ää edeltävät työvaiheet suoritettiin säilyttäen reagenssit kylmäblokeilla.

Reaktioseos yhdelle reaktiolle:

2X Reaction Mix	25,0 µl
AN350 forward (10 µM)	2,0 µl
AN351 reverse (10 µM)	2,0 µl
AN234 koetin (5 µM)	1,0 µl
Sigma-vesi	12,9 µl
SSIII RT/Platinum Taq Mix	1,0 µl
MgSO ₄ (50 mM)	1,0 µl
ROX Reference Dye	0,1 µl
reaktioseos yhteensä	45 µl

Näytteet ajettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä (Stratagene Mx3005P) käyttäen seuraavaanlaista lämpöohjelmaa:

Vaihe	Lämpötila	Aika
1	50 °C	30 min
2	95 °C	5 min
3	95 °C	15 s
4	55 °C	45 s
5	72 °C	15 s

PCR:llä ajettiin kullakin ajokerralla 45 sykliä (vaiheet 3–5).

Tulostentarkastelussa asetettiin kunkin ajon kynnyksarvoksi luku, joka on 10 % positiivisen kontrollin 10^{-1} laimennoksen antamasta fluoresenssitasosta. Cutoff-arvoksi valittiin Ct-arvo 40, jolloin kaikki ne näytteet, joiden fluoresenssitaso ylitti kynnyksarvon vasta 40. syklin jälkeen, tulkittiin negatiivisiksi.

9.3.2 Rinovirusten reaaliaikainen RT-PCR

Rinovirusgenomi detektoidaan näytteestä reaaliaikaisen RT-PCR:n avulla. Tutkittavana materiaalina työssä käytetään potilaan nenäeritenäytteestä eristettyä RNA:ta. Menetelmä pohjautuu Xiaoyan Lun ym. vuonna 2008 julkaistuun artikkeliin [80].

Rinoviruksen genominen RNA kopioidaan cDNA:ksi samalla tavoin kuin enterovirustenkin RNA (kohta 9.3.1). Muodostuneesta cDNA:sta monistetaan rinoviruspesifisten forward- ja reverse-alkkeiden välinen jakso reaaliaikaisella PCR:llä.

Menetelmän käyttö rinovirusten detektiossa perustuu osin rinovirusgenomin 5'-päässä sijaitsevaan noin 400 bp pituiseen vahvasti konservoituneeseen alueeseen. Tämä jakso on pysynyt evoluutiossa lähes muuttumattomana, jolloin se on kaikilla enterovirus-suvun viruksilla lähes samanlainen. Työssä käytettävät alukkeet on suunniteltu niin, että ne tarttuvat spesifisesti konservoituneeseen alueeseen monistaen siitä 200 bp mittaista jaksoa (kuvio 9). Vaikka rinovirusten konservoitunut alue on hyvin samankaltainen kuin muiden enterovirusten, rinovirusten konservoituneella alueella on kohtia, jotka eroavat enterovirusten vastaavasta. Rinovirusten detektiossa käytettävä forward-alue on suunniteltu niin, että se tarttuu konservoituneella alueella kohtaan, joka eroaa rinovirusten kohdalla muista enteroviruksista. [80; 81]

Monistettava alue sijaitsee rinovirusgenomin 5'-päässä ei-koodaavalla alueella. Rinovirusten detektio tapahtuu enteroviruksen detektion tavoin kaksoisleimatun (leimoina FAM ja BHQ-1) fluorogeenisen koettimen avulla (kohta 9.3.1).

Työn suorituksessa käytettiin QIAGEN® QuantiTect™ Probe RT-PCR -kittiä (Qiagen).

Alukkeet:

Forward-aluke (Exicon A/S): 5'- CPX GCC ZGC GTG GC -3'

Reverse-aluke (DNA Technology A/S): 5'- GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA -3'

Koska forward-aluke on reverse-aluketta lyhyempi, sen alukkeiden sulamislämpötila (T_m) on myös matalampi. Matala T_m saadaan korjattua lisäämällä forward-alukkeeseen lukittuja nukleinihappoanalogeja (locked nucleic acid).

Alukkeista valmistettiin 25 μ M käyttölaimennokset Qiagen-kitin RNAasi-vapaaseen veteen.

Koetin (DNA Technology A/S):

5'- TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C -3'

Koettimen leimat (DNA Technology A/S):

5'-pään leima: 6-carboxyfluorescein (FAM)

3'-pään leima: Black Hole Quencher™ (BHQ-1)

Koettimesta valmistettiin 25 μ M käyttölaimennos Qiagen-kitin RNAasi-vapaaseen veteen. Koetin tuli fluorogeenisyytensä vuoksi säilyttää valolta suojattuna.

Positiiviseksi kontrolliksi valittiin sellaisen näytteen RNA, jonka tiedettiin olevan vahvasti rinoviruspositiivinen. Tässä työssä positiivisena kontrollina oli HRV-2:sta eristetty RNA. Positiivisesta kontrolli-RNA:sta tehtiin laimennokset 10^{-3} ja 10^{-5} .

Aluksi valmistettiin reaktioseos kaikille työssä tehtäville reaktioille. Huolellisesti sekoitettua reaktioseosta pipetoitiin 20 μ l kuhunkin reaktiokuoppaan reaaliaikaisen PCR:n liuskalle. Kutakin näytettä lisättiin reaktiokuoppiin 5 μ l sekoituksen jälkeen. Näytteiden lisäämisen yhteydessä lisättiin omiin reaktiokuoppiinsa myös 5 μ l kumpaakin positiivisen kontrollin laimennosta sekä Qiagen-kitin RNAasi-vapaata vettä negatiiviseksi PCR-kontrolliksi. RNA:n

lisäämisen jälkeen PCR-liuskat suljettiin, niiden sisältö sekoitettiin (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) ja sentrifugoitiin (Apollo Instrumentation, C-1301) kuoppien pohjaan. Kaikki PCR:ää edeltävät työvaiheet suoritettiin säilyttäen reagenssit kylmäblokeilla.

Reaktioseos yhdelle reaktiolle:

2 x QuantiTect Master Mix	12,5 µl
Forward-aluke (25 µM)	1 µl
Reverse-aluke (25 µM)	1 µl
Koetin (25 µM)	0,1 µl
QuantiTect RT Mix	0,25 µl
RNAasi-vapaa vesi (Qiagen)	5,15 µl
reaktioseos yhteensä	20 µl

Näytteet ajettiin reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä (Stratagene Mx3005P) käyttäen seuraavaanlaista lämpöohjelmaa:

Vaihe	Lämpötila	Aika
1	48 °C	30 min
2	95 °C	15 min
3	95 °C	15 s
4	60 °C	1 min

PCR:llä ajettiin kullakin ajokerralla 45 sykliä (vaiheet 3–4).

Tulostentarkastelussa asetettiin kunkin ajon kynnysarvoksi 0,0060. Tässä työssä ei tarvitse erikseen asettaa cutoff-arvoa, sillä se on otettu huomioon jo syklimäärää valittaessa (työn cutoff-arvo on Ct-arvo 45). Tällöin kaikki ne näytteet, joiden fluoresenssitaso ylittää asetetun kynnysarvon vasta 45. syklin jälkeen, tulkitaan negatiivisiksi.

9.4 Enteroviruseristys

Jotta potilasnäytteiden sisältämät infektiiviset enterovirukset saataisiin eristettyä, pitää virusta kasvattaa soluviljelmässä. Samalla viruksen määrä lisääntyy. Työssä käytettävät soluviljelmät kasvavat soluviljelymuoviputken pinnalla. Kun potilasnäytteiden mahdollisesti sisältämät virukset inkuboinnin jälkeen ovat lisääntyneet soluissa, voidaan viljelmästä ottaa näyte, jolle tehdään uusi RNA-eristys. Tämän näytteen sisältämän mahdollisen infektiivisen enteroviruksen RNA-pitoisuus on alkuperäistä potilasnäytettä suurempi, jolloin viruksen serotyypin määrittäminen on mahdollista. Serotyyppi voidaan määrittää eristyksen jälkeen joko neutralisaatiotestin (käyttäen virusspesifisiä vasta-aineita) tai sekvensoinnin (sekvensoimalla osa viruksen VP1-kapsidiproteiinista) avulla. Tässä työssä serotyypin määrittäminen suoritetaan sekvensoimalla.

Soluihin istutettava näyte voi olla ulosteraviste, nenäerite-, nielu-, rakkula- tai likvorinäyte tai vaikka jätevesikonsentraatti. Tässä työssä soluihin istutettavat näytteet ovat ulosteravisteita ja nenäeritenäytteitä. Näytteet istutettiin soluviljelmiin sen jälkeen, kun niille oli tehty enterovirus rRT-PCR, sillä tarkoituksena oli istuttaa vain niitä näytteitä, jotka olivat enterovirus rRT-PCR:ssä positiivisia.

Enteroviruseristyksessä käytettäväksi istutussoluiksi on valittu sellaisia solulinjoja, joissa enterovirusten tiedetään lisääntyvän hyvin. Alla on lueteltu kaikki työssä käytettävät solulinjat [82]:

<u>Solu</u>	<u>Enterovirukset</u> , joiden tiedetään solussa lisääntyvän
RD(A)	poliovirukset, echovirukset, osa coxsackie A-viruksista
HeLa-SOH	poliovirukset, osa coxsackie A-viruksista, coxsackie B-virukset
CaCo-2	poliovirukset, echovirukset, coxsackie B-virukset

Jos näytteen epäillänsä sisältävän enterovirusta, mutta mahdollinen virus ei aiheuta solutuhoa eli CPE:tä yllä mainituissa solulinjoissa, virusta yritetään kasvattaa Vero ja GMK-solulinjoissa.

Enteroviruspositiiviset ulostenäytteet istutettiin ensisijaisesti RD(A)-soluihin, mutta mikäli soluviljelmässä ei havaittu viruksen aiheuttamaa solutuhoa, solut istutettiin kaikkiin työssä käytettäviin solulinjoihin. Työssä käytetyt solulinjat ja niiden alkuperät löytyvät taulukosta 3. Soluviljelmissä tapahtuva solutuho havaittiin putken seinämällä kasvavaa solumattoa mikroskopioimalla. Enteroviruspositiiviset nenäeritenäytteet istutettiin puolestaan vain RD(A)-solulinjan soluihin. HRV-A-lajiin kuuluvien rinovirusten serotyypin tiedetään myös kasvavat RD(A)-solulinjassa hyvin.

Taulukko 3. Työssä käytetyt solulinjat ja niiden alkuperä.

Solulinja	Alkuperä
CaCo-2	Ihmisen paksusuolen adenokarsinoma eli rauhassyöpä
GMK	Vihermarakatin (green monkey) munuainen
HeLa-SOH	Ihmisen (Henrietta Lacks) kohdunkaulan karsinoma
RD(A)	Ihmisen rabdomyosarkooma eli poikkijuovaislihassyöpä
Vero	Vihermarakatin (green monkey) munuaisen sidekudos

Ulostenäytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista virusviljelyä näytettä kohden. Nenäeritenäytteiden kohdalla ei tehty rinnakkaisia virusviljelyjä, vaan kukin näyte istutettiin vain yhteen soluviljelyputkeen. Syynä tähän on se, että enterovirusia uskotaan löytyvän suuremmalla todennäköisyydellä ulostenäytteistä. Lisäksi tehtävän INDIS-tutkimuksen kannalta oli oleellisempaa löytää niitä enterovirusia, jotka erittyvät ulosteeseen.

Kasvatusnesteet soluille:

RD(A)-soluille:

5 % MEM

100 ml	Eagle's MEM (LATU)
2 ml	Hepes (1 M, pH 7,4, LATU)
2 ml	MgCl ₂ (1 M, LATU)
5 ml	vasikkasikiön seerumi (fetal bovine serum eli FBS, Integro)
0,1 ml	penisilliini-steptomysiini-gentamysiini -antibioottiliuos (PeStG, LATU)
*0,1 ml	mykostaatiini (LATU)

CaCo-2-, GMK-, HeLa-SOH- ja Vero-soluille:

2 % MEM

100 ml	Eagle's MEM
2 ml	Hepes (1 M, pH 7,4)
2 ml	MgCl ₂ (1 M)
2 ml	vasikkasikiön seerumi (fetal bovine serum eli FBS)
0,1 ml	PeStG
*0,1 ml	mykostiini

* Mykostiinia tarvitaan käyttöravintonesteessä vain istutettaessa ulosteravisteita soluihin, sillä sen vaikuttava aine nystatiini estää suolistossa mahdollisesti esiintyvien sienten lisääntymistä [83]. Työvaiheiden helpottamisen vuoksi mykostiinia lisättiin kuitenkin kaikkiin käyttöravintonesteisiin, sillä sen ei ole todettu olevan haitaksi nenäeritenäytteiden istutuksessa.

Tilattujen kolmen vuorokauden ikäisten soluputkien (THL:n Soluviljely-yksikkö) solumaton kunto tarkastettiin ennen työ aloittamista. Mikäli huonokuntoisia soluviljelmiä olisi löytynyt, niitä ei olisi käytetty. Valmistetut käyttöravintonesteet lämmitettiin 37 °C:ssa vesihauteessa (Julabo TW12 Water Bath, Julabo Labortechnik GmbH) kädenlämpöiseksi. Soluputkien sisältämä solukasvatusneste kaadettiin pois, ja tilalle pipetoitiin valmistettua käyttöravintonestettä 1 ml putkea kohti. Jokaiseen soluputkeen pipetoitiin lisäksi 200 µl näytettä. Nenäeritenäytteiden kohdalla voitiin istuttaa myös pienempi näytemäärä, mikäli näytettä oli käytössä vain vähän. Tällöinkin istutettavan näytteen tilavuus oli kuitenkin vähintään 150 µl. Tilatuista soluputkista jätettiin kaksi putkea solulaatua kohden kontrolliputkiksi, jolloin niihin ei lisätty näytettä. Näytteiden lisäämisen jälkeen soluputkia inkuboitiin CO₂-inkubaattorissa (Binder GmbH Bergstr), jonka CO₂-pitoisuus on noin 5 % ja lämpötila 36–36,9 °C. Soluputkia mikroskoipoitiin (Olympus CK2) viikon sisällä viitenä päivänä nelinkermaisella suurennoksella. Viljelmissä havaitut muutokset kirjattiin muistiin käyttäen seuraavanlaisia merkintöjä:

<u>Havainto</u>	<u>Kirjaus</u>
Ei muutosta solumatossa	-
Mahdollinen muutos solumatossa	+?
Virusten aiheuttama solutuho (CPE):	
1. aste 1 – 25 % soluista tuhoutunut	+
2. aste 25 – 50 % soluista tuhoutunut	++
3. aste 50 – 75 % soluista tuhoutunut	+++
4. aste 75 – 100 % soluista tuhoutunut	++++

Jos solu saavutti 3. tai 4. asteen CPE:n ennen seitsemättä inkubointipäivää, otettiin soluputki ns. syväjäähän. Solujen syväjääditys tapahtui siten, että soluputkia sekoitettiin koeputkisekoittimella (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) noin 10 sekunnin ajan, jolloin solumatto irtosi valtaosin viljelyputken reunasta. Jos reunalle jäi vielä sekoituksen jälkeen solumattoa, se raaputettiin pasteuripipetillä irti. Solumatton irrottamisen jälkeen koko putken sisältö pipetoitiin 2 ml kierrekorkilliseen varastoputkeen. Putkien solut syväjäädytettiin varastoimalla ne $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa pakastimessa.

9.5 PCR

9.5.1 Oberste-A-RT-PCR

Tutkittavana materiaalina käytetään soluviljelymenetelmällä eristetyn enteroviruksen RNA:ta. Infektoidusta soluviljelmästä otetusta 100 μl näytteestä eristettiin RNA työtä varten E.Z.N.A.[®] Total RNA -kitillä (Omega Bio-Tek). Menetelmä on kehitetty enterovirusten tyypitykseen ja se perustuu Obersten ym. vuonna 2003 julkaisemaan artikkeliin [84].

Enteroviruksen genominen RNA kopioidaan cDNA:ksi yhden putken menetelmällä käänteiskopioijaentsyymien ja enteroviruspesifisen reversealukkeen avulla. Muodostuneesta cDNA:sta monistetaan forward- ja reverse-alukkeiden avulla noin 350 nukleotidin pituinen DNA-tuote Oberste-A-RT-PCR -menetelmällä. Oberste-A-RT-PCR -menetelmän käyttö vi-

rustyypityksessä perustuu enterovirusgenomin VP1-kapsidiproteiinia koodaavalla alueella sijaitsevan kullekin eri serotyypille spesifisen sekvenssin monistamiseen. [84; 85]

Alukkeet (DNA Technology A/S):

92584-forward 5'- MIG CIG YIG ARA CNG G -3'

92583-reverse 5'- CIC CIG GIG GIA YRW ACA T -3'

jossa I = inosiini, joka pariutuu A:n, C:n ja U:n kanssa

R = G / A

Y = T / C

M = A / C

W = A / T

N = A / C / G / T

Alukkeista valmistettiin 25 µM käyttölaimennokset Sigma-veteen.

Positiivisena kontrollina työssä käytettiin CVB5:stä eristettyä RNA:ta.

Aluksi valmistettiin reaktioseos kaikille työssä tehtäville reaktioille. Huolellisesti sekoitettua reaktioseosta pipetoitiin 49 µl kuhunkin reaktiokuoppaan PCR-kuoppalevyille. Kutakin näyttettä lisättiin reaktiokuoppiin 1 µl sekoituksen jälkeen. Näytteiden lisäämisen yhteydessä lisättiin omiin reaktiokuoppiinsa myös 1 µl positiivista kontrollia sekä 1 µl Sigma-vettä negatiiviseksi PCR kontrolliksi. RNA:n lisäämisen jälkeen PCR-levyt suljettiin foliolla.

Reaktioseos yhdelle reaktiolle:

10 X RT / PCR –puskuri (LATU)	5,0 µl
dNTP-seos (2 mM, LATU)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM, Integro)	3,0 µl
Forward-aluke (25 µM)	2,0 µl
Reverse-aluke (25 µM)	2,0 µl

RNasin Inhibitor -entsyymi (40 U / μ l, Biofellow)	0,3 μ l
AMV-reverse transcriptase -entsyymi (20 U / μ l, Finnzymes)	0,2 μ l
Thermopfect DNA polymerase -entsyymi (5 U / μ l, Integro)	0,3 μ l
Sigma-H ₂ O (Sigma-Aldrich)	31,2 μ l
reaktioseos yhteensä	49 μ l

Näytteet ajettiin RT-PCR:ssä (Perkin Elmer GeneAmp System 9700 PCR, The Perkin Elmer Corporation) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa:

Vaihe	Lämpötila	Aika
1	50 °C	30 min
2	94 °C	3 min
3	94 °C	30 s
4	42 °C	30 s
5	72 °C	60 s
6	72 °C	5 min

PCR:llä ajettiin kullakin ajokerralla 35 sykliä (vaiheet 3–5). Ajon päätteeksi PCR-laite viilensi reaktiotuotteet 4 °C:n lämpötilaan, jonka jälkeen ne otettiin säilytykseen 4 °C:seen jääkaappiin.

9.5.2 PCR-tuotteen analysointi ja puhdistus

9.5.2.1 Etidiumbromidia sisältävän agarosigeelin elektroforeesi

PCR-tuotteiden analysointi suoritetaan etidiumbromidia sisältävän agarosigeelin avulla. Tutkittavana materiaalina käytetään Oberste-A-RT-PCR:n tuotteita. Etidiumbromidi on fluoresoiva väriaine, joka sitoutuu DNA:n emästen väliin. Elektroforeesiajon aikana etidiumbromidi konsentroituu ympäröivästä geelistä DNA-vyöhykkeisiin. Kun geeliä valaistaan ajon päätteeksi UV-valolla, DNA:ta sisältävät vyöhykkeet näkyvät agarosigeelillä oranssinpunaisina. [86]

Nukleinihappojen elektroforeettinen erottelu perustuu molekyylien kokoon. Mitä suurempi DNA-molekyyli geelissä on, sitä hitaammin se pääsee kulkeutumaan geelin huokosten läpi,

kun taas pienemmät molekyylit kulkeutuvat geelissä nopeammin ja siten myös pidemmälle. [87]

Konsentraatioaltaan viisinkertaista DNA-näytepuskuria (5 x DNA-loading buffer, LATU) pipetoitiin mikrotiitterilevyn kuoppiin 2 µl. Tämän jälkeen kutakin Oberste-A-RT-PCR-tuotetta pipetoitiin 5 µl omiin kuoppiinsa. Sekoituksen jälkeen kunkin kuopan sisältö pipetoitiin valmistetun agarosigeelin kuoppiin. Agarosigeelinä käytettiin 2-prosenttista geeliä, jonka etidumbromidipitoisuus (Etidiumbromidi, Continental Laboratory Products Ltd) oli 0,5 µg / ml. Lisäksi geelille pipetoitiin vertailua varten 100 bp kokoinen DNA:n kokomarkkeri (Generuler 100 bp DNA ladder, Fermentas).

Elektroforeesi (Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia biotech) suoritettiin 140 mA virralla 20–60 minuutin ajan, käyttäen ajopuskurina 1 x TBE-puskuria (10 x TBE-puskuri, LATU, josta tehtiin yksinkertainen käyttölaimennos). Ajoaika riippui siitä, kuinka nopeasti vyöhykkeet alkoivat kulkeutua geelillä. Ajo pysäytettiin, kun väririntamien väli oli 1–3 cm ja alin rintama oli 3–4 cm päässä kuopasta.

Oberste-A-RT-PCR-positiiviset näytteet havaittiin agarosigeeliltä kohdistamalla siihen UV-valoa. Ne geelin näytteet, joissa havaittiin noin 350 bp kohdalla fluoresoiva fragmentti, tulkittiin PCR-positiivisiksi. Geelin tarkastelu ja kuvaaminen UV-valossa suoritettiin siihen tarkoitetulla laitteella (Gene Flash, Gel Documentation System, Syngene bio imaging).

9.5.2.2 PCR-tuotteen visualisointi Elchrom-geelien avulla ja suora sekvensointi ilman puhdistusta

Tutkittavana materiaalina käytettiin niitä Oberste-A-RT-PCR:n tuotteita, jotka agarosigeelin elektroforeesilla havaittiin positiivisiksi eli jotka muodostivat geelille 350 bp kokoisen raidan (band). Elchrom-geelijaon tarkoituksena oli ottaa talteen haluttu noin 350 bp kokoinen PCR-tuotefragmentti, josta DNA uutettiin talteen sekvensointia varten. Elchrom-geeli on inertti selluloosageeli, jolta PCR-tuote on helppo irrottaa ilman erillistä puhdistusta. Elektroforeesin ajopuskurina käytetään etidumbromidipitoista TAE-puskuria. Etidiumbromidia käytetään DNA:n värjäämiseen selluloosageelissä. [88]

Konsentraatioltaan viisinkertaista DNA-näytepuskuriä (5 x DNA-loading buffer, LATU) pipetoitiin mikrotiiterilevyn kuoppiin 2 µl. Tämän jälkeen kutakin näytettä pipetoitiin 13 µl omiin kuoppiinsa. Sekoituksen jälkeen kunkin kuopan sisällöstä pipetoitiin 12 µl Elchrom-geelin (PCR CheckIT -geeli, Elchrom Scientific) kuoppiin. Lisäksi geelille pipetoitiin vertailua varten 100 bp kokoinen DNA:n kokomarkkeri (Generuler 100 bp DNA ladder SMO241).

Elektroforeesi (Electrophoresis Power Supply EPS 601 Pharmacia biotech) suoritettiin ajaen näytteitä 150 mA virralla 10 minuutin ajan. Elektroforeesin ajopuskurina käytettiin 1 x TAE-puskuria (50 x TAE-puskuri, LATU, josta tehtiin yksinkertainen käyttölaimennos), jonka etidiumbromidipitoisuus (Etidiumbromidi, Continental Laboratory Products Ltd) oli 0,5 µg / ml.

Oikean kokoiset PCR-tuotefragmentit havaittiin kohdistamalla geelille ajon päätyttyä UV-valoa ja vertaamalla fluoresoivia fragmentteja DNA:n kokomarkkerin fragmentteihin. Halutut noin 350 bp kokoiset PCR-tuotefragmentit leikattiin geeliltä talteen ja siirrettiin omiin eppendorffputkiin.

Jokaiseen PCR-tuotefragmentin sisältämään eppendorffputkeen lisättiin 13 µl MgCl₂-liuosta (1 M Magnesiumkloridi, LATU), minkä jälkeen seos sentrifugoitiin (Biofugi Pico, Heraeus) putken pohjaan. Putkia inkuboitiin 70 °C:n lämpöhauteessa (Techne heater DB-3, Dri-Block) 30 minuutin ajan, jolloin Elchrom-geelin sisältämä DNA uuttui ympäröivään MgCl₂-liuokseen. Inkuboinnin jälkeen putkien sisältämä DNA-uute pipetoitiin erilleen kiinteästä geelistä. Uutettu DNA-tuote on sellaisenaan valmis lähetettäväksi sekvensointiin.

9.6 Sekvensointi ja tyyppitys

Uutettu DNA-tuote voidaan lähettää sellaisenaan sekvensointiin (Molecular Medicine Sequencing Laboratory, SeqLab) Oberste-A-alukkeiden (92584-forward ja 92583-reverse, DNA Technology A/S) kanssa.

Sekvensointiin lähetettiin kustakin DNA tuotteesta kaksi näytettä, josta toisessa oli lisättyinä Oberste-A-RT-PCR:ssä käytettyä 92584-forward-aluketta ja toisessa 92583-reverse-

aluketta. Alukeliuosten konsentraatiot olivat 5 μM . Mikrotiitterilevylle pipetoitavien liuosten tilavuudet on esitetty alla.

Tilavuudet yhdelle näytteelle:

Steriili vesi: 1,5 μl

Aluke (92584-forward tai 92583-reverse): 3,2 μl

DNA tuote: 2,5 μl

Sekvensoinnissa näyte-DNA:sta muodostetaan eripituisia DNA-fragmentteja. Reaktiot suoritetaan neljässä koeputkessa, josta jokaisessa näyte fragmentoituu yhden nukleotidin kohdalta. Muodostuneiden fragmenttien avulla voidaan päätellä sekvenssin nukleotidijärjestys. Nykyään sekvensointipalvelut tuottavat näytteiden sekvenssit lähinnä Sangerin menetelmällä, joka on entsyymaattinen menetelmä DNA:n sekvensoimiseksi. [89]

DNA tuotteiden sekvenssit saatiin sekvensoinnista elektroferogrammeina eli käyrinä, jotka sekvensointilaitte piirtää nukleotidien antamista fluoresenssisignaaleista. Elektroferogrammit tarkistettiin käyttäen Vector NTI:n ContigExpress (Invitrogen) -ohjelmaa. Elektroferogrammeista muodostettiin ContigExpress-ohjelmalla niin sanottu contig (contiguous, lyhenne contig), jossa saman DNA-tuotteen kummankin näytteen (toinen tehty käyttäen forward-aluketta ja toinen käyttäen reverse-aluketta) antamat elektroferogrammit asetettiin kohdakkain. Contig on siis kahden yksittäisen DNA segmentin muodostama päällekkäinen sekvenssi. Contigista poistettiin heikkolaatuiset kohdat ja muiden kohtien luettavuus tarkistettiin. Heikkolaatuiset kohdat ovat alueita, joissa signaali on hyvin korkea tai matalaa tai se sisältää päällekkäisiä nukleotidipiikkejä. Korjatussa contigissä ei ole eroavaisuuksia kahden päällekkäin asetetun sekvenssin välillä, vaan ne ovat keskenään yhtenevät. Saatua nukleotidisekvenssiä käännettiin myös aminohapoiksi VectorNTI-ohjelmalla etsien ensin sopiva lukukehys. Nukleotidisekvenssiä verrattiin Nucleotide BLAST -tietokannan (NCBI) geenipankin sekvensseihin, jolloin virustunnistus voitiin tehdä seuraavien rajaehtojen avulla. [89]

Rajaehdot:

- VP1-kapsidiproteiinia koodaavan alueen nukleotidisekvenssissä tulee olla yli 75 %:n yhtäläisyys, samalla yhtäläisyyden muihin serotyyppeihin on oltava alle 70 %.
- Aminohappotasolla yhtäläisyyden tulee olla yli 88 %.
- Vertailtavan nukleotidisekvenssin tulee olla vähintään 100 nukleotidin pituinen, mutta mieluiten koko VP1-kapsidiproteiinin kattava.

Rajaehdoiksi asetetut prosentit ovat viitteellisiä, minkä vuoksi tulos ilmoitetaan lähimpänä serotyyppinä ja nukleotidi-identtisyysprosenttina.

10 Tulokset ja tulosten tarkastelu

10.1 Näytteet ja tutkimushenkilöt

Tutkimukseen osallistui yhteensä 53 lasta, jotka ovat syntyneet vuosina 2000, 2002, 2004–2010. Heistä 19 on tyttöjä (36 %) ja 34 on poikia (64 %). Heillä kaikilla on suurentunut geneettinen alttius sairastua tyypin 1 diabetekseen (luku 7). Heidän sairastumisiaan seurattiin aikana, joka vaihteli tutkimushenkilöstä riippuen kolmesta päivästä 11 kuukauden (seuranta-aika on laskettu ensimmäisen tutkimukseen saapuneen näytteen perusteella). Tutkimushenkilöiden seuranta-ajat vaihtelevat suuresti, sillä INDIS-tutkimukseen rekrytointi on vielä tätä työtä tehtäessä ollut käynnissä. Yksi tutkimukseen osallistuneista tytöistä (taulukossa 4 merkitty *) lopetti tutkimuksen kesken. Hän oli syntynyt vuonna 2008. Tutkimushenkilöt on luokiteltu taulukkoon 4 syntymävuotensa ja sukupuolensa mukaan.

Taulukko 4. Tutkimushenkilöt luokiteltuna syntymävuotensa ja sukupuolensa mukaan.

Syntymävuosi	Tyttöjä	Poikia	Lapsia yhteensä
2000	-	1	1
2002	-	1	1
2004	2	-	2
2005	-	2	2
2006	1	3	4
2007	5	2	7
2008	4*	3	7*
2009	6	19	25
2010	1	3	4
yhteensä	19	34	53

Tutkittavaksi saapuneet 200 näytepakkausta sisälsivät 196 ulostenäytettä ja 198 nenäeritenäytettä. Näytteistä 34 % oli tytöiltä ja 66 % pojilta. Kaikkia näytteitä ei kuitenkaan analysoitu, sillä työssä pyrittiin tunnistamaan lasten ensimmäisten infektiioireiden yhteydessä otetuista näytteistä niiden mahdollisesti sisältämät enterovirukset, jotta infektion aiheuttama enterovirus saataisiin selville. Joillain lapsilla oli muita intensiivisempi näytteenotto-ohjeistus (luku 7), jolloin heiltä tuli paljon näytteitä, joiden näytteenottoitiheys infektion aikana oli yhdestä seitsemään päivään. Näitä näytteitä ei analysoitu INDIS-tutkimuksen tässä vaiheessa. Analysoimatta jäi kaikkiaan 35 ulostenäytettä ja 36 nenäeritenäytettä. Analysoiduista näytteistä tyttöjen oli 35 % ja poikien 65 %. Näytteiden lukumäärät on koottu taulukkoon 5.

Taulukko 5. Saapuneet ja tutkittavat näytteet jaoteltuna tutkimushenkilöiden sukupuolen mukaan.

Näytteet	Ulostenäytteet		Nenäeritenäytteet	
	Tytöt	Pojat	Tytöt	Pojat
Saapuneet	67	129	68	130
Analysoidut	56	105	57	105

Tutkimukseen osallistuneista lapsista kolmella oli alkanut muodostua autovasta-aineita. Heistä kaikki olivat poikia. Kaksi heistä oli autovasta-ainepositiivisia jo ennen ensimmäisten näytteiden ottamista. Näistä toisen verenkiertoon oli ilmestynyt ICA:ta eli saarekesoluvas-ta-ainetta hänen ollessa 2 vuotta ja 7 kuukautta vanha, kun taas toisella IAA:ta eli insulii-

niautovasta-ainetta hänen ollessaan 7 kuukautta vanha. Pojista kolmas kääntyi IAA-positiiviseksi tutkimuksen aikana ollessaan tällöin vuoden vanha. Tätä ennen häneltä oli kuitenkin saatu vain yksi uloste- ja yksi nenäeritenäyte, joista molemmat olivat enterovirusten suhteen negatiivisia EV rRT-PCR:ssä. Nenäeritenäytteessä ei havaittu myöskään rinovirusia. Suurimman T1D:lle altistavan vaikutuksen Oikarinen ym. 2011 havaitsivat olevan niillä enterovirusinfektioilla, joiden aiheuttajavirusta on havaittavissa verenkierrossa ja siten myös ulosteessa enintään puoli vuotta ennen ensimmäisen autovasta-ainepositiivisen näytteen ottoa. Lisäksi tämän riskin havaittiin olevan pojilla suurempi kuin tytoilla. Näiden kolmen pojan tapauksessa autovasta-ainepositiivisuutta edeltävän mahdollisen enterovirusinfektion aiheuttajaa ei siis saatu selville. [90]

10.2 Enterovirusinfektioiden esiintyvyys

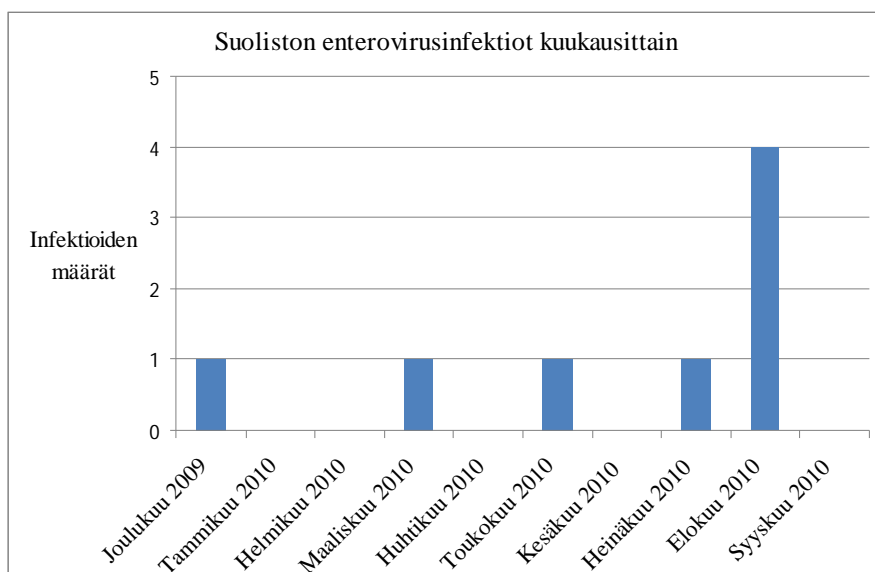
EV rRT-PCR:ssä positiiviseksi osoittautui 12 ulostenäytettä ja 30 nenäeritenäytettä. Näistä positiivisista näytteistä osa oli saman infektion aikana otettuja (infektioita toisistaan erottamaan käytettiin kolmen kuukauden aikarajaa, jollei positiivisten näytteiden välillä havaittu negatiivisista jaksoa). Ulostenäytteiden kohdalla EV rRT-PCR -menetelmän tiedetään olevan hyvin spesifinen enterovirusille, sillä rinovirusia esiintyy vain hengitysteissä. Sen sijaan nenäeritenäytteiden kohdalla sen tiedetään tunnistavan viruksia ristiin HRV rRT-PCR:n kanssa (kohta 9.3.1).

Tämän vahvistavat myös työn tulokset, joissa jokainen enteroviruspositiivinen nenäeritenäyte on osoittautunut positiiviseksi myös rinovirusten suhteen. Ei voida olettaa hengitysteissä esiintyvien enterovirusten yhteydessä esiintyvän jokaisessa tapauksessa myös rinovirusia, vaikka rRT-PCR:ien tulokset siihen viittaavatkin. Tämä voi kuitenkin olla mahdollista yksittäisissä tapauksissa, mutta näiden tapausten selvittäminen vaatisi geneettistä tyyppitystä myös rinovirusten osalta, mitä tässä työssä ei tehty. Tämän vuoksi enterovirusten ja rinovirusten aiheuttamia hengitystieinfektioita ei tässä työssä voida erottaa toisistaan, ja näin ollen HRV rRT-PCR:ssä positiivisiksi tunnustautuneet näytteet katsotaan myös enteroviruspositiivisiksi. EV rRT-PCR:ssä positiivisiksi tunnustautuneet nenäeritenäytteet ovat tässä työssä kuitenkin käsitelty omana kokonaisuutenaan lähinnä sen vuoksi, että sen antamien tulosten perusteella valittiin soluviljelmiin istutettavat nenäeritenäytteet (kohta

9.4). Todellisuudessa nämäkin positiiviset tulokset voivat olla tahattomasti tunnustautuneita rinovirusia. Nenäeritenäytteiden tapauksissa taudinaiheuttajista olisi syytä käyttää termiä rino/enterovirukset.

10.2.1 Eri vuodenaikoina

Enteroviruspositiivisia ulostenäytteitä havaittiin 12, jotka jakaantuivat 8 erilliseen infektiioon (liite 2, taulukko 2). Infektioiden jakaantuminen eri kuukausille on esitetty kuviossa 11. Kaikki ulostenäytteiden positiiviset löydökset tehtiin poikalasten näytteistä. Koska enteroviruspositiivisten ulostenäytteiden määrä jäi alhaiseksi, voidaan tehdä vain karkea johtopäätös, jonka mukaan suoliston enterovirusinfektiot ovat poikalapsilla yleisempiä. Lisäksi on syytä huomata, että analysoiduista ulostenäytteistä 65 % oli poikalapsilta. Samaan tulokseen on kuitenkin päädytty myös muissa tutkimuksissa, kuten Sadeharjun ym. 2003 tekemässä tutkimuksessa [91].

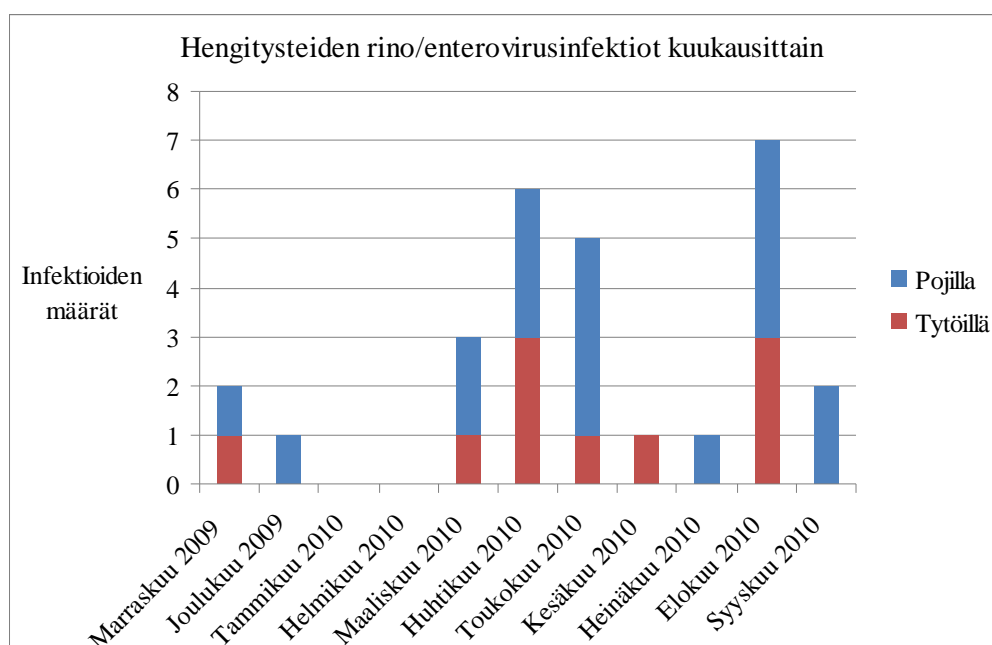


Kuvio 11. Suolistossa esiintyvien enterovirusten aiheuttamat infektiot jaoteltuna kuukausittain.

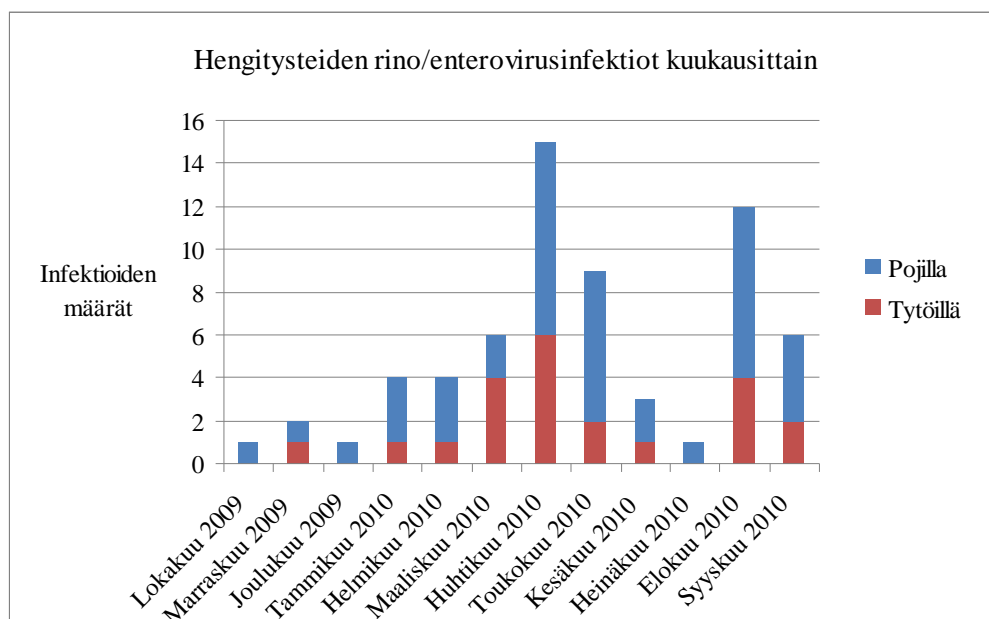
Enterovirusia esiintyi suolistossa eniten elokuussa (4 infektiota). Saatua tulosta on yhteneväinen muiden tutkimusten kanssa, joiden perusteella enterovirusinfektiot ovat yleisimpiä loppukesällä ja syksyllä [4, s. 514–516; 5].

EV rRT-PCR:ssä positiivisiksi tunnustautuneet nenäeritenäytteet jaettiin 28 infektiin, joista 36 % todettiin tyttölasten ja 64 % poikalasten nenäeritenäytteistä (liite 2, taulukko 3). Näiden infektioiden jakaantuminen eri kuukausille on esitetty kuviossa 12.

Tarkasteltaessa hengitysteissä esiintyviä infektoivia enterovirusia (rino/enterovirusia) on kuitenkin syytä tarkastella EV rRT-PCR:ssä positiivisia ja HRV rRT-PCR:ssä positiivisia näytteitä yhdessä. Positiivisia löydöksiä tehtiin 89 nenäeritenäytteestä, mikä vastaa 55 %:a analysoiduista nenäeritenäytteistä (liite 2, taulukko 4). Positiiviset löydökset jaettiin 64 infektiin, joista 34 % havaittiin tytöillä ja 66 % pojilla. Niiden aiheuttamien infektioiden esiintymiset kuukausittain on esitetty myös kuviossa 13.



Kuvio 12. Hengitysteissä esiintyvien rino/enterovirusten aiheuttamat infektiot jaoteltuna kuukausittain EV rRT-PCR:n antamien tulosten perusteella.

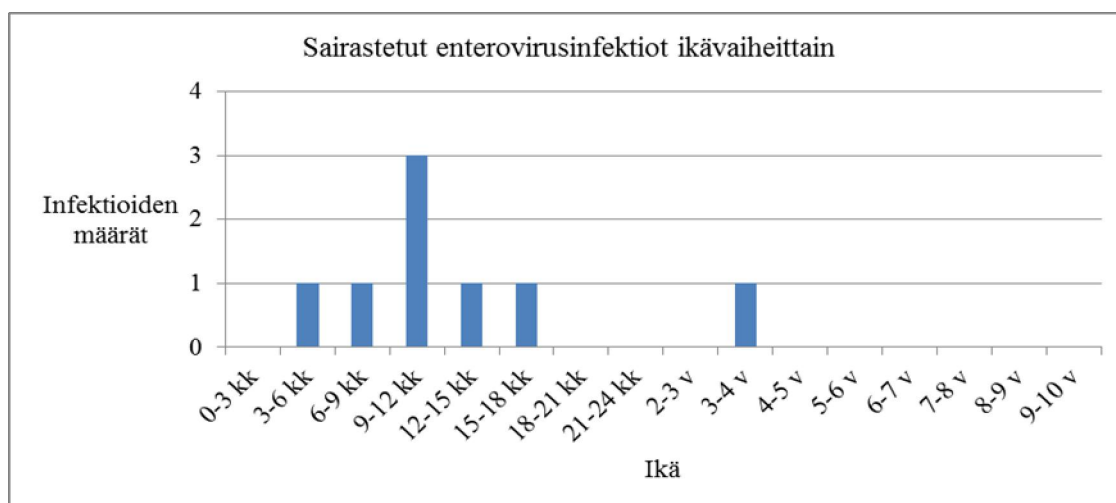


Kuvio 13. Hengitysteissä esiintyvien rino/enterovirusten aiheuttamat infektiot jaoteltuna kuukausittain HRV rRT-PCR:n antamien tulosten perusteella.

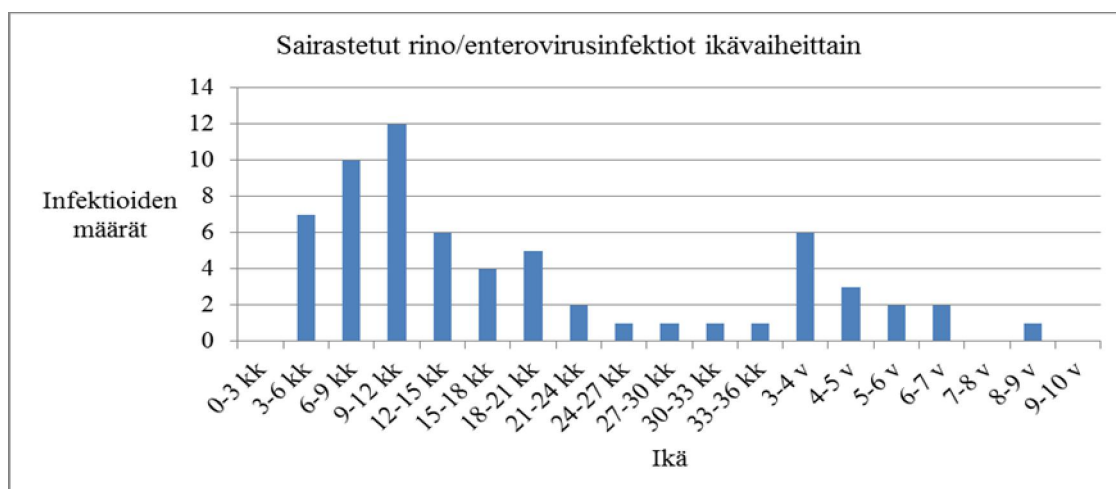
Kuviosta 13 huomataan, että rino/enterovirukset aiheuttavat infektoita läpi vuoden, mutta ne keskittyvät loppukevääseen ja alkusyksyyn. Rinovirusinfektioita tiedetäänkin esiintyvän kaikkina vuodenaikoina, mutta eniten niitä esiintyy keväällä ja syksyllä, mikä käy ilmi myös tässä työssä.

10.2.2 Eri ikävaiheissa

Kun tarkastellaan lasten sairastamia enterovirusinfektioita ikävaiheittain, havaitaan, että suurin osa enterovirusinfektioista on sairastettu alle 18 kuukauden ikäisinä (kuviot 14 ja 15). Ulostenäytteiden mukaan laskettuna 88 % enterovirusinfektioista ja nenäeritenäytteiden mukaan 61 % rino/enterovirusinfektioista oli sairastettu alle 18 kuukauden iässä. On kuitenkin muistettava, että 57 % analysoiduista näytteistä oli otettu alle 18 kuukauden ikäisiltä lapsilta, mutta tästäkin huolimatta sairastuvuus alle 18 kuukauden iässä on muihin ikävaiheisiin verraten merkittävästi yleisempää.



Kuvio 14. Lasten sairastamat enterovirusinfektiot ikävaiheittain (ulostenäytteistä havaitut). Huomaa x-akselin asteikon muuttuminen 24 kk jälkeen.



Kuvio 15. Lasten sairastamat rino/enterovirusinfektiot ikävaiheittain. Huomaa x-akselin asteikon muuttuminen 36 kk jälkeen.

10.3 Tyypitetyt virukset

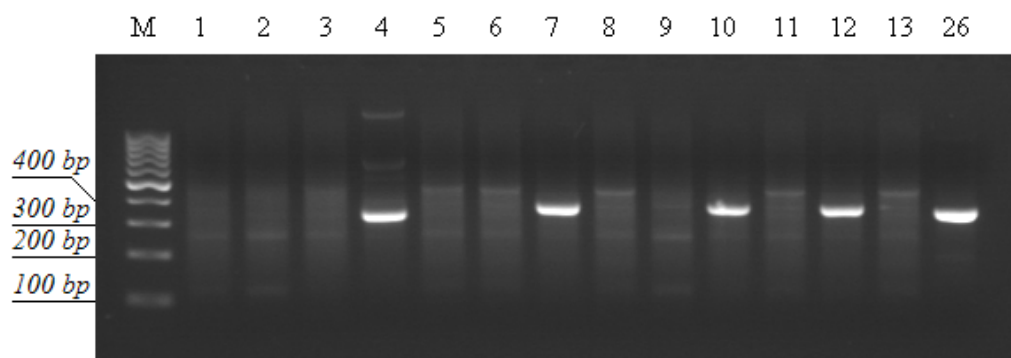
Taulukosta 6 nähdään, että 13 % näytteistä sisälsi rino/enterovirusta. Puolestaan 52 % (7 % analysoiduista näytteistä) näistä EV rRT-PCR:ssä positiivisista näytteistä aiheutti CPE:n soluviljelmään. Kaikki istutetut näytteet kuitenkin jatkokäsiteltiin istutustuloksesta (CPE:n

asteesta) huolimatta siinä toivossa, että soluviljelmä olisi mikroskopointinäkömäästä huolimatta onnistuttu infektoimaan. Virus onnistuttiin tyypittämään 31 %:sta (4 % kaikista analysoiduista näytteistä) niitä näytteitä, jotka olivat enteroviruspositiivisia.

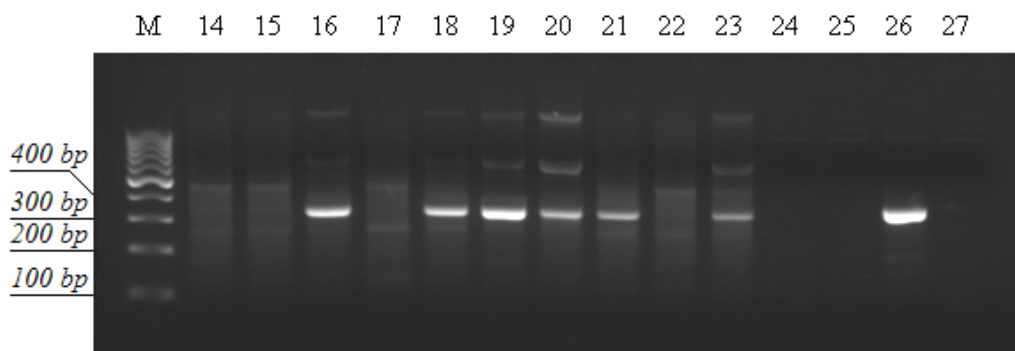
Taulukko 6. Analysoiduista näytteistä positiivisia työvaiheittain.

	Analysoidut näytteet	EV rRT-PCR positiiviset	Istutuksessa CPE	Virus tyypitetty
Näytemäärä	323	42	22	13
Prosentteina	100 %	13 %	7 %	4 %

Oberste-A-RT-PCR suoritettiin kaikille EV rRT-PCR:ssä positiivisille näytteille eli kaikkiaan 42 näytteelle. Näistä 13 näytettä (31 %) muodostivat halutun noin 350 bp kokoinen raidan. Kuusi niistä oli ulostenäytteitä ja seitsemän nenäeritenäytteitä. Kuvioissa 16 ja 17 ovat ne agarosigeelikuvat, joissa näkyy suurin osa positiivisista näytteistä.



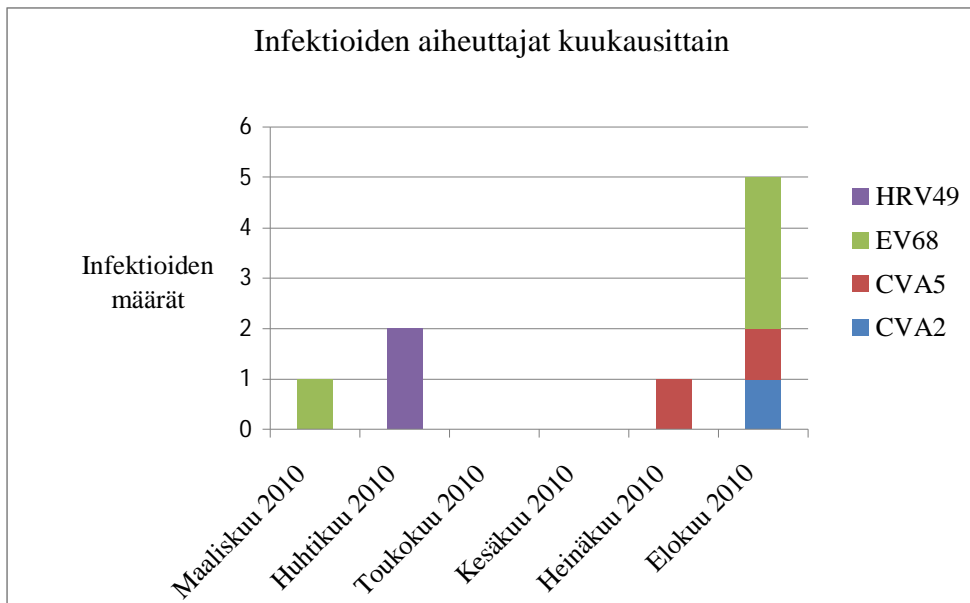
Kuvio 16. Elektroforeesilla ajettu agarosigeeli, jonka kuopat on nimetty yläpuolelle. M on kokomarkkeri, 1–13 ovat näytteitä, 26 on positiivinen PCR-kontrolli. Kuvasta huomataan, että kuoppien 4, 7, 10 ja 12 näytteet ovat PCR-positiivisia.



Kuvio 17. Elektroforeesilla ajettu agarosigeeli. M on kokomarkkeri, 14–23 ovat näytteitä, 24 ja 25 ovat RNA-eristyksen negatiivisia kontrolleja (kohta 9.2), 26 on positiivinen PCR-kontrolli ja 27 negatiivinen PCR-kontrolli. Kuvasta huomataan, että kuoppien 16, 18, 19, 20, 21 ja 23 näytteet ovat PCR-positiivisia. RNA-eristyksen onnistumisesta (kontaminoitumattomuudesta) kertoo negatiivinen tulos kohdissa 24 ja 25, kun taas PCR-työn onnistumisesta kertoo kohdan 26 positiivinen ja kohdan 27 negatiivinen tulos.

Sekvensoimalla positiiviset näytteet selvisi, että 11 niistä sisälsi ihmisen enterovirusia, ja kaksi rinovirusia (liite 3). Ulostenäytteet sisälsivät seuraavia viruksia: CVA5 (5/6) ja CVA2 (1/6). Nenäeritenäytteistä puolestaan löytyi seuraavia viruksia: EV68 (4/7), HRV49 (2/7) ja CVA5 (1/7). Tyypitetyt näytteet ovat peräisin yhdeksältä eri lapselta, joista kaksi on tyttöjä (22 %) ja seitsemän (78 %) poikia.

EV68 (vanhassa luokittelussa ollut HRV87) ja HRV49 eristettiin nenäeritenäytteistä [3]. Kuvioista 18 huomataan niiden aiheuttamia infektoita esiintyvän lähinnä keväällä ja syksyllä eli silloin, kun rinovirusia tyypillisimmin tavataan. Suoliston enterovirukset CVA2 ja CVA5 aiheuttavat infektoita muiden enterovirusten tapaan syksyllä.



Kuvio 18. Tyypitettyjen virusten aiheuttamat infektiot kuukausittain.

10.3.1 Suoliston enterovirusinfektiot

Analysoidut näytteet paljastivat kaksi infektiota, jonka näytteet osoittautuivat positiivisiksi kaikissa tehdyissä PCR:ssä (EV rRT-PCR uloste- ja nenäeritenäytteille ja HRV rRT-PCR nenäeritenäytteille), mutta joiden aiheuttajaa ei saatu soluviljelymenetelmällä eristettyä. Tästä seurasi se, ettei infektiivisen enteroviruksen RNA:ta saatu eristettyä ja täten myöskään tyypitettyä. Tässä työssä tyypitys suoritettiin sekvensoimalla enterovirusgenomin VP1-kapsidiproteiinia koodaava alue (kohta 9.5.1). Näiden näytteiden kohdalla olisi syytä toteuttaa tyypitys uudelleen toisella menetelmällä, kuten nested-PCR:llä, tulosten saamiseksi. Nested-PCR on PCR-menetelmä, jossa suoritetaan kaksi PCR-reaktiota yhdellä kertaa eri alukepareilla. Ensimmäisen reaktion tuote toimii toisen reaktion templaattina. Menetelmä soveltuu sellaisten näytteiden tyypittämiseen, joissa virusgenomia on niin vähän, ettei etidiumbromidia pääse sitoutumaan perinteisen PCR:n tuotteeseen tarpeeksi näytteen agarosigeelille muodostaman raidan aikaansaamiseksi. Menetelmä korvautuu siis perinteisen tyypitykseen käytettävän PCR:n ja sen tuotteiden analysointiin käytettävän geielektroforeesin. Sekvensoimalla nested-PCR-tuote saadaan selville infektion aiheuttanut virus. [92]

CVA2 selvisi aiheuttajaksi vain yhdessä infektiossa. Tässä tapauksessa virusta löytyi ainoastaan ulostenäytteestä. Rinnakkainen nenäeritenäyte ei osoittautunut enteroviruspositiiviseksi EV rRT-PCR:ssä. Ulostenäytteen Ct-arvo 28,63 viittaisi siihen, että tartunta on saatu jo ennen kyseisen näytteen ottoa, minkä vuoksi virusta ei enää erity rinnakkaiseen nenäeritteeseen.

CVA5:n aiheuttamia infektoita tunnistettiin kaksi. Näistä toisessa tapauksessa CVA5 onnistuttiin eristämään sekä ulostenäytteestä että rinnakkaisesta nenäeritenäytteestä. Tässä tapauksessa näytteiden antamat Ct-arvot olivat suunnilleen samaa suuruusluokkaa (Ct-arvo ulostenäytteestä 27,36 ja nenäeritenäytteestä 26,42). Mitä pienempi Ct-arvo on (EV rRT-PCR:ssä Ct-arvon tarkasteluväli on 0–40), sitä enemmän näyte sisältää virusgenomia. Nenäeritenäyte näyttäisi olevan ulostenäytteeseen verrattuna aavistuksen vahvempi, jolloin näytteet on saatu otettua aivan infektion alkuvaiheessa. Tämän jälkeen otetuista näytteistä CVA5 on tunnistettu vain ulostenäytteistä ja niiden Ct-arvot ovat olleet infektion ensimmäistä ulostenäytettä heikompia. Tämä viittaisi siihen, että CVA5 lisääntyy infektion alussa ylähengitysteissä, josta se levittyy nopeasti suolistoon. Nopeasti infektion edetessä sen lisääntyminen ylähengitysteissä loppuu, mutta lisääntyminen suolistossa jatkuu sille optimaalisten olosuhteiden vuoksi pidempään.

Toisessa tapauksessa CVA5 onnistuttiin tunnistamaan vain ulostenäytteestä, mikä viittaisi siihen, että varsinainen tartunta oli saatu jo ennen näytteenottoa, jolloin virusta ei enää erittynyt nenäeritteeseen infektion tässä vaiheessa. Tässä tilanteessa on syytä tarkastella näytteen antamaa Ct-arvoa. Ulostenäytteen antama Ct-arvo kertoo näytteen olleen suhteellisen vahva (Ct-arvo 23,74), jolloin nenäeritteestä olisi voinut odottaa löytyvän myös kyseistä virusta. Toisaalta lapsen sairastama CVA5-infektio on voinut alun perinkin olla voimakkaampi kuin edellisen tapauksen infektio, minkä vuoksi virusta ei enää erity nenäeritteeseen. Infektiota edeltävien näytteiden puuttuessa, on tapauksesta mahdotonta tehdä tämän parempia johtopäätöksiä.

10.3.2 Hengitysteiden enterovirusinfektiot

EV68:n aiheuttamia infektiota havaittiin neljä (taulukko 7). Yhdessä näistä neljästä EV68:n aiheuttamasta infektiosta vain nenäeritenäyte oli positiivinen EV rRT-PCR:ssä. Kolmessa muussa tapauksessa enterovirusgenomia havaittiin reaaliaikaisella PCR-menetelmällä niin ulostenäytteessä kuin nenäeritenäytteessäkin. Virus onnistuttiin eristämään kuitenkin vain nenäeritenäytteistä. EV68 on melko huonosti tunnettu virus, mutta sen tiedetään lisääntyvän rinovirusten tapaan ylähengitysteissä eikä sitä tiedettävästi ole onnistuttu eristämään ulostenäytteistä. Kuitenkin ulosteen samanaikainen enteroviruspositiivisuus PCR:ssä viittaisi siihen, että EV68 voisi erittyä myös suolistoon pienissä määrin. Ulosteeseen erittyvä virusmäärä voisi olla niin pieni, ettei sitä siksi olisi onnistuttu eristämään ulostenäytteistä ja täten tyypittämään. Tätä ajatusta tukevat myös heikot Ct-arvot ulostenäytteille tehdyssä EV rRT-PCR:ssä. Näiden infektioiden kohdalla olisi syytä suorittaa tyypitys uudelleen toisella menetelmällä, kuten nested-PCR:llä, ulostenäytteissä esiintyvän viruksen selvittämiseksi.

Taulukko 7. EV rRT-PCR:n antamat Ct-arvot EV68-infektioiden näytteistä.

Näyteparin numero	Ulostenäyte (Ct-arvo)	Nenäeritenäyte (Ct-arvo)
94	38,60	27,84 *
177	33,96	28,72 *
188	-	22,86 *
192	36,86	23,36 *

* Näytteistä tyypitettiin EV68

HRV-A-lajiin kuuluva HRV49 onnistuttiin tahattomasti eristämään kahdesta nenäeritenäytteestä yritettäessä eristää niistä infektiivisiä ihmisen enterovirusia. HRV-A-lajin edustajien tiedetään kasvavan RD(A)-solulinjan soluissa, mutta niiden inkubointilämpötila on tyypillisesti ihmisen enterovirusia alhaisempi. Näiden kahden nenäeritenäytteen antamat Ct-arvot olivat EV rRT-PCR:ssä (Ct-arvot: 34,90 ja 31,85) huomattavasti alhaisempia kuin HRV rRT-PCR:ssä (Ct-arvot: 18,31 ja 15,79), jolloin molemmat näytteet ovat olleet vahvoja rinovirusten suhteen. Vaikuttaisi siltä, että suoritettu EV rRT-PCR on tunnistanut rinoviruksen ja antanut siksi positiivisen tuloksen. EV rRT-PCR:llä ei onnistuttu löytämään enterovirusta näille nenäeritenäytteille rinnakkaisista ulostenäytteistä.

10.4 Pitkittyneet enterovirusinfektiot

Tyypin 1 diabetesta sairastavilla lapsilla on havaittu olevan heikentynyt Th1-tyyppinen (T-auttajasolu tyyppi 1) immuunivaste verrattuna terveisiin lapsiin ja niihin geneettisesti alttiin lapsiin, joilla T1D ei ole vielä puhjennut. Th1-tyyppisellä immuunivasteella tarkoitetaan soluvälitteistä immuniteettia, jossa tyypin 1 T-auttajasolut ovat oleellisessa asemassa. Heikentynyt Th1-tyyppinen immuunivaste saa aikaan virusinfektion pitkittymisen. Osittain tästä johtuen T1D:stä sairastavat lapset saattavat olla muita alttiimpia enterovirusinfektioille. [93]

Tarkastelemalla suoliston enterovirusinfektioiden kestoja pyrittiin geneettisesti tyypin 1 diabetekselle alttiiden (luku 7) tutkimushenkilöiden keskuudesta löytämään näitä lapsia, joilla enterovirusinfektio olisi selkeästi pitkittynyt (yli kolme kuukautta kestänyt infektio). Yhtään tällaista pitkittynyttä enterovirusinfektiota ei ulostenäytteiden joukosta löytynyt. Koska kellekään tutkimushenkilöstä ei tähän mennessä ollut diagnosoitu T1D:stä, tulos vastaa oletuksia. Toisaalta tähän tulokseen voi vaikuttaa myös saatujen ulostenäytteiden vähyys suurimmalta osalta lapsista (mediaani kaksi ulostenäytettä lasta kohden).

Kun tarkasteltiin rino/enteroviruspositiivisten jaksoiden kestoja, huomattiin, että yhdellä poikalapsella, jolla oli havaittu EV68:n aiheuttama infektio, nenäeritenäytteet olivat puolen vuoden ajalta rino/enteroviruspositiivisia (liite 4). Hän oli sairastunut enterovirusinfektioon (kaikki näytteelle tehdyt PCR:t positiivisia), jonka aiheuttajavirusta ei saatu selville, kolme kuukautta ennen todettua EV68 aiheuttamaa infektiota. Tässä tuntemattomassa enterovirusinfektiossa EV rRT-PCR:ssä saatiin heikot Ct-arvot kahdesta peräkkäisestä ulostenäytteestä (39,27 ja 37,52) ja yhdestä nenäeritenäytteestä (33,92). Koska enterovirusinfektion jälkeinen immuniteetti on tyyppispesifinen ja neutraloivat vasta-aineet ovat sen toiminnassa tärkeitä, on todennäköisempää että molemmat infektiojaksot olisi aiheuttanut sama enterovirus (EV68), kuin että infektion olisi aiheuttanut näin lyhyellä aikavälillä kaksi eri enterovirusta. Lisäksi EV68:aa vastaan kehittyneiden neutralisoivien vasta-aineiden esiintyvyyden on havaittu olevan varsin runsasta suomalaisväestössä, mikä kertoo EV68:n olevan hyvin yleinen infektioiden aiheuttaja Suomessa. Koska HRV rRT-PCR:n antamat Ct-

arvot eivät myöskään olleet erityisen vahvoja minkään näistä näytteistä kohdalla, on todennäköistä, että kyseessä on pitkittynyt EV68:n aiheuttama infektio. [6; 94]

10.5 Enterovirusinfektioille alttiit lapset

Tutkimuksen lapset, joilla kaikilla on geneettinen alttius sairastua tyypin 1 diabetekseen, sairastivat keskimäärin yhdestä kahteen infektiota heidän seuranta-aikanaan, joka vaihteli kolmesta päivästä 11 kuukauteen (kohta 10.1). Rino/enterovirusinfektioihin lapset sairastuivat keskimäärin kerran seuranta-aikanaan. Taulukkoon 8 on koottu tutkimushenkilöiden sairastamien rino/enterovirusinfektioiden määrät. Lapsista 81 % sairasti vähintään yhden rino/enterovirusinfektion; heistä 63 % oli poikia. Vähintään kaksi rino/enterovirusinfektiota tänä aikana sairasti 32 % lapsista; heistä 76 % oli poikia. Lapsista 9 % sairasti kolme rino/enterovirusinfektiota ja heistä 60 % oli poikia. Yhdellä poikalapsella rino/enterovirusinfektioita havaittiin neljä. Hänen kohdallaan enterovirusta löydettiin uloste-näytteestä kahdessa eri infektiossa. Todellisuudessa sairastettujen rino/enterovirusinfektioiden määrä tämän pojan tapauksessa voi jäädä kahteen, sillä hänen epäillään sairastaneen pitkittynyt enterovirusinfektio (kohta 10.4). Koska tutkimushenkilöistä 64 % on poikia, tulokset viittaavat siihen, että tytöt ja pojat sairastuvat rino/enteroviruksen aiheuttamiin infektiioihin lähes yhtä suurella todennäköisyydellä ennestään sairastettujen rino/enterovirusinfektioiden lukumäärästä huolimatta.

Taulukko 8. Sairastettujen rino/enterovirusinfektioiden määrät lasta kohden.

Infektioiden määrä	Tytöillä	Pojilla	Yhteensä
Vähintään 1	16	27	43
Vähintään 2	4	13	17
Vähintään 3	2	3	5
4	-	1	1
Yhteensä	22	44	66

10.6 Työn onnistumisen arviointi ja jatkotutkimusehdotukset

Kun tutkimushenkilöiden sairastamien infektioiden lukumäärät laskettiin käyttäen kolmen kuukauden aikarajaa ja negatiivisia jaksoja tunnistettujen virusinfektioiden välillä, saatiin infektioiden kokonaismääräksi 83 infektiota. Infektion aiheuttajaksi 66 tapauksessa (80 %) löytyi rino/enterovirus. Kuitenkin vain yhdeksässä näistä rino/enterovirusinfektioista (14 %) onnistuttiin tyypittämään infektion aiheuttanut virus. Todellisuudessa infektioiden rajaamisessa käytetty kolmen kuukauden aikaraja on liian lyhyt, sillä enterovirusten aiheuttamat infektiot voivat kestää paljon pidempäänkin.

Koska ajanpuutteesta johtuen suurin osa näytteistä viljeltiin vain RD(A)-solulinjan soluihin, joissa poliovirusten, echovirusten ja osan coxsackie A-viruksista tiedetään kasvavan hyvin, osa näytteiden sisältämistä enteroviruksista, kuten osa coxsackie A-viruksista ja coxsackie B-virukset, on voinut jäädä tunnistamatta. Jos näytteet olisi istutettu alkuperäisten suunnitelmien mukaisesti myös HeLa-SOH- ja CaCo-2-solulinjan soluihin (kohta 9.4), enteroviruksia olisi voitu eristää ja tyypittää todennäköisesti enemmän.

Vaikka työssä käytetyn E.Z.N.A.[®] Total RNA -kitin (Omega Bio-Tek) pitäisikin soveltua RNA-eristykseen ilman solujen esihajotusta, infektoituneet soluviljelmät päätettiin syväjäädyttää kertaalleen ennen niille tehtävää RNA-eristystä. Näin tehtiin, jotta solut hajoaisivat helpommin ja vapauttaisivat ympäröivään nesteeseen enemmän viruksia. Ohjaaja Merja Roivaiselta saadun tiedon mukaan syväjäädytys olisi kuitenkin ollut syytä suorittaa kolme kertaa ennen RNA-eristystä, jotta solususpension solut hajoaisivat kunnolla. Tällä on merkitystä sellaisten näytteiden kohdalla, joissa solun sisäinen virusmäärä on hyvin pieni, jolloin talteen saatujen virusten määrä voi jäädä hyvinkin alhaiseksi. Tämän perusteellisen esihajotuksen puuttuminen voi siis osaltaan olla vaikuttanut siihen, että eristetyn viraalisen RNA:n ja täten tyypitettyjen virusten määrä jäi alhaiseksi.

Infektioiden rajaamisen kannalta olisi ollut tärkeää saada luettavaksi tutkimushenkilöiden vanhempien pitämä päiväkirja lasten oireista. Sen perusteella olisi myös saatu selville, mitkä lähetetyistä näytteistä ovat kuukausittaisia seurantanäytteitä (luku 7) eli näytteitä, joita ei ole otettu infektioepäilyn vuoksi. Näin olisi osattu jättää oikeat näytteet analysoimatta.

Oireluettelo olisi ollut avuksi myös epäselvissä tapauksissa, kuten epäiltäessä eräällä lapsella olevan pitkittynyt EV68-infektio.

Pojan, jolla epäiltiin olevan pitkittynyt EV68-infektio, analysoimatta jääneet yksi ulostenäyte ja kaksi nenäeritenäytettä olisi myös syytä analysoida. Näin saataisiin lisätietoa siitä, liittyykö hänellä havaittu toistaiseksi tuntemattoman enteroviruksen aiheuttama infektio hänen myöhemmin sairastamaansa EV68-infektioon. Hänen tapauksessaan tämän tuntemattoman enterovirusinfektion näytteille olisi syytä suorittaa nested-PCR (tulostentarkastelussa havaittiin myös toinen tuntematon enterovirusinfektio, jonka näytteille voisi tehdä saman). Samalla menetelmällä voitaisiin selvittää, mikä enterovirus esiintyy EV68-infektion aikaisessa ulostenäytteessä.

Jatkossa olisi myös syytä harkita rinovirusten geneettistä tyyppitystä niiden nenäeritenäytteiden kohdalla, jotka osoittautuivat positiivisiksi EV rRT-PCR:ssä ja HRV rRT-PCR:ssä. Näin saataisiin selville ainakin osassa tapauksista, kumpi (vai molemmat) infektiosta on todellinen.

11 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli selvittää, kuinka yleisiä ihmisen enterovirusinfektiot ovat tyypin 1 diabetekselle geneettisesti alttiilla lapsilla, ja miten näitä infektoita esiintyy eri ikäluokissa. Toisena tavoitteena oli löytää tutkimushenkilöiden keskuudesta infektioherkkiä lapsia ja lapsia, joilla enterovirusinfektiot olivat pitkittyneitä. Tarkoituksena oli myös tyyppittää geneettisesti kaikki potilasnäytteiden sisältämät infektiiviset enterovirusisolaatit.

Esikäsittelyn jälkeen nenäerite- ja ulostenäytteistä eristettiin RNA:t. Eristetyille RNA:ille suoritettiin enterovirusten reaaliaikainen RT-PCR, jonka avulla saatiin selville, mitkä potilasnäytteistä sisälsivät enteroviruksen genomia. Nenäeritenäytteille suoritettiin lisäksi rinovirusten reaaliaikainen RT-PCR mahdollisten rinovirusinfektioiden tunnistamiseksi. Enterovirusten suhteen positiiviset näytteet viljeltiin soluviljelmissä infektiivisten enterovi-

rusisolaattien eristämiseksi näytteestä. Niiden tyyppitys suoritettiin RT-PCR-menetelmällä ja enteroviruksen VP1-kapsidiproteiinin sekvensoinnilla.

Enteroviruspositiivisten ulostenäytteiden määrä jäi tutkimuksessa alhaiseksi. Suoliston enterovirusinfektioita havaittiin eniten loppukesästä. Nenäeritenäytteiden kohdalla havaittiin kaikkien enteroviruspositiivisten näytteiden olevan myös rinoviruspositiivisia, mikä vuoksi niitä ei tutkimuksessa voitu erottaa toisistaan tarkasteltaessa nenäeritenäytteissä esiintyneitä enterovirusia. Näiden rino/enterovirusten aiheuttamia infektioita havaittiin ympäri vuoden, mutta ne keskittyivät lähinnä kevääseen ja syksyyn. Tarkasteltaessa lasten sairastamia enterovirusinfektioita ikävaiheittain havaittiin, että suurin osa niistä oli sairastettu jo ennen 18 kuukauden ikää.

Tutkimushenkilöiden keskuudesta onnistuttiin löytämään yksi lapsi, jonka epäiltiin sairastaneen pitkittynyt EV68-infektio. Epäily syntyi hänen sairastettuaan lähekkäin kaksi eri infektiota, joista toinen jäi tunnistamatta. Myös hänen nenäeritenäytteensä olivat koko tämän puolen vuoden ajan rino/enteroviruspositiivisia. Samassa nousi epäily siitä, voisiko hengitystievirusena pidetty EV68 lisääntyä myös suolistossa. Tämän asian selviäminen antaisi arvokasta tietoa EV68:sta. Infektioherkkiä lapsia ei tutkimuslasten keskuudesta onnistuttu löytämään.

Tutkittavista näytteistä 13:sta onnistuttiin tyyppittämään infektion aiheuttanut virus. Määrä jäi hyvin alhaiseksi suhteessa enteroviruspositiivisten näytteiden määrään. Syitä siihen voivat olla mm. viruseristyksen suorittaminen vain yhdellä solulinjalla ja perusteellisen syväjäädätyksen laiminlyönti ennen solususpensiolle tehtyä RNA-eristystä. Ulostenäytteistä löytyneet virukset olivat CVA5 ja CVA2, kun taas nenäeritenäytteistä eritettyjä olivat EV68, HRV49 ja CVA5. Nämä tulokset ovat hyödyksi kartoitettaessa geneettisesti tyyppin 1 diabetekselle alttiiden lasten sairastamia enterovirusinfektioita ennen heidän mahdollista sairastumistaan tyyppin 1 diabetekseen. Tulokset ovat osa isompaa tutkimusta (INDIS), jonka tavoitteena on löytämään uusia keinoja diabeteksen ehkäisemiseksi.

Työssä onnistuttiin paljastamaan myös se, että tällä hetkellä käytetyt rinovirusten ja enterovirusten tunnistusmenetelmät eivät ole tarpeeksi spesifisiä pystyäkseen erottamaan tau-

dinaiheuttajat toisistaan niiden esiintyessä samassa näytteessä. Kaiken kaikkiaan työllä onnistuttiin herättämään ajatuksia menetelmien parantamiseksi, ja se antoi lisää tietoa huonosti tunnetusta EV68:sta.

Lähteet

1. Racaniello V. R. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. Teoksessa *Fields Virology*, osa 1. 4. painos. Knipe D. M. ja Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007, s. 795-830.
2. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Stopflunssa – tietoistu 10. Verkkodokumentti. <<http://www.ktl.fi/attachments/vimo/tammikuu10.pdf>>. Tammikuu 2010. Luettu 19.11.2010.
3. Picornavirus Home. Verkkodokumentti. <<http://www.picornaviridae.com/>>. Luettu 30.11.2010.
4. Bamford, Dennis; Hyypiä, Timo ja Saksela, Kalle. Virusten yleiset ominaisuudet, rakenne ja luokittelu. Teoksessa *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. 1. painos. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti ym. Jyväskylä: WS Bookwell Oy. 2010.
5. Roivainen, Merja; Hyypiä, Timo ja Ruuskanen, Olli. Pikornavirukset. Teoksessa *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. 1. painos. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti ym. Jyväskylä: WS Bookwell Oy. 2010.
6. Pallansch M. ja Roos R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. Teoksessa *Fields Virology*, osa 1. 4. painos. Knipe D. M. ja Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007, s. 840–884.
7. Rossmann M. G., He Y. ja Kuhn R. J. Picornavirus-receptor interactions. *Trends in Microbiology*. 2002.
8. Horstman D. M. Poliomyelitis: Severity and type of disease in different age groups. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1955.
9. Morens D. M. ja Pallansch M. A. *Epidemiology*. Teoksessa *Human Enterovirus Infections*. Washington DC: ASM Press: s. 3–23. 1995.
10. Oberste M. S., Maher K., Williams A. J., Dybdahl-Sissoko N., Brown B. A., Gookin M. S., Peñaranda S., Mishrik N., Uddin M. ja Pallansch M. A. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *The Journal of General Virology*. 2006.
11. Bilbe J. M., Pantelidis P., Chan P. K., Tong C. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Reviews in Medical Virology*. 2007.
12. Stanway G., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypiä T., King A. M. Q., Knowles N. J., Lemon S. M., Minor P. D., Pallansch M. A., Palmenberg A. C. ja Skern T. Family Picornaviridae. Teoksessa *Virus Taxonomy*. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Lontoo: Elsevier Academic Press. 2005, s. 757–778.

13. Oberste M. S., Maher K., Michele S. M., Belliot G., Uddin M. ja Pallansch M. A. Enterovirus 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *The Journal of General Virology*. 2005.
14. Oberste M. S., Maher K., Nix W. A., Michele S. M., Uddin M., Schnurr D., Al-Busaidy S., Akoua-Koffi C. ja Pallansch M. A. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B. *Virus Research*. 2007.
15. Smura T., Blomqvist S., Paananen A., Vuorinen T., Sobotová Z., Bubovica V., Ivanova O., Hovi T. ja Roivainen M. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution. *The Journal of General Virology*. 2007.
16. Jartti T., Lehtinen P., Vuorinen T., Koskenvuo M. ja Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *Journal of Medical Virology*. 2004.
17. Keen, Anthony. Enteroviruses. Verkkodokumentti.
<<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/jmoodie/entero2.html#CLINICAL%20SYNDROMES>>.
Luettu 9.11.2010.
18. Mäkelä M. J., Puhakka T., Ruuskanen O., Leinonen M., Saikku P., Kimpimäki M., Blomqvist S., Hyypiä T. ja Arstila P. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998.
19. Palmenberg A. C., Spiro D., Kuzmickas R., Wang S., Djikeng A., Rathe J. A., Fraser-Liggett C. M. ja Liggett S. B. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveals structure and evolution. *Science*. 2009.
20. Turner R. B. ja Couch R. B. Rhinoviruses. *Teoksessa Fields Virology*, osa 1. 4. painos. Knipe D. M. ja Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007, s. 895–906.
21. Lee W. M., Klesner C., Pappas T., Lee I., Grindle K., Jartti T., Jakiela B., Lemanske R. F. Jr., Shult P. A. ja Gern J. E. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses and common causes of respiratory illnesses in infants. *Plos one*. 2007.
22. Peltola, Ville. Lasten rinovirusinfektio. *Suomen Lääkärilehti* 46/2009.
23. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A. ja Pallansch M. A. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999.
24. Peltola V., Waris M., Österback R., Susi P., Ruuskanen O. ja Hyypiä T. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008.

25. Evans D. J. ja Almond J. W. Cell receptors for picornaviruses and determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 1998.
26. Hyypiä, Timo; Roivainen, Merja ja Hovi, Tapani. Virusreseptorit. *Duodecim*. 1997.
27. Urquhart G. E. ja Stott E. J. Rhinoviraemia. *British Medical Journal*. 1970.
28. Juhela S., Hyöty H., Lönnrot M., Roivainen M., Simell O. ja Ilonen J. Enterovirus Infections and enterovirus specific T-cell responses in infancy. *Journal of Medical Virology*. 1998.
29. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2009. Enteroviruseristys -menetelmäohje, versio 7.0.
30. Cordit R. C. Principles of Virology. Teoksessa *Fields Virology*, osa 1. 4. painos. Knipe D. M. ja Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007, s. 25–55.
31. Hukkanen, Veijo; Saksela, Kalle ja Hyöty, Heikki. Virusinfektioiden patogeneesi. Teoksessa *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. 1. painos. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti ym. Jyväskylä: WS Bookwell Oy. 2010.
32. Peltola, Ville. Enterovirusinfektiot Suomessa ja muualla maailmassa. *Duodecim*. 2008.
33. Hendley J. O., Wenzel R. P. ja Gwaltney J. M. Jr. Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. *The New England Journal of Medicine*. 1973.
34. Savolainen-Kopra, Carita. *Molecular Epidemiology of Human Rhinoviruses*. Helsinki: Kansanterveyslaitos A2/2006. 2006.
35. Hovi T., Stenvik M. ja Rosenlew M. Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiology and Infection*. 1996.
36. Savolainen C., Mulders M. N. ja Hovi T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. *Virus Research*. 2002.
37. Blomqvist S., Roivainen M., Puhakka T., Kleemola M. ja Hovi T. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *Journal of Medical Virology*. 2002.
38. Douglas R. G. J., Lindgren K. M. ja Couch R. D. Exposure to cold environment and rhinovirus common cold: Failure to demonstrate effect. *The New England Journal of Medicine*. 1968.
39. Takkouche B., Regueira C. ja Gestal-Otero J. J. A cohort study of stress and the common cold. *Epidemiology*. 2001.
40. Jenista J. A., Powell K. R. ja Menegeus M. A. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *The Journal of Pediatrics*. 1984.

41. Roivainen M. Enteroviruses: New findings on the role of enteroviruses in type 1 diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006.
42. Juvén T., Mertsola J., Waris M., Leinonen M., Meurman O, Roivainen M., Eskola J., Saikku P. ja Ruuskanen O. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2000.
43. Juvén T., Mertsola J., Waris M., Leinonen M., Ruuskanen O. Clinical response to antibiotic therapy for community-acquired pneumonia. *European Journal of Pediatrics*. 2004.
44. Salminen, Kimmo. Enteroviruses and type 1 diabetes: Evaluation in Finnish Prospective Series. Turku: Turun yliopiston julkaisuja. 2003.
45. Diabetes, tyyppi 1. Verkkodokumentti.
<<http://www.poliklinikka.fi/?page=1152604&id=1826400>>. Luettu 14.12.2010.
46. Uusitupa, Matti. Diabetes. Verkkodokumentti.
<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=seh00045>. Luettu 14.12.2010.
47. Reijonen H., Ilonen J. ja Knip M. Geenien osuus tyypin 1 diabeteksessä. *Duodecim*. 1994.
48. Åkerblom Hans. Voidaanko tyypin 1 diabeteksen syntyminen estää?. *Duodecim*. 1994.
49. Diabetes (sokeritauti). Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Verkkodokumentti.
<http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/vimo/tutkimus-_ja_seurantakohteet/diabetes__sokeritauti_>. Luettu 14.12.2010.
50. Jun H.-S. ja Yoon J.-W. A New Look at Viruses in Type 1 Diabetes. *Diabetes / Metabolism Research and Reviews*. 2003.
51. Haapaniemi, Teppo. Enterovirusten detektio haimakudoksesta *in situ* –hybridisaatiolla ja immunofluoresenssiin perustuvalla kaksoisvärjäysmenetelmällä. Jyväskylän yliopisto: Pro Gradu. 2010.
52. Hiltunen M. ja Hyöty H. Virukset yhä syyllisempiä nuoruustyyppin diabetekseen. *Kansanterveys* 7/1996.
53. Karvonen M., Viik-Kajander M., Moltchanova E., Libman I., LaPorte R. ja Tuomilehto J. Incidence of Childhood Type 1 Diabetes Worldwide. *Diabetes Care*. 2000.
54. Knip Mikael. Onko tyypin 1 diabetes autoimmuunisairaus ja voidaanko sen kehittymistä estää?. *Duodecim*. 2004.
55. Åkerblom Hans. Voidaanko tyypin 1 diabeteksen syntyminen estää?. *Duodecim*. 1994.

56. Atkinson M. A. ja Eisenbarth G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001.
57. Kondrashova Anita. Epidemiology and risk markers of autoimmune diseases in Russian Karelia and in Finland. Tampere University Press. 2009.
58. Kulmala P., Savola K., Petersen J. S., Vähäsalo P., Karjalainen J., Löppönen T., Dyrberg T., Åkerblom H. K. ja Knip M. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998.
59. Kimpimäki T., Kupila A., Hämäläinen A.-M., Kukko M., Kulmala P., Savola K., Simell T., Keskinen P., Ilonen J., Simell O. ja Knip M. The first signs of β -cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: The Finnish Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001.
60. Kupila A., Muona P., Simell T., Arvilommi P., Savolainen H., Hämäläinen A.-M., Korhonen S., Kimpimäki T., Sjööros M., Ilonen J., Knip M. ja Simell O. Feasibility of genetic and immunological prediction of Type 1 diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia*. 2001.
61. Buzzetti R., Quattrocchi C. C. ja Nisticò L. Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes / Metabolism Reviews*. 1998.
62. Olmos P., A'Hern R., Heaton D. A., Millward B. A., Risley D., Pyke D. A. ja Leslie R. D. G. The significance of the concordance rate for Type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia*. 1988.
63. Hyöty H. ja Virtanen S. M. Miksi tyypin 1 diabeteksen ilmaantuvuus on kasvanut Suomessa toisen maailmansodan jälkeen. *Duodecim*. 2004.
64. Kumar D., Gemayel N. S., Deapen D., Kapadia D., Yamashita P. H., Lee M., Dwyer J. H., Roy-Burman P., Bray G. A. ja Mack T. M. North-American twins with IDDM - genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in 1st twin. *Diabetes*. 1993.
65. Elliott R. B. Epidemiology of diabetes in Polynesia and New Zealand. Teoksessa *Epidemiology and etiology of insulin-dependent diabetes mellitus in the young*. Levy-Marchal C. ja Czernichow P. Basel: Karger. 1992, s. 66-71.
66. Virtanen S. M. ja Knip M. Nutritional risk predictors of b cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *American Society for Clinical Nutrition*. 2003.
67. Hyöty H. ja Taylor K. W. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*. 2002.
68. Hyöty H. Enterovirukset diabeteksen aiheuttajia?. *Duodecim*. 1996.

69. Tauriainen S., Salminen K. ja Hyöty H. Can Enteroviruses Cause Type 1 Diabetes?. New York Academy of Sciences. 2003.
70. Salminen K. K., Vuorinen T., Oikarinen S., Helminen M., Simell S., Knip M., Ilonen J., Simell O. ja Hyöty H. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. Diabetic Medicine. 2004.
71. Ylipaasto P., Klingel K., Lindberg A. M., Otonkoski T., Kandolf R., Hovi T. ja Roivainen M. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. Diabetologia. 2004.
72. Yoon J.-W., Austin M., Onodera T. ja Notkins L. Virus-Induced Diabetes Mellitus - Isolation of a Virus from the Pancreas of a Child with Diabetic Ketoacidosis. The New England Journal of Medicine. 1979.
73. Cabrera-Rode E., Sarmiento L., Molina G., Pérez C, Arranz C., Galvan J.A., Prieto M., Barrios J., Palomera R., Fonseca M., Mas P., Díaz-Díaz O. ja Díaz-Horta O. Islet cell related antibodies and type 1 diabetes associated with echovirus 30 epidemic: a case report. Journal of Medical Virology. 2005.
74. INDIS-tutkimus. Verkkodokumentti.
<<http://research.utu.fi/dipp/index.php?mid=252&language=fi>>. Luettu 15.11.2010.
75. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2010. Ulostenäytteen esikäsittely -menetelmäohje versio 5.0.
76. Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. Verkkodokumentti. Solunetti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/>. Luettu 21.7.2010.
77. E.Z.N.A.® Total RNA Kit I. Ohjekirja. Omega Bio-Tek. 2009.
78. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2008. Enterovirusten real-time RT-PCR -menetelmäohje.
79. QuantiTect® Probe RT-PCR. Ohjekirja. Qiagen. 01/2008
80. Xiaoyan L., Holloway B., Dare R. K., Kuypers J., Yagi S., Williams J. V., Hall G. B. ja Erdman D. D. Real-time RT-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. Journal of Clinical Microbiology. 2008.
81. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2010. Rinovirusten reaaliaikainen RT-PCR -menetelmäohje.
82. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. 2009. Enteroviruseristys-menetelmäohje versio 7.0.
83. Mycostatin. Verkkodokumentti. <<http://www.tohtori.fi/laakeopas/laake/11880-MYCOSTATIN>>. Luettu 1.12.2010.

84. Oberste M. S., Nix W. A., Maher K. ja Pallansch M. A. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 2003.
85. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2010. Käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktio (RT-PCR) -menetelmäohje, versio 4.0.
86. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2009. EtBr:a sisältävän agaroosigeelin elektroforeesi -menetelmäohje, versio 4.0.
87. Nukleiinihappojen geelielektroforeesi. Verkkodokumentti. Solunetti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_geelielektroforeesi/2/>. Luettu 14.11.2010.
88. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2009. PCR-tuotteen visualisointi Elchrom-geelien avulla ja suora sekvensointi ilman puhdistusta -menetelmäohje, versio 3.0.
89. Sekvensointi. Verkkodokumentti. Solunetti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sekvensointi/2/>>. Luettu 14.12.2010.
90. Oikarinen S., Martiskainen M., Tauriainen S., Huhtala H., Ilonen J., Veijola R., Simell O., Knip M. ja Hyöty H. Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011.
91. Sadeharju K., Hämäläinen A.-M., Knip M., Lönnrot M., Koskela P., Virtanen S. M., Ilonen J., Åkerblom H. K. ja Hyöty H. Enterovirus infections as a risk factor for type 1 diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003.
92. Roux Kenneth H. Optimization and Troubleshooting in PCR. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Genome Research. 1995.
93. Skarsvik S., Puranen J., Honkanen J., Roivainen M., Ilonen J., Holmberg H., Ludvigsson J. ja Vaarala O. Decreased In Vitro Type 1 Immune Response Against Coxsackie Virus B4 in Children With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2006.
94. Smura T., Ylipaasto P., Klemola P., Kaijalainen S., Kyllönen L., Sordi V., Piemonti L. ja Roivainen M. Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro: implications for pathogenesis. *Journal of Medical Virology*. 2010.

Liitteet

Liite 1: Enteroviruslajit ja niiden alaiset serotyypit

Taulukko 1. Enteroviruslajit ja niiden alaiset serotyypit

Laji (serotyyppien lukumäärä)	Serotyypit
HEV-A (21)	Ihmisen coxsackievirukset (CV): A2–A8, A10, A12, A14, A16 Ihmisen enterovirukset (EV): 71, 76, 89, 90, 91 Apinan enterovirukset: EV92, SV19, -43, -46, A13
HEV-B (59)	Ihmisen coxsackievirukset (CV): B1–B6, -A9 Ihmisen echovirukset (E): 1–7, 9, 11–21, 24–27, 29–33 Ihmisen enterovirukset (EV): 69, 73–75, 77–88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107 Apinan enterovirus SA5
HEV-C (19)	Ihmisen poliovirukset (PV): 1–3 Ihmisen coxsackievirukset (CV): A1, A11, A13, A17, A19–A22, A24 Ihmisen enterovirukset (EV): 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109
HEV-D (3)	Ihmisen enterovirukset (EV): 68, 70, 94
HRV-A (75)	Ihmisen rinovirukset (HRV): 1, 2, 7–13, 15, 16, 18–25, 28–34, 36, 38, 39–41, 43–47, 49–51, 53–68, 71, 73–78, 80–82, 85, 88–90, 94–96, 98, 100, A101
HRV-B (25)	Ihmisen rinovirukset (HRV): 3–6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91–93, 97, 99
HRV-C	HRV-A:sta ja HRV-B:stä eroavat rinovirukset
Apinan enterovirus A (4)*	Apinan enterovirukset: SV4, SV28, SA4, A-2 plaque virus
Naudan enterovirus (2)	Naudan enterovirukset (BEV): 1, 2
Sian enterovirus B (2)	Sian enterovirukset (PEV): 9, 10

* Virusten molekulaariset samankaltaisuudet viittaisivat siihen, että nämä neljä virusta kuuluisivat kaikki apinan enterovirus A1 (SEV-A1) -serotyyppiin. [3]

Liite 2: Infektiot taulukoituina

Taulukko 2. EV rRT-PCR:ssä positiivisten ulostenäytteiden ja infektioiden määrät:

Kuukausi	Positiivinen ulostenäyte	Infektioita yhteensä
Joulukuu 2009	2	1
Maaliskuu 2010	1	1
Toukokuu 2010	1	1
Heinäkuu 2010	1	1
Elokuu 2010	6	4
Syyskuu 2010	1	-

Taulukko 3. EV rRT-PCR:ssä positiivisten nenäeritenäytteiden ja infektioiden määrät:

Kuukausi	Positiivinen nenäeritenäyte	Infektioita tytöillä	Infektioita pojilla	Infektioita yhteensä
Marraskuu 2009	2	1	1	2
Joulukuu 2010	1	-	1	1
Maaliskuu 2010	3	1	2	3
Huhtikuu 2010	6	3	3	6
Toukokuu 2010	6	1	4	5
Kesäkuu 2010	1	1	-	1
Heinäkuu 2010	1	-	1	1
Elokuu 2010	8	3	4	7
Syyskuu 2010	2	-	2	2
yhteensä	30	10	18	28

Taulukko 4. HRV rRT-PCR:ssä positiiviset nenäeritenäytteet ja yksittäiset infektiot taulukoituina:

Kuukausi	Positiivinen nenäeritenäyte	Infektioita tytöillä	Infektioita pojilla	Infektioita yhteensä
Lokakuu 2009	1	-	1	1
Marraskuu 2009	5	1	1	2
Joulukuu 2009	3	-	1	1
Tammikuu 2010	4	1	3	4
Helmikuu 2010	4	1	3	4
Maaliskuu 2010	9	4	2	6
Huhtikuu 2010	16	6	9	15
Toukokuu 2010	18	2	7	9
Kesäkuu 2010	5	1	2	3
Heinäkuu 2010	3	-	1	1
Elokuu 2010	14	4	8	12
Syyskuu 2010	7	2	4	6
yhteensä	89	22	42	64

Liite 3: Tyypitystulokset

Taulukko 5. Oberste-A-RT-PCR:ssä positiiviset näytteet ja niistä tyypitetyt virukset. Näytteenottoikä on ilmaistu vuosina (v) ja kuukausina (kk).

Sukupuoli	Näyte	Näytteenottopäivämäärä	Näytteenottoikä	Tyypitetty virus	Viruslaji
P	U174	22.7.2010	3 v 5 kk	CVA5	HEV-A
P	U178	15.8.2010	3 v 6 kk	CVA5	HEV-A
P	U179	11.8.2010	1 v	CVA2	HEV-A
P	U183	24.8.2010	1 v	CVA5	HEV-A
P	U191	29.8.2010	3 v 7 kk	CVA5	HEV-A
P	U193	01.9.2010	1 v	CVA5	HEV-A
P	N94	18.3.2010	9 kk	EV68	HEV-D
P	N112	11.4.2010	9 kk	HRV49	HRV-A
T	N114	12.4.2010	1 v 3 kk	HRV49	HRV-A
P	N174	22.7.2010	3 v 5 kk	CVA5	HEV-A
P	N177	16.8.2010	1 v 5 kk	EV68	HEV-D
T	N188	26.8.2010	3 v 6 kk	EV68	HEV-D
P	N192	30.8.2010	9 kk	EV68	HEV-D

Lyhenteet: P = poika, T = tyttö, U = ulostenäyte, N = nenäeritenäyte

Liite 4: Pitkittyneen EV68-infektioepäilyn näytteet

Taulukko 6. Näytteiden analysointitiedot ja näytteenottopäivämäärät erään enteroviruspositiivisen pojan tapauksessa. Kursivoidut harmaalla merkityt näytteet on jätetty analysoimatta. EV rRT-PCR:n Ct-arvoa tarkastellaan välillä 0–40 ja HRV rRT-PCR:n välillä 0–45.

Ulostenäyte	Nenäeritenäyte	Näytteenotto- päivämäärä	EV rRT-PCR (uloste)	EV rRT-PCR (nenäerite)	HRV rRT-PCR (nenäerite)
1.	1.	17.12.2009	39,27	33,99	21,03
2.	2.	19.12.2009	37,52	-	37,16
3.	3.	21.12.2009	-		
4.	4.	29.12.2009			
5.	5.	25.1.2010	-	-	33,32
6.	6.	18.3.2010	38,60	27,84 *	25,80
7.	7.	27.4.2010	-	-	40,80
8.	8.	18.5.2010	-	-	39,81
9.	9.	27.6.2010	-	-	36,93

* Näytteestä tyypitettiin EV68

Liite 5: Käytetyt reagenssit

LATU:n reagenssit

Alla on lueteltu työssä käytettyjen LATU:sta tilattujen luosten koostumukset. Puhdistettu vesi, jota on käytetty kyseisten liuosten laimentamiseen, on ultrapurea- ja pyrogeenivaapaata ja valmistettu Milliporeen laitteella. Vesi testataan säännöllisesti.

PBS (Ca + Mg)

NaCl	MERCK	8 g
KCl	MERCK	0,2 g
Di-sodiumhydrogenphosphate dihydrate	MERCK	1,4 g
Potassiumdihydrogen phosphate	MERCK	0,2 g
Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂ * 6 H ₂ O)	MERCK	0,100 g
Calcium chloride dihydrate (CaCl ₂ * 2 H ₂ O)	MERCK	0,132 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

PeStG, 50 mg / ml

Geepenil 6,06 g (Benzylpenicillin. Natr.)	Orion	6,06 g
Streptomycin sulfate	SIGMA	10 g
Gentamicin sulfate	SIGMA	5 g
Puhdistettu vesi		Ad 100 ml

Mykostaatiini

Nystatin (Mycostatin)	SIGMA	8,2237 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

Eagle's MEM, 1,1 g / l

MEM + Earle's + L-Glutamine – NaHCO ₃	GIBCO	9,53 g
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	MERCK	1,1 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

Hepes, 1 M, pH 7,4

N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N ⁺ -(2-ethanesulfonic acid) (HEPES)	SIGMA	238,300 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

MgCl₂, 1M

Magnesium chloride (MgCl ₂ * 6 H ₂ O)	MERCK	203,31 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

DEPC-H₂O

Diethylpyrocarbonate	SIGMA	0,5 ml
Etanoli, 96 %	BERNER	50,0 ml
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

10 x RT / PCR puskuri

Tris ultrapure	MP(ICN)	81,1638 g
Ammonium sulfate	MERCK	22,4638 g
Titriplex III	MERCK	0,0223 g
Diethylpyrocarbonate	SIGMA	0,5 ml
Etanoli, 96 %	BERNER	50,0 ml
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

dNTP-seos, 2 mM

dATP, Na-salt, PCR grade (100 mM, pH 8,3)	BOEHRINGER MANNHEIM	20 ml
dCTP, Na-salt, PCR grade (100 mM, pH 8,3)	BOEHRINGER MANNHEIM	20 ml
dGTP, Na-salt, PCR grade (100 mM, pH 8,3)	BOEHRINGER MANNHEIM	20 ml
dTTP, Na-salt, PCR grade (100 mM, pH 8,3)	BOEHRINGER MANNHEIM	20 ml
Puhdistettu vesi		Ad 920 ml

10 x TBE-puskuri

Boric acid	MERCK	61,83 g
Tris Ultra Pure	MP (ICN)	121,1 g
Ethylenedinitrilo tetraacetic acid, disodium salt dihydrate (TITRIplex III) (EDTA)	MERCK	7,44 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

5 x DNA-näytepuskuri (5 x DNA-loading buffer)

Bromphenol blue sodium salt	SIGMA	1,25 g
Xylene cyanole	FLUKA	1,25 g
Ficol 400	CHROMA-GESELLSCHAFT	125 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

50 x TAE-puskuri

Acetic acid, 100 %	MERCK	57,1 g
Tris ultra pure	MP (ICN)	242 g
Titriplex III	MERCK	18,61 g
NaOH	MERCK	1,5 g
Puhdistettu vesi		Ad 1000 ml

Muut reagenssit

Reagenssi:

Valmistaja:

Kloroformi	Merck
β -merkaptetaanoli	Fluka Biochemica
Absolutoitu etanoli (99,5 p-%)	Berner
Alukkeet ja koettimet	DNA Technology A/S ja Exicon A/S
Etidiumbromidi	Continental Laboratory Products Ltd
Generuler 100 bp DNA ladder	Fermentas
E.Z.N.A. [®] Total RNA –kitti	Omega Bio-Tek
SuperScript [™] III Platinum [®] One-Step Quantitative RT-PCR System –kitti	Invitrogen
QIAGEN [®] QuantiTect [™] Probe RT-PCR –kitti	Qiagen