

Essi Kuitunen

Pan-paramyxovirus RT-PCR:n pystytys ja käyttö linnuista peräisin olevissa näytteissä

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
2.11.2015

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Essi Kuitunen Pan-paramyoksvirus RT-PCR:n pystytys ja käyttö linnuista peräisin olevissa näytteissä 42 sivua + 1 liite 2.11.2015
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Erikoistutkija, jaostopäällikkö Anita Huovilainen Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia ja testata tieteellisessä julkaisussa esitellyn lintujen paramyoksvirusten serotyypit 1-9 sekä metapneumovirusalatyyppit A, B ja C havaitsevan pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmän toimivuutta. Työ tehtiin Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä, missä menetelmä haluttiin ottaa käyttöön.</p> <p>Testaamisessa käytettiin positiivisia kontrollinäytteitä sekä 61 vesilintunäytteen otosta. Evirassa oli jo käytössä real-time RT-PCR -menetelmä APMV-1:n toteamiseksi. Myös tällä menetelmällä tutkittiin vesilintunäytteet. PCR-ajojen lisäksi työssä hyödynnettiin viruseristystä hedelmöitettyissä kananmunissa, hemagglutinaatiotestiä ja sekvensoimista.</p> <p>Lähes kaikki positiiviset kontrollit onnistuttiin monistamaan pan-paramyoksvirus RT-PCR-ajossa. Poikkeuksena olivat APMV-4- sekä NDV-positiivinen kontrollinäyte. Syynä oli mahdollisesti virus-stokin inaktivaatiomenetelmä, joka saattoi inhiboida PCR-reaktiota. APMV-4-positiivisen kontrollin sekvenssi erosi kolmen peräkkäisen nukleotidin verran toisen käytettävän alukkeiden sekvenssistä, mikä saattoi myös vaikuttaa monistumisen epäonnistumiseen.</p> <p>Pan-paramyoksvirus RT-PCR -menetelmän etuna oli, että positiivisista näytteistä pystyttiin sekvensoimalla selvittämään, mitä paramyoksvirusta ne sisälsivät. Sekvensoiminen osoittautui kuitenkin haastavaksi, koska monistettavan alueen pituus oli vain 70 nukleotidia. Lisäksi käytettävien alukkeiden nukleotideista noin kolmannes oli vaihtelevia emäksiä, mikä saattoi osaltaan vaikuttaa sekvensoimisen onnistumiseen. Sen vuoksi saatiin hyvin lyhyitä pätkiä sekvenssiä, jota voitiin verrata sekvenssietokantaan.</p> <p>Pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmä täydentää kuitenkin hyvin Eviran eläintautivirologian tutkimusosaston APMV-diagnostiikkaa. Se mahdollistaa APMV-1:n lisäksi muidenkin APMV-tyyppien toteamisen siipikarjan ja luonnonlintujen näytteistä. Menetelmällä positiivisiksi saadut näytteet vaativat jatkotutkimuksia todellisen APMV-tyypin selvittämiseksi. Tässä voidaan hyödyntää serotyypispesifeillä alukkeilla tehtävää RT-PCR:ää ja sekvensointia.</p>	
Avainsanat	lintujen paramyoksvirus, serotyyppi, pan-paramyoksvirus RT-PCR, sekvensointi, degeneroitu alue

Author Title Number of Pages Date	Essi Kuitunen Pan-paramyxovirus RT-PCR set-up for diagnosis of paramyxoviruses in bird samples 42 pages + 1 appendix 2 November 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructors	Anita Huovilainen, Senior Researcher, Head of Section Jarmo Palm, Senior Lecturer, Head of Degree Programme
<p>The aim of this thesis was to examine the applicability of a pan-paramyxovirus RT-PCR method to identifying all avian paramyxovirus serotypes 1-9 and metapneumovirus subtypes A, B and C. The research was done at the Finnish Food Safety Authority Evira. There was already a RT-PCR method for screening APMV-1 in use at Evira.</p> <p>Positive control samples and a group of 61 waterfowl samples were utilized to determine the applicability of the method. In addition to PCR, techniques such as virus isolation in embryonated eggs, hemagglutination test and sequencing were used for this study.</p> <p>APMV-4- and NDV-positive control samples were unsuccessfully amplified in a round of pan-paramyxovirus RT-PCR. This was probably due to the inactivation procedure of the viral stock sample that interfered with the experiment. Furthermore, the APMV-4 control sample had a three consecutive base difference to one of the primers.</p> <p>An advantage of the method was that the positive samples could be sequenced to identify a specific type of paramyxovirus. This, however, turned out to be challenging. The amplicon size was far too short with only 70 nucleotides and the primers were degenerate. For these reasons, the sequence was of low quality and only very short pieces of it could be compared to a sequence database.</p> <p>Nevertheless, the pan-paramyxovirus RT-PCR method enables the detection of other APMV-types than just APMV-1 in poultry and wild bird samples. Serotype specific primers can be utilized in RT-PCR and sequencing to confirm a specific serotype after screening the samples with pan-paramyxovirus RT-PCR.</p>	
Keywords	Avian paramyxovirus, serotype, pan-paramyxovirus RT-PCR, sequencing, degenerated primer

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Paramyksenovirukset	1
2.1	Luokittelu	2
2.1.1	Lintujen paramyksenovirukset	2
2.1.2	Lintujen metapneumovirukset	4
2.2	Rakenne ja genomi	5
2.3	Lisääntyminen	7
2.4	Diagnostiikka	7
2.4.1	RT-PCR	8
2.4.2	Hedelmöitettyjen kananmunien infektointi	8
2.4.3	Hemagglutinaatiotesti	9
2.4.4	Sekvensointi	10
3	Pan-paramyksenovirus RT-PCR	12
4	Materiaalit ja työn suoritus	13
4.1	Näytteet ja kontrollinäytteet	15
4.2	Virus-RNA:n eristys	16
4.2.1	QIAamp-minipylväät	16
4.2.2	QIAcube-laite	17
4.3	APMV-1 real-time-RT-PCR ja -RT-PCR	18
4.4	Hedelmöitettyjen kananmunien infektointi	19
4.5	Hemagglutinaatiotesti	20
4.6	Pan-paramyksenovirus RT-PCR	21
4.7	Sekvensointi	22
5	Tulokset	24
5.1	APMV-1 real-time-RT-PCR ja RT-PCR	25
5.2	Pan-paramyksenovirus RT-PCR	26
6	Päätelmät	37
	Lähteet	40
	Liitteet	

Liite 1. Laitteet ja reagenssit

Lyhenteet

AMPV	<i>Avian metapneumovirus</i> . Lintujen metapneumovirus, viruksesta on käytetty myös nimityksiä <i>turkey rhinotracheitis virus</i> (TRTV) sekä <i>avian pneumovirus</i> (APV).
APMV	<i>Avian paramyxovirus</i> . Lintujen paramyksenovirus.
BLAST	<i>Basic Local Alignment Tool</i> . Algoritmi, jonka avulla voidaan verrata sekvenssejä toisiinsa.
bp	<i>Base pair</i> . Emäspari.
cDNA	<i>Complementary DNA</i> . Komplementaarinen DNA.
Ct-arvo	<i>Cycle threshold</i> . Sykliä määrä, minkä kohdalla fluoresenssin signaali ylittää kynnyksen real-time PCR -ajossa.
ddNTP	Dideoksinukleotidi. Nukleotidi, jossa deoksiriboosi on korvattu dideoksiriboosilla, minkä vuoksi DNA-synteesin jatkumiseen tarvittava 3'-hydroksyyli-ryhmä puuttuu.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> . Deoksiribonukleiinihappo.
dNTP	Nukleotidi.
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> . Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.
HA-testi	Hemagglutinaatiotesti.
HI-testi	Hemagglutinaatioinhibiitiotesti.
ICPI	<i>Intracerebral Pathogenicity Index</i> . Aivojen sisäinen patogeenisuusindeksi.

NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information.</i> Yhdysvaltalainen bioinformatiikan keskus, jonka internet-sivustolla on saatavilla useita bioteknologian tietokantoja.
NDV	<i>Newcastle disease virus.</i> Newcastlen tautia aiheuttava virus.
NDVH	Newcastlen tautiviruksen pääasiassa villilinnuista eristettäviä matalapatogeenisiä kantoja.
PBS	<i>Phosphate-buffered saline.</i> Fosforilla puskuroitu keittosuolaliuos.
PCR	<i>Polymerase chain reaction.</i> Polymeerasiketjureaktio.
PLOS ONE	Public Library of Science. Yhdysvaltalainen vertaisarvioitu tiedejulkaisu, joka on luettavissa internetissä ilmaiseksi.
RDRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase.</i> RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi.
RNA	<i>Ribonucleic acid.</i> Ribonukleiinihappo.
RT	<i>Room temperature.</i> Huoneenlämpö.
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction.</i> Käänteiskopiointi polymeerasiketjureaktio.
SHS	<i>Swollen head syndrome.</i> Kanoilla esiintyvä tauti, jonka oireena on pään turpoaminen.
SPF-munat	<i>Specific pathogen-free.</i> Munia, joista on todettu, ettei niissä ole tiettyä patogeeniä.
ssRNA	<i>Single-stranded RNA.</i> Yksijuosteinen RNA.

1 Johdanto

Opinnäytetyö on tehty Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) eläintautivirologian tutkimusyksikössä. Vuonna 2006 Elintarvikevirasto, Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos sekä Kasvintuotannon tarkastuskeskus yhdistettiin yhdeksi virastoksi, Eviraksi. Evira valvoo elintarvikkeiden turvallisuuden ja laadun lisäksi eläinten terveyttä. Tutkimus- ja laboratorio-osaston vastuualueeseen kuuluvat eläintauteihin, elintarvikkeisiin, kasvinterveyteen sekä rehu- ja lannoitevalvontaan liittyvä analytiikka ja diagnostiikka. Finnish Accreditation Service (FINAS) on myöntänyt tutkimus- ja laboratorio-osastolle akkreditointipäätöksen.

Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä tehdään eläintautien laboriodiagnostiikkaa, joka tukee tieteellistä tutkimusta ja muita asiantuntijatehtäviä. Suuri osa tutkimuksista liittyy tuotanto- ja harraste-eläinten viralliseen tautivalvontaan. Sen ohella tutkitaan myös luonnonvaraisten eläinten tautitilannetta.

Opinnäytetyön tavoitteena on tutkia ja testata tieteellisessä julkaisussa esitellyn lintujen paramyksenovirusten (APMV) serotyypit 1-9 sekä metapneumovirusalatyyppit A, B ja C havaitsevan pan-paramyksenovirus RT-PCR-menetelmän toimivuutta. Testaamisessa hyödynnetään positiivisia kontrollinäytteitä sekä 61 vesilintunäytteen otosta. Jos menetelmä saadaan toimimaan ja positiivisia näytteitä löytyy, RT-PCR-tuotteet sekvensoidaan. Sekvensoimalla on tarkoitus selvittää, mikä paramyksenovirus on kyseessä. Pan-paramyksenovirus RT-PCR:ää ei ole ennen sovellettu Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä. Ennen uuden menetelmän testausta näytteet tutkitaan APMV-1:n havaitsevalla real-time RT-PCR:llä, joka on käytössä Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikön rutiinidiagnostiikassa.

2 Paramyksenovirukset

Paramyxoviridae-heimoon kuuluvien virusten genomi koostuu yksijuosteisesta negatiivisesta RNA:sta. Ne ovat vaipallisia viruksia, joiden genomi ja sitä peittävät proteiinit muodostavat rakenteeltaan spiraalimaisen nukleokapsidin. Paramyksenoviruksille ominaista on, että niiden genomien sisältämä nukleotidien lukumäärä on kuudella jaollinen. Se saattaa johtua siitä, että jokaiseen nukleokapsidin

proteiinialayksikköön sitoutuu kuusi nukleotidia. Näin koko RNA saadaan peitettyä kunnolla, ja viruksen lisääntyminen on tehokkaampaa.

Paramyksenovirukset voivat infektoida monia eri isäntiä, kuten lintuja, nisäkkäitä, kaloja sekä matelijoita. Paramyksenovirusiin kuuluu viruksia, jotka aiheuttavat vakavia sairauksia linnuille. Näitä ovat esimerkiksi Newcastlelta tautia aiheuttava Newcastle disease virus (NDV) ja linnuilla ylähengitystieinfektioita aiheuttava avian metapneumovirus (aMPV). [1, s. 301, 324.]

2.1 Luokittelu

Mononegavirales-lahkoon kuuluva *Paramyxoviridae*-heimo jakautuu kahteen alaheimoon, jotka ovat *Paramyxovirinae* ja *Pneumovirinae*. *Paramyxovirinae*-alaheimoon luetaan seitsemän sukua: *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* ja *Rubulavirus*. *Pneumovirinae* jakautuu kahteen sukuun: *Metapneumovirukseen* ja *Pneumovirukseen*. [2.]

Pneumovirinae-alaheimon jäsenet poikkeavat *Paramyxovirinae*-alaheimosta mm. siten, että siihen kuuluvilla viruksilla on 10 erillistä transkriptionaalista yksikköä kuuden tai seitsemän sijasta. Lisäksi *Pneumovirinae*-alaheimon virusten nukleokapsidin läpimitta on pienempi (17 nm) ja niiden pinnalla olevat glykoproteiinit ovat pidempiä (13–17 nm). [3, s. 2.]

Paramyxoviridae-heimon uskotaan laajenevan lähitulevaisuudessa. Jo nyt on löydetty viruksia, joiden ominaisuuksista ei ole vielä tarpeeksi tietoa, jotta ne pystyttäisiin luokittelemaan johonkin tiettyyn alaheimoon ja sukuun. Villieläimistä löydetään koko ajan uusia viruksia ja voi olla mahdollista, että *Paramyxoviridae*-heimoon tullaan lisäämään pian jopa uusia sukuja. [1, s. 301.]

2.1.1 Lintujen paramyksenovirukset

Lintujen paramyksenovirukset (*avian paramyxovirus*, APMV) kuuluvat *Paramyxovirinae*-alaheimon *Avulavirus*-sukuun. Ne on perinteisesti jaettu yhdeksään serotyyppiin. APM-virusten luokittelu eri serotyyppiin perustuu virusten erilaisiin genomeihin sekä viruspartikkelin pinnalla oleviin pintaproteiineihin hemagglutinaasiin ja

neuraminidaasiin. Viime vuosina tutkimusmenetelmien kehittyttyä on löydetty vielä kolme uutta serotyyppiä: pingviineistä Falklandin saarella [4], taivaanvuohesta Ranskassa [5] ja haapanasta Italiassa [6].

Kaikki APMV-serotyypit aiheuttavat pääasiassa hyvin samankaltaisia oireita, kuten hengitystieoireita, munatuotannon laskua, lisääntymishäiriöitä, aivotulehdusta, keuhkokuumetta, alakuloisuutta, ripulia ja tavallista korkeampaa kuolleisuutta [7]. Newcastlel tauti -viruksen (NDV) kaikki kannat kuuluvat APMV-serotyyppiin 1. Kaikki serotyypin 1 virukset eivät kuitenkaan aiheuta Newcastlel tautia. NDV on hyvin yleinen virus siipikarjan taudinaiheuttajana ympäri maailman. Sen vuoksi APMV-serotyyppiä 1 on tutkittu paljon, ja se onkin parhaiten tunnettu APMV-serotyypeistä.

Serotyypeistä 2-12 tiedetään paljon vähemmän kuin APMV-1:stä. Serotyypeistä 2-12 on yhdistetty siipikarjaan vain 2, 3, 6 ja 7. Ne aiheuttavat siipikarjalle munatuotannon laskua ja hengitystiesairauksia. Poikkeuksena on APMV-6, jonka on todettu olevan virulentti kalkkunoille, kun taas kanoista on eristetty vain avirulentteja muotoja. [7.] Huonommin tunnetuille serotyypeille on kehitetty paljon vähemmän diagnostisia testejä kuin APMV-1:lle. Toisaalta sen vuoksi ne pysyvät edelleen tuntemattomina, koska niitä ei pystytä tunnistamaan niin hyvin. Diagnostisten testien puute estää lisäksi niiden laajempialaista tutkimusta. Esimerkiksi APMV-serotyyppien 1 ja 3 sekvenssit eroavat toisistaan selkeästi. Ne aiheuttavat linnuissa hyvin samanlaisia oireita ja ristireagoivat HI (hemagglutinaatioinhibiitio) -testissä, minkä vuoksi APMV-3 voitaisiin tulkita usein virheellisesti APMV-1:seksi. Tämän estämiseksi APMV-1 ja APMV-3 seropositiiviset näytteet tutkitaan aina myös toistensa varalta, jotta tulos voidaan varmistaa. [8.]

Newcastlel tauti

Newcastlel tauti (Newcastle disease, ND) aiheuttaa vuosittain suuria taloudellisia menetyksiä eri puolilla maailmaa. Sen vuoksi se on yksi tärkeimmistä siipikarjan tartuntataudeista. Taudin leviäminen on yleistä etenkin Afrikassa, Aasiassa, Keski- ja Etelä-Amerikassa sekä Lähi-idässä. [3, s. 70.]

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksessa (Finlex 843/2013) vastustettavista eläintaukeista ja niiden luokittelusta, Newcastlel tauti on luokiteltu helposti leviäväksi eläintaudiksi. Asetuksessa on lisäksi määritelty, että Newcastlel taudilla tarkoitetaan: "...muissa kuin luonnonvaraisissa linnuissa esiintyvää sellaisen paramyxovirus-1-viruksen

aiheuttamaa tartuntaa, jonka aivojen sisäinen patogeenisuusindeksi (ICPI) kanauntuvikoilla on suurempi kuin 0,7 tai jonka fuusioproteiinin katkaisukohdalla on useita emäksisiä aminohappoja...”. [9.]

Virusen itämisaika on 2-15 vuorokautta. Taudin uskotaan voivan levitä kaikkiin lintulajeihin, mutta sitä on löydetty tähän mennessä noin 240 eri lajista [1, s. 311]. NDV voi levitä tartunnan saaneesta linnusta toiseen aerosolina hengitetyksen kautta. Virus voi levitä jopa kilometrien päähän tuulen mukana. Linnun joutuessa kosketuksiin ulosteella tai muilla eritteillä kontaminoituneen ruoan ja veden kanssa, virus pääsee sen ruoansulatuskanavaan.

Newcastlen taudin oireita ovat hengitystieoireet, ripuli, syömättömyys sekä keskushermosto-oireet ja halvaantuminen. Virulentin ND-virusinfektio johtaa usein linnun kuolemiseen. Oireisiin vaikuttavia tekijöitä ovat viruskannan taudinaiheuttamiskyky, linnun ikä ja vastustuskyky sekä lintulaji. Osassa lintulajeista NDV ei aiheuta sairautta. NDV voi levitä myös ihmiseen aiheuttaen silmän sidekalvontulehdusta tai flunssan kaltaisia oireita. [1, s. 311-314; 10.]

Lintuja voidaan rokottaa Newcastlen tautia vastaan. Rokotteissa käytetään elävää tai inaktivoitua virusta [1, s. 313]. Suomessa siipikarjaa ei rokoteta Newcastlen tautia vastaan. Suomi on saanut rokotusvapaan aseman EU:ssa, minkä vuoksi rokottaminen ei ole edes sallittua. Harrastekyyhkysket ovat poikkeusasemassa, ja niiden rokottaminen on pakollista. [10.]

2.1.2 Lintujen metapneumovirukset

Lintujen metapneumovirukset (*avian metapneumovirus*, AMPV) kuuluvat *Pneumovirinae*-alaheimon *Metapneumovirus*-sukuun. Viruksista on käytetty myös englanninkielisiä nimityksiä *turkey rhinotracheitis virus* (TRTV) sekä *avian pneumovirus* (APV). AMP-virukset jaetaan neljään alatyyppiin: A, B, C ja D. Luokittelu perustuu virusten pinnalla olevia glykoproteiineja (G) koodaavien alueiden erilaisiin sekvensseihin. Lisäksi matriksi- ja fuusioproteiineja (M ja F) koodaavissa sekvensseissä on eroja eri alalajien välillä. [11, s. 3.]

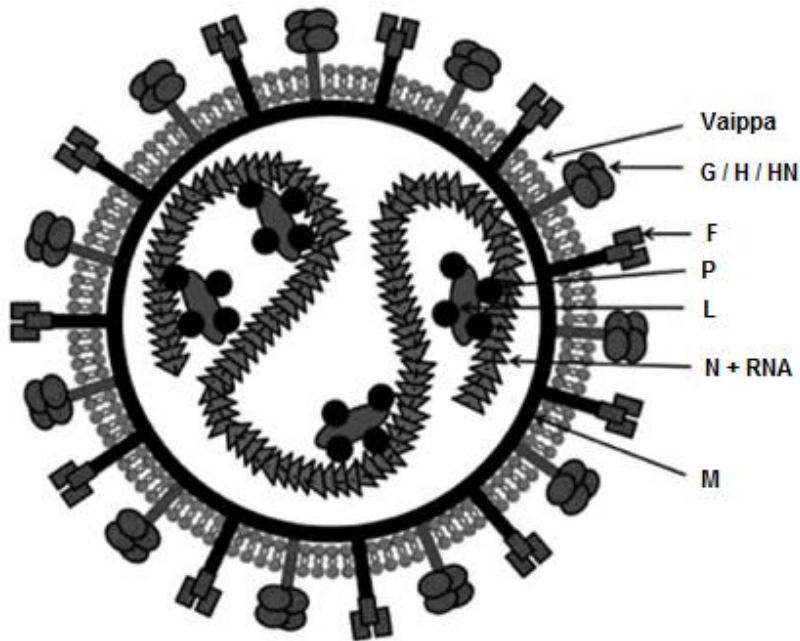
AMP-viruksien pääasiallisia isäntiä ovat kalkkunat ja kanat. Niitä on löydetty myös esim. sinisorsista, varpusista, strutseista ja lokeista [12]. Virus aiheuttaman taudin

oireisiin vaikuttavat lintulaji sekä viruksen alatyypit [1, s. 324]. Virukset aiheuttavat lähinnä ylähengitystieinfektiota. Oireita ovat yskä, sierainten ja silmien vuotaminen, hengityksen raskaus, sidekalvontulehdus, turvotus silmäkuopan alaisissa onteloissa, heikko munatuotanto ja huono munankuoren laatu. Virusinfektion aiheuttama kuolleisuus kanoilla on 1-5 %, mutta samanaikainen bakteeri-infektio voi nostaa kuolleisuuden jopa 25 %:iin [11, s. 10-11]. Virus voi aiheuttaa kanoille ns. *swollen head syndrome*-tauti (SHS), jonka oireena on pään turpoaminen.

Virus leviää aerosolina hengitysteiden kautta linnusta toiseen. Leviämisen on uskottu olevan mahdollista myös munien välityksellä [11, s. 11]. On arvioitu, että tauti leviää paljon muuttolintujen ja muidenkin luonnonvaraisten lintujen välityksellä. Lisäksi tuontilinnut saattavat kantaa virusta. Siipikarjaa voidaan rokottaa virusta vastaan, mutta Suomessa rokottaminen on tautivapauden vuoksi kiellettyä. [11, s. 10-11; 13.]

2.2 Rakenne ja genomi

Paramyxoviruksen genomi koostuu yksijuosteisesta ja polaarisuudeltaan negatiivisesta RNA:sta. Genomin pituus vaihtelee noin 15 000:sta 19 000 nukleotidiin. Nukleokapsidiproteiini N on kapsomeeri, joka muodostaa viruksen genomista RNA:ta suojaavan kuoren eli kapsidin (kuva 1). Sen tarkoituksena on suojella viruksen perintöainesta digestiolt. Paramyxoviruksille ominaisella tavalla nukleokapsidi on rakenteeltaan spiraalimainen ja se on liittyneenä RNA:han kuuden nukleotidin ryhmissä. Kuuden nukleotidin säännöstä poikkeavat vain *Pneumovirinae*-alaheimoon kuuluvat virukset [1, s. 301].



Kuva 1. Paramyxoviruspartikkelin rakenne. Sokereista ja proteiineista koostuva pyöreähkö vaippa, kiinnittymisproteiini G/H/HN, fuusioproteiini F, RDRP (RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi)-kompleksista osan muodostavat P- ja L-proteiinit, N-proteiinin muodostama RNA:ta suojaava kuori sekä vaipan sisäpinnalla oleva matriksiproteiini M. [muokattu lähteestä 3, s. 75.]

Nukleokapsidia suojaa lipideistä, sokereista ja proteiineista koostuva vaippa. Vaippa on pyöreähkö, ja sen läpimitta vaihtelee yleensä 150 ja 200 nm:n välillä. On löydetty myös joitain suurempia paramyxovirus virioneita, joiden läpimitta on 500–600 nm. Vaipan sisäpinnalla on matriksiproteiini M, jonka tarkoituksena on liittää vaippa ja nukleokapsidi yhteen. Se myös ylläpitää virionin rakennetta.

Paramyxovirusten pinnalla on kaksi glykoproteiinia – fuusioproteiini F ja kiinnittymisproteiini, joka viruksesta riippuen on joko G, H tai HN. Glykoproteiinit muodostavat piikkimäisiä ulokkeita vaipan ulkopinnalle ja niiden tehtävänä on mahdollistaa viruksen pääsy isäntäsolun sisälle. H-, HN- ja G-proteiinit kiinnittyvät isäntäsolun pinnan proteiineihin kun taas F-proteiini aiheuttaa viruksen vaipan ja isäntäsolun membraanin fuusioitumisen.

H-, HN- ja G-proteiinit vaikuttavat viruksen hemagglutiniini- ja neuraminidaasi-aktiivisuuteen. H (*hemagglutinin*) -proteiinilla on hemagglutiniini-aktiivisuus, HN (*hemagglutinin-neuraminidase*) -proteiinilla on sekä hemagglutiniini- että neuraminidaasi-aktiivisuus. G-proteiinilla ei ole kumpaakaan aktiivisuutta.

Hemagglutiniini-aktiivisuuden omaavia viruksia voidaan seuloa hemagglutinaatiotestin (HA-testi) avulla.

L (*large*) -proteiini ja P (*phospho*) -proteiini muodostavat osan RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin (*RNA-dependent RNA polymerase*, RDRP) kompleksista. Kumpaakin proteiinia tarvitaan genomisen RNA:n transkriptiossa ja replikaatiossa. Niiden tarkkaa roolia virus-RNA:n synteesissä ei kuitenkaan tiedetä. P-proteiini on sitoutuneena L-proteiinin lisäksi N-proteiiniin. [3, s. 75-80.]

2.3 Lisääntyminen

Paramyxovirus virioni kiinnittyy isäntäsolun pinnalle, ja sen vaippa fuusioituu solumembraanin kanssa. Nukleokapsidi vapautuu isäntäsolun sisälle. Negatiivisesta yksijuosteisesta RNA:sta (*single stranded RNA*, ssRNA) transkriptoidaan virionissa olevan RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin (RDRP) avulla positiivista ssRNA:ta. Positiivinen ssRNA toimii lähetti-RNA:n tavoin templaattina proteiinien syntetisoimisessa. RDRP:n avulla transkriptoidaan myös positiivinen ssRNA, jota käytetään negatiivisen ssRNA:n translaatiossa templaattina. Proteiinisynteesillä saatujen rakenteellisten proteiinien avulla pakataan negatiivinen ssRNA ja RDRP yksittäisiksi virioneiksi. Lopuksi syntyneet virionit vapautuvat solusta solumembraanin kautta silmukoitumalla, jolloin ne saavat pinnalleen vaipparakenteen. Silmukoituminen tuhoaa isäntäsolun membraania, mikä on haitallista solulle ja voi johtaa sen tuhoutumiseen. [3, s. 80-81.]

2.4 Diagnostiikka

Paramyxovirustartunnan aiheuttamien oireiden kirjo on laaja. Sen vuoksi tartunta on hyvä varmistaa diagnostisin testimenetelmin. Viruksen osoittamiseen voidaan käyttää RT-PCR:ää (käänteiskopiointi polymeraasiketjureaktio), real-time RT-PCR:ää, sekvensointia, genotyypausta ja viruseristystä hedelmöitettyissä kananmunissa. Käytössä on lisäksi serologisia testejä kuten kaupallinen ELISA-menetelmä (*enzyme-linked immunosorbent assay*). [1, s. 313.]

2.4.1 RT-PCR

Käänteiskopiointi polymeraasiketjureaktio eli RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) on menetelmä, jolla pystytään monistamaan RNA-sekvenssiä. RNA muutetaan ensin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) sellaisen DNA-polymeraasin avulla, joka pystyy käyttämään RNA:ta templaattinaan. RT-PCR voidaan tehdä joko yksivaiheisena tai kaksivaiheisena. Kaksivaiheisessa RT-PCR:ssä cDNA-synteesi ja itse PCR-reaktio tehdään erillisissä reaktioputkissa. Yksivaiheinen RT-PCR mahdollistaa näiden kahden reaktion yhdistämisen yhteen reaktioputkeen, mikä vähentää ristikontaminaation riskiä. [1, s. 114.] Putkessa toimii siis kaksi entsyymiä. Ensin aktivoituva käänteiskopioijaentsyymi (RT-entsyymi) tuottaa komplementaarista DNA-juostetta (cDNA). Kun reaktion lämpötila nostetaan 95 °C:een, RT-entsyymi inaktivoituu, ja DNA-polymeraasi aktivoituu ja alkaa monistaa PCR-tuotetta PCR-syklityksen mukaan. [14, s. 7.]

PCR-tuotteet voidaan ajaa agarosigeelillä elektroforeesilaitteessa. Nykyään on käytössä lisäksi hyvin herkkä ja spesifinen real-time PCR -menetelmä. Sen avulla voidaan tutkia suuria näytemääriä nopeasti. Real-time PCR -laitteessa on PCR-lämpötilalaitteen lisäksi fluoresenssia mittaava detektor. PCR-reaktiossa käytetään fluoresoivia molekyyliä ja näytteen lähettämän fluoresenssin määrä kasvaa tuotteen monistuessa. Fluoresoivina molekyyleinä voidaan käyttää esim. PCR-tuotteeseen spesifisesti sitoutuvia fluoresoivia koettimia. Real-time PCR on paljon herkempi detektointimenetelmä kuin perinteisen PCR:n yhteydessä käytetty geelija. Real-time PCR:n avulla voidaan lisäksi saada tietoa näytteen sisältämästä virusmäärästä, mikäli ajossa käytetään mukana standardinäytteitä. [1, s. 101, 114.]

2.4.2 Hedelmöitettyjen kananmunien infektointi

Paramyxovirukset pystyvät lisääntymään hedelmöitettyissä kananmunissa. Sen vuoksi niitä voidaan käyttää virusten eristämiseen näytesuspensiosta.

Hedelmöitettyjen kananmunien käytössä virusten viljelemisessä on monia etuja. Munien ylläpitäminen on helppoa ja halpaa. Niissä ei ole bakteereja ja ne ovat herkkiä viruksille, jotka eivät infektoi aikuisia lintuja niiden kehittyneen immuunipuolustusjärjestelmän vuoksi. Munia käytetään soluviljelmän sijasta siksi, että monet lintujen virukset lisääntyvät munissa tehokkaammin [1, s. 108]. Suomessa

infektointiin käytettävät munat ovat ainakin toistaiseksi edullisia, koska tautivapaana maana voidaan käyttää kotimaisia munia tilalta, jotka on serologisesti todettu NDV-vapaaksi. SPF (*Specific pathogen-free*) -munat, jotka jouduttaisiin tilaamaan Euroopasta, eivät olisi yhtä halpoja etenkin kuljetuskustannusten vuoksi [15].

Näytesuspensio voidaan injektoida munaan monella eri tavalla. Injektio voidaan tehdä esim. munan tylopässä päässä olevan ilmatilan läpi allantoisnesteeseen. Näin tehtävässä infektoimisessa käytetään 9-11 vuorokauden ikäisiä munia. Infektoimisen jälkeen munia kasvatetaan 37 °C lämpökaapissa 6 vuorokauden ajan. Munat läpivalaistaan päivittäin, jotta nähdään, onko sikiö yhä elossa. Virusten lisääntyminen voidaan havaita muutoksina sikiössä tai sen kuolemisenä. Kuolleet munat siirretään jääkaappiin. Myös 6 vuorokautta lämpökaapissa kasvatetut sikiöt tapetaan siirtämällä ne jääkaappiin. Virusten osoittamiseksi munasta kerätään allantoisneste, jota käytetään diagnostisissa testeissä kuten hemagglutinaatiotestissä. [16, s. 70-71.]

2.4.3 Hemagglutinaatiotesti

Hemagglutinaatiotestiä (HA-testi) voidaan käyttää virusnäytteiden seulonnassa. HA-testillä saadaan selville, onko näytteessä hemagglutinoivaa virusta. Paramyoksovirusten lisäksi on olemassa muitakin viruksia, joilla on punasoluja agglutinoiva vaikutus. Tällaisia viruksia ovat esimerkiksi adenovirus ja lintuinfluenssavirus (avian influenza virus). Virustyyppin selvittämiseksi voidaan HA-testin jälkeen tehdä hemagglutinaatioinhibiitiotesti (HI-testi).

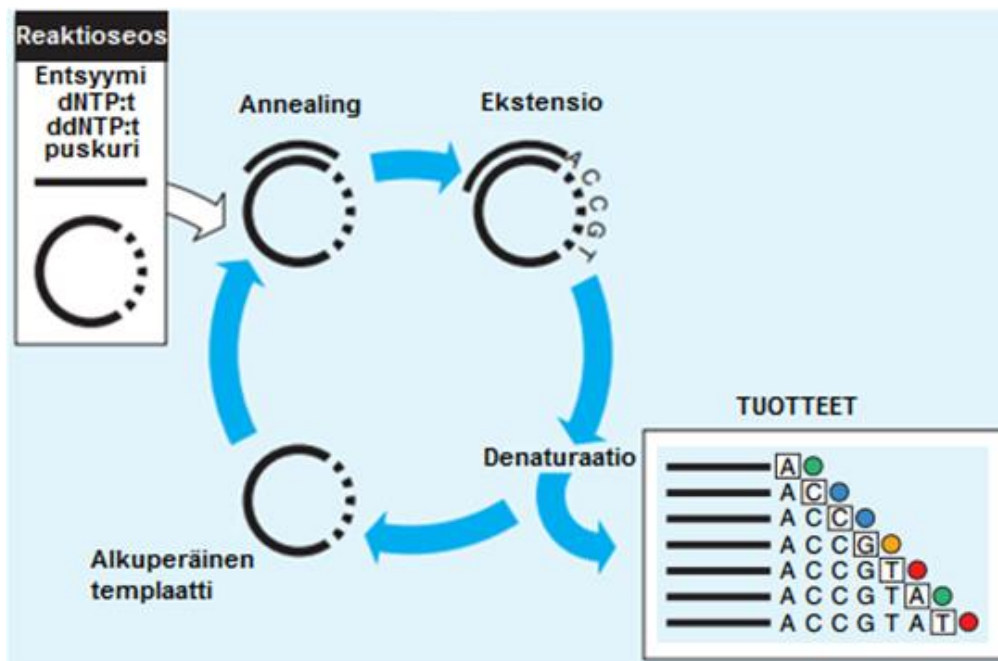
HA-testi perustuu tiettyjen virusten, kuten paramyoksovirusten, kykyyn agglutinoida punasoluja. Paramyoksovirus pinnalla on HA-proteiinia, joka saa testissä käytettävät punasolut agglutinoitumaan. Virus kiinnittyy punasoluihin, mikä nähdään sakan muodostumisena. Antigeenistä tehdään laimennossarja 96-kuoppalevyille, minkä jälkeen lisätään fosforilla puskuroitu keittosuolaliuos (PBS) ja punasolut. Levyn inkuboimisen jälkeen luetaan testin tulokset peililaitteen avulla levyä kallistamalla. Niissä antigeenilaimennoksissa, joissa punasolut eivät valu kuopan pohjalle levyä kallistettaessa, on riittävästi virusta agglutinoimaan punasoluja. Laimennossarjan avulla saadaan selville antigeenin hemagglutinoivien yksikköjen määrä eli tiitteri. [17, s. 47; 18.]

2.4.4 Sekvensointi

Syklisekvensoinnissa, joka perustuu Sangerin menetelmään ja PCR:ään, käytetään dideoksinukleotidejä. Niistä puuttuu 3'-hydroksyyyliryhmä, johon juosteen seuraava nukleotidi liittyy fosforiesterisidoksella. DNA-polymeraasi liittää syklisekvensointireaktiossa nukleotidejä ja dideoksinukleotidejä templaatin määräämässä järjestyksessä juosteeseen. Kun dideoksinukleotidi on liitetty juosteeseen, synteesi päättyy. Näin syntyy erimittaisia DNA-fragmentteja.

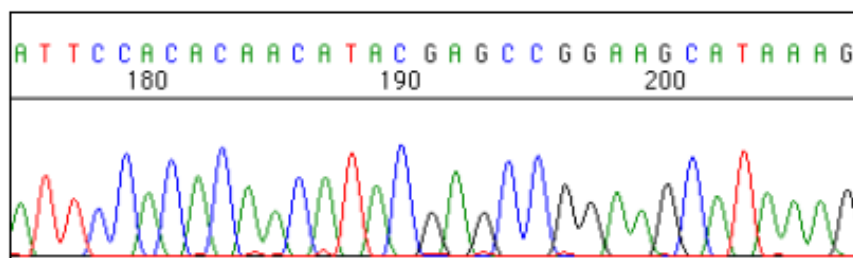
Yhden näytteen syklisekvensointireaktio tehdään kahdessa eri PCR-putkessa. Kumpaankin putkeen tulee puskuria, DNA-polymeraasi-entsyymiä, nukleotidejä, dideoksinukleotidejä ja vettä. Alukkeet lisätään reaktioliuokseen siten, että toiseen putkeen tulee forward-aluketta ja toiseen reverse-aluketta. Kummankin juosteen sekvensoiminen parantaa tuloksen luotettavuutta. Lopuksi putkiin lisätään vielä DNA-templaatti. DNA-templaattina käytetään RT-PCR-näytettä, joka on agarosigeelielektroforeesin jälkeen leikattu geeliltä ja puhdistettu ylimääräisistä alukkeista ja nukleotideistä.

Syklisekvensointinäytteet ajetaan PCR-laitteen lämpötilaohjelmalla, jossa on annealing-, ekstensio- ja denaturaatiovaihe (kuva 2). Aluksi kaksijuosteinen DNA-templaatti denaturoidaan, jolloin juosteet eroavat toisistaan. Annealing-vaiheessa putkessa oleva aluke kiinnittyy templaattijuosteeseen. Ekstensiovaiheessa DNA-polymeraasi liittää nukleotidejä ja dideoksinukleotidejä templaatin määräämässä järjestyksessä juosteeseen. Kun dideoksinukleotidi on liitetty juosteeseen, synteesi päättyy.



Kuva 2. Syklisekvensointireaktion eteneminen. Reaktioseoksessa on DNA-polymeraasia, nukleotideja (dNTP:t), dideoksinukleotideja (ddNTP:t), puskuria, sekvensointialuketta ja DNA-templaattia. Käytettävä lämpötilaohjelma koostuu annealing-, ekstensio- ja denaturaatio-vaiheesta. Fluoresoivalla leimalla merkityn ddNTP:n liityttyä juosteeseen, synteesi päättyy. [muokattu lähteestä 19, s. 5-6.]

Syklisekvensoinnissa käytettävät dideoksinukleotidit on leimattu fluoresoivalla leimalla (kuva 3). Kukin ddNTP on leimattu omalla leimallaan, jotta ne pystytään erottamaan toisistaan. Leima emittoi jonkin tiedetyn aallonpituuden valoa.



Kuva 3. Syklisekvensoinnilla ja kapillaarielektroforeesilla saatu sekvenssi. Syklisekvensoinnissa leimatut fragmentit on erotettu kapillaarielektroforeesissa koon mukaisesti. Niihin suunnattu laser-valo saa tuotteet emittoimaan tiedetyn aallonpituuden valoa, joka detektoidaan. Sen perusteella tietokoneohjelmisto muodostaa sekvenssin. [muokattu lähteestä 19, s. 9.]

Syklisekvensoinnissa syntetisoidut DNA-fragmentit voidaan erottaa molekyylikoon perusteella kapillaarielektroforeesilla. Ekstensiotuotteet ovat negatiivisesti varautuneita

ja ne kulkeutuvat kapillaariin korkean jännitteen vaikutuksesta. Kapillaarissa ne erottuvat molekyylikokonsa mukaisesti. Ennen kuin näytteet ehtivät kulkeutua positiiviselle elektrodille asti, niihin suunnataan lasersäteellä valoa. Valo saa näytteiden fluoresoivat leimat emittoimaan tiedetyn aallonpituuden valoa, joka detektoidaan kapillaarielektroforeesilaitteen detektorilla. Tietokoneohjelmisto muodostaa sekvenssin eripituisten fragmenttien ja niiden fluoresenssien perusteella (kuva 3). [19, s. 5-9.]

3 Pan-paramyxovirus RT-PCR

Pan-paramyxovirus RT-PCR -menetelmä pohjautuu Sander van Boheemenin ym. PLOS ONE -julkaisuun: “A Family-Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study” [20]. Menetelmän avulla pystytään havaitsemaan kaikki *Paramyxoviridae*-heimoon kuuluvat virukset. Monistuksessa käytettävät alukkeet on suunniteltu siten, että ne sitoutuvat kaikkien paramyxovirusten RDRP-geenien sekvensseihin. Eri viruslajien sekvenssit poikkeavat toisistaan jonkin verran. Jotta yksi alukepari voisi sitoutua niihin kaikkiin, käytetään menetelmässä ns. degeneroitua alukeparia. Degeneroidut alukkeet sisältävät vaihtelevia emäksiä. Niitä voidaan käyttää PCR-ajossa, kun tiedetään, että templaatti-DNA:n sekvenssi saattaa sisältää joitakin poikkeamia alukkeiden sekvenssiin nähden [1, s. 113]. Degeneroitu aluke koostuu normaalien emästen, A, C, G, T, lisäksi montaa eri emästä vastaavista vaihtelevista emäksistä, joita ovat esimerkiksi I, Y, W, R ja N. Taulukossa 1 on esitetty, mitä eri emäksiä ne vastaavat.

Taulukko 1. Työssä käytettyjen alukkeiden sisältämät vaihtelevat emäkset I, Y, W, R, ja N sekä niitä vastaavat emäkset.

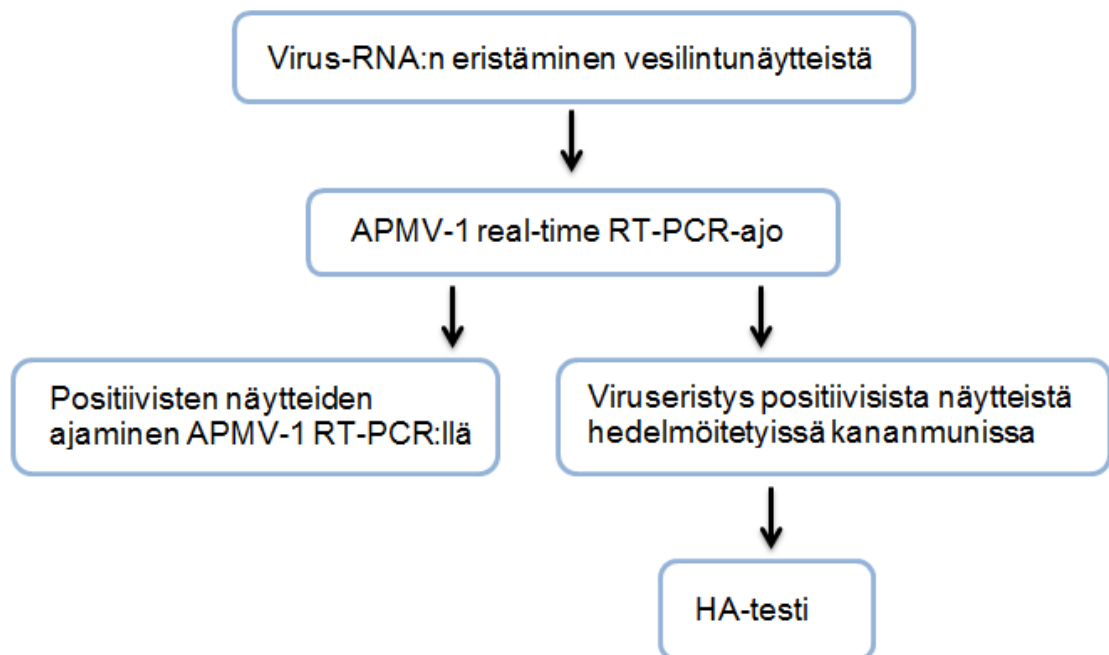
Vaihteleva emäs	Vastaa emästä
I (Inosine)	A, T, C
Y (Pyrimidine)	C, T
W (Weak)	A, T
R (Purine)	A, G
N (any)	A, C, G, T

Menetelmän etuna on, että yhden RT-PCR-ajon avulla voidaan detektoida kaikki paramyxovirusiin lukeutuvat virukset. Lisäksi menetelmällä voidaan mahdollisesti detektoida entuudestaan tuntemattomia paramyxovirusia, jos niiden sekvenssit eivät poikkea huomattavasti alukkeiden sekvenssistä niiden sitoutumiskohdassa.

Pan-paramyoksovirus RT-PCR -ajon jälkeen saatu tuote voidaan sekvensoida. Alukkeiden väliin jäävän monistettavan alueen pituus on 70 nukleotidia, ja sen sekvenssi on hyvin erilainen eri paramyoksovirusilla. Näin ollen, vaikka alukkeilla voidaan monistaa kaikkia paramyoksovirusia, saadaan eri virukset lisäksi tunnistetuksi niin haluttaessa. Sekvensoinnilla saatu 70 nukleotidin sekvenssi voidaan syöttää NCBI:n BLAST-hakuun [21]. Jos tutkittavan viruksen sekvenssi on tietokannassa, saadaan hakutulokseksi tieto, mistä viruksesta on todennäköisesti kyse. Välttämättä 70 nukleotidin sekvenssi ei anna vielä varmaa tulosta, ja usein joudutaan tekemään muita PCR- ja sekvensointijatkotutkimuksia. [20.]

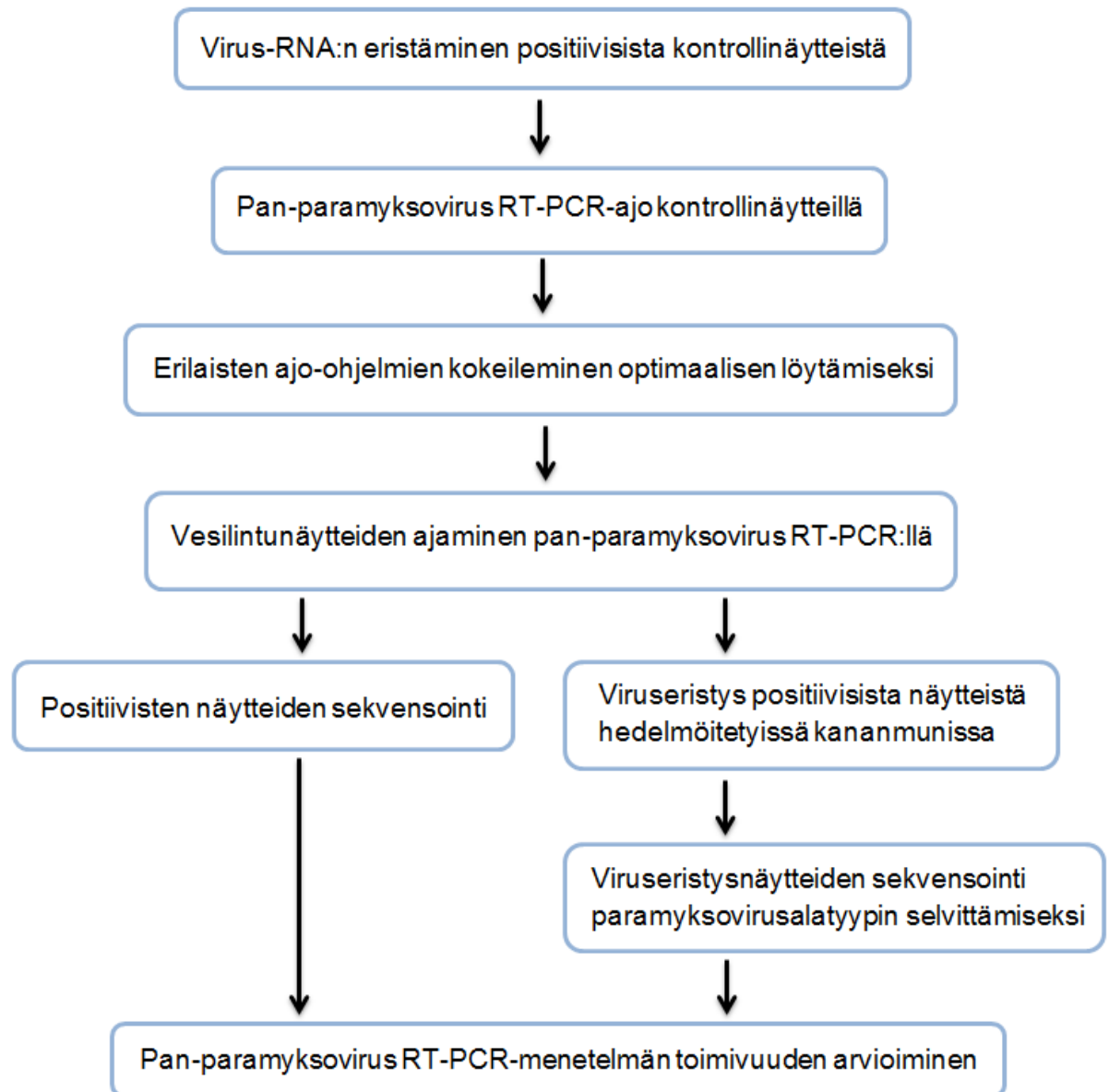
4 Materiaalit ja työn suoritus

Vesilintunäytteistä eristettiin virus-RNA käsin tehtävällä eristysmenetelmällä (kuva 4). Näytteillä ajettiin diagnostisesti erittäin herkkä APMV-serotyypin 1 havaitseva real-time RT-PCR. Löydetyillä positiivisilla näytteillä ajettiin vielä APMV-1:n havaitseva RT-PCR. Virusmäärät osoittautuivat pieniksi, joten APMV-1 real-time-RT-PCR:llä positiiviseksi saaduilla näytteillä infektoitiin hedelmöitettyjä kananmunia. Näin saatiin paramyoksovirukset eristettyä näytesuspensiosta tehokkaasti. Munista kerättiin allantoisneste, josta tehtiin hemagglutinaatiotesti (HA-testi).



Kuva 4. Vuokaavio APMV-1-positiivisten vesilintunäytteiden selvittämisen työvaiheista.

APMV-serotyypin 1,2,3,4,6,7,8 ja 9 positiivisista kontrollinäytteistä sekä TRT-A2, -B2 ja -C -positiivisista näytteistä eristettiin virus-RNA:t Qiagenin eristysautomaatilla (kuva 5). Näillä kontrollinäytteillä ajettiin pan-paramyoksvirus RT-PCR. Lisäksi menetelmällä ajettiin NDV- ja NDVH-positiiviset kontrollinäytteet ja NDV-positiivisia lintunäytteitä. Pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmän ajoparametreja muuttamalla pyrittiin löytämään optimaalinen ajo-ohjelma, joka sopi parhaiten käytettävien reagenssien kanssa. Lopuksi pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmällä tutkittiin vesilintunäytteet.



Kuva 5. Vuokaavio pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmän testaamisen työvaiheista.

Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit löytyvät liitteestä 1. Kaikki työvaiheet tehtiin Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä niille määrättyissä työpisteissä. Ristikontaminaation minimoimiseksi jokaisessa veto- ja laminaarikaapissa käytettiin omaa pipettisarjaa, putkitelineitä sekä muita välineitä ja kaikissa pipetoinneissa käytettiin suodatinkärkiä. Työpisteet puhdistettiin vähintään kerran viikossa 70 %:lla etanolilla. Lisäksi kaikki molekyyllaboratorioiden pinnat pyyhittiin kuukausittain Molecular BioProducts:in DNA AWAY -puhdistusaineella.

4.1 Näytteet ja kontrollinäytteet

Työssä käytetyt näytteet oli otettu Maaningan Lapinjärvien vesilinnuista. Näytteet olivat vuodelta 2014 ja niitä oli yhteensä 61 kpl. Lähes kaikki näytteet olivat sorsista (59 kpl). Taulukossa 2 on eritelty tarkemmin, mistä lintulajeista näytteet oli otettu. Pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmällä tutkittiin lintunäytteiden lisäksi Eviraan saapuneita referenssinäytteitä (Animal and Plant Health Agency, Weybridge, UK).

Taulukko 2. Lintulajit, joista vesilintunäytteet oli otettu.

Lukumäärä	Tieteellinen nimi	Suomenkielinen nimi (suku)
35	<i>Anas crecca</i>	Tavi (sorsat)
18	<i>Anas platyrhynchos</i>	Sinisorsa (sorsat)
3	<i>Anas penelope</i>	Haapana (sorsat)
2	<i>Bucephala clangula</i>	Telkkä (telkät)
2	<i>Anas clypeata</i>	Lapasorsa (sorsat)
1	<i>Anas querquedula</i>	Heinätavi (sorsat)

Jokaisessa ajossa oli aina mukana positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Negatiivisena kontrollina oli vedestä eristetty RNA. Pan-paramyoksvirus RT-PCR -menetelmällä ajettiin useita eri positiivisia kontrolleja, jotta saatiin paremmin tietoa siitä, mitä kaikkia paramyoksviruksia menetelmällä pystyttiin toteamaan. Taulukossa 3 on esitetty kaikki työssä käytetyt positiiviset kontrollinäytteet.

Taulukko 3. Positiiviset kontrollinäytteet.

Lyhenne	Positiivisen kontrollinäytteen tiedot
APMV-2	Inactivated P/Chicken/yucaipa/Cal/56 (PMV-2) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency
APMV-3	Inactivated P/Tk/yucaipa/Eng/1087/82 (PMV-3) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency
APMV-4	Inactivated P/Duck/Hong Kong/D3/75 (PMV-4) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency
APMV-6	Inactivated P/Dk/Hk /199/77 (PMV-6) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency
APMV-7	Inactivated P/Dove/Tn/4/75 (PMV-7) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency

APMV-8	Inactivated P/Goose/Del/1053/76 (PMV-8) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency
APMV-9	Inactivated P/Dom Dk/NY/22/78 (PMV-9) ANTIGEN, Vet. Lab. Agency
NDV	NDV Ulster ag. Vi 189/94, 5 mp. inaktivoitu 5.2.13
NDVH	Vi874/97
TRT A2	CE 2116-17-18 (14.01) 18.01.99, 15.3.06
TRT B2	CE 2119-20 TRT-Type B2 (14.01) 20.01.99, Vero 2.p, 30.3.06
TRT C	TRT CO aMPV 193 ADV 0503 NVSL AMES, IA 2.p, 17.2.06
NDV HI	Vet. Lab. Agency Ref. 0158

Positiiviset kontrollit APMV-2, -3, -4, -6, -7, -8 ja -9 sekä NDV HI olivat kylmäkuivatussa muodossa. Ne liuotettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti 1 ml:aan steriiliä tislattua vettä. Jokaista kontrollinäytettä käsiteltiin omilla suojahanskoilla, jotta ristikontaminaatiota ei tapahtuisi. Kaikkia positiivisia kontrolleja säilytettiin -70 °C pakastimessa.

4.2 Virus-RNA:n eristys

Vesilintunäytteistä eristettiin virus-RNA:t käsin käyttäen QIAamp® Viral RNA Mini Kit -pakettin reagensseja. APMV-serotyypin 1,2,3,4,6,7,8 ja 9 positiivisista kontrollinäytteistä sekä TRT-A2, -B2 ja -C -positiivisista näytteistä eristettiin virus-RNA:t käyttäen Qiagenin Qiacube-laitetta. Jokaisella RNA:n eristämiskerralla otettiin mukaan negatiivinen ja positiivinen kontrolli.

QIAamp Viral RNA Mini Kit -reagenssipaketti on tarkoitettu käytettäväksi virus-RNA:n eristämiseen plasma- ja seeruminäytteistä sekä muista soluvapaista ruumiinnesteistä. Ensin näyte lyysataan eli sen rakenne hajotetaan denaturoivissa olosuhteissa. Näin saadaan RNA:ta hajottavat entsyymit, RNAasit, inaktivoitua. Näytteeseen lisätään myös kantaja-RNA:ta, jonka tehtävä on edesauttaa nukleiinihappojen sitoutumista QIAamp-pylvään membraaniin. Lisäksi se estää virus-RNA:n laadun heikkenemistä. Lyysattu näyte siirretään QIAamp-pylvääseen. Virus-RNA kiinnitetään pylvään membraaniin luomalla optimaaliset olosuhteet sitoutumiselle. Epäpuhtaudet pestään pois kahdella eri pesupuskurilla. Lopuksi saatu korkealaatuinen RNA eluoidaan RNAasi-vapaaseen puskuriin.

4.2.1 QIAamp-minipylväät

Näytteiden lukumäärää vastaava tilavuus kantaja-RNA:ta ja AVL-puskuria sisältävää liuosta valmistettiin Falcon-putkeen. Yhtä näytettä kohden tarvittiin 560 µl tätä liuosta,

joka sisälsi 5,6 µg kantaja-RNA:ta. Falcon-putkesta pipetoitiin 560 µl 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen. Putkeen lisättiin 140 µl näytesuspensiota ja vorteksoitiin sykäyksittäin 15 s. Inkuboitiin 10 min RT, minkä jälkeen sentrifugoitiin kaikki pisarat putken pohjaan. Mikrosentrifugiputkeen lisättiin 560 µl etanolia ja vorteksoitiin sykäyksittäin 15 s. Kaikki neste sentrifugoitiin putken pohjaan. Pipetoitiin 630 µl näytteestä QIAamp-pylvääseen, joka oli 2 ml:n keräilyputkessa. Pylvään kansi suljettiin ja sentrifugoitiin 8000 rpm 1 min. Käytetty keräilyputki heitettiin roskeen ja siirrettiin pylväs uuteen 2 ml:n keräilyputkeen. Loput näytteestä lisättiin pylvääseen, kansi suljettiin ja sentrifugoitiin 8000 rpm 1 min. Pylväs siirrettiin jälleen uuteen keräilyputkeen ja pipetoitiin 500 µl AW1-puskuria. Kansi suljettiin ja sentrifugoitiin 8000 rpm 1 min. Pylväs siirrettiin uuteen keräilyputkeen ja pipetoitiin 500 µl AW2-puskuria. Sentrifugoitiin 13 000 rpm 3 min, minkä jälkeen siirrettiin pylväs uuteen keräilyputkeen ja sentrifugoitiin vielä 1 min. Keräilyputki heitettiin pois ja siirrettiin pylväs uuteen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen. Pylvään keskelle pipetoitiin 30 µl AVE-puskuria, suljettiin kansi ja inkuboitiin 1 min RT. Sentrifugoitiin 8000 rpm 1 min ja heitettiin pylväs pois. Mikrosentrifugiputkessa oleva neste sisälsi RNA:n. RNA:ta säilytettiin -70 °C.

4.2.2 QIAcube-laite

Virus-RNA:n eristäminen Qiagenin QIAcube-laitteella perustui samaan menetelmään kuin QIAamp-minipylväillä eristäminen. Laite teki kaikki työvaiheet automatisoidusti, mikä teki virus-RNA:n eristämisestä helppoa ja nopeaa. Laitteeseen mahtui kerralla 2-12 näytettä mukaan lukien kontrollinäytteet.

Pipetinkärjet olivat valmiina telineissä, jotka asetettiin niille varatuille paikoille laitteen sisälle. 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket olivat QIAamp-pylvään kanssa QIAcuben sisällä olevaan sentrifugiin suunnitellussa telineessä. Mikrosentrifugiputkeen merkittiin näytteen tiedot, minkä jälkeen se asetettiin takaisin telineeseen. Telineet asetettiin laitteen sentrifugiin numeroiduille paikoille. Näytteitä pipetoitiin 140 µl 2 ml:n näyteputkiin ja ne asetettiin laitteen sisällä olevaan ravisteluosaan numeroiduille paikoille vastaten sentrifugin järjestystä. QIAcuben protokollataulukosta tarkistettiin näytteiden määrää vastaava tilavuus AVE-puskuria, jota pipetoitiin 2 ml:n näyteputkeen. Saman taulukon mukaisesti valmistettiin kantaja-RNA:sta ja AVE-puskurista liuos toiseen näyteputkeen. Putket asetettiin omille paikoilleen laitteen sisälle. Lopuksi avattiin reagenssi-telineen pulloissa olevien AW1-, AW2- ja AVL-

puskurien sekä etanolin korkit ja laitettiin teline sille varatulle paikalle. Laitteen kansi suljettiin ja valittiin ajo-ohjelmaksi 'Purification of viral RNA from cell-free body fluids'.

Kun laite oli tarkistanut, että kaikki välineet ja reagenssit oli täytetty oikein, se ilmoitti ajo-ohjelman keston. Kun ohjelma loppui, oli eristetty virus-RNA näytteen tiedoilla merkityssä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa.

4.3 APMV-1 real-time-RT-PCR ja -RT-PCR

APMV-1 real-time-RT-PCR -ajoa varten valmistettiin ensin PCR-reagenssiseos siihen tarkoitettussa laminaarikaapissa. Kaikkia reagensseja ja virus-RNA:ita pidettiin jäällä. Jokaista näytettä varten tarvittiin 5 µl 5x PCR-puskuria; 1 µl NTP's; 0,2 µl aluketta prNDF (50pmol/µl); 0,2 µl aluketta prNDR (50pmol/µl); 0,15 µl NDpro1 koetinta; 0,15µl NDpro2 koetinta; 3 µl MgCl₂; 1 µl entsyymiseosta; 0,25 µl RNase inhibiittoria ja 12,05 µl Sigma vettä. Valmistettiin yksi iso erä PCR-reagenssiseosta kertomalla tarvittavat reagenssilavuudet näytteiden lukumäärällä. Lukumäärää laskiessa otettiin huomioon positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä 1-2 ylimääräistä erää reagenssiseosta, jotta pipetoitaessa tapahtuva hävikki ei vaikuttaisi seoksen riittävyteen. Kun kaikki reagenssit oli pipetoitu 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen, sekoitettiin niitä pipetoimalla muutaman kerran edestakaisin. Sen jälkeen seos jaettiin PCR-kuoppalevyn kuoppiin 23 µl/kuoppa. Kuoppalevy siirrettiin vetokaappiin, joka oli tarkoitettu templaatin lisäämiseen.

Kuoppalevyä pidettiin koko ajan jäällä. RNA:ta lisättiin 2 µl kuhunkin kuoppaan suunnitellun näytejärjestyksen mukaisesti. RNA:n sisältämät Eppendorf-putket avattiin Eppendorf-putkille tarkoitettulla kannen avaajalla. Sitä liekitettiin aina ennen ja jälkeen putken avaamisen ristikontaminaation välttämiseksi. Pipetoitaessa RNA:ta kuoppaan, sekoitettiin reagenssiseosta ja RNA:ta pipetoimalla edestakaisin muutaman kerran. Lopuksi kuoppalevy peitettiin teipillä ja näytteet sentrifugoitiin kuoppien pohjalle. Kuoppalevy asetettiin BioRad-laitteeseen ja näytteiden tiedot merkittiin pipetointijärjestyksen mukaisesti real-time-ohjelmiston taulukkoon. Näytteet ajettiin ohjelmalla PMV_1: 50 °C 30 min; 95 °C 15 min; 40 sykliä 95 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s.

APMV-1 RT-PCR -menetelmää vasten valmistettiin PCR-reagenssiseos kuten APMV-1 real-time-RT-PCR-menetelmässä. Yhtä näytettä kohden tarvittiin: 5 µl 5x PCR-puskuria; 1 µl NTP's; 0,5 µl aluketta pr1 (50pmol/µl); 0,5 µl aluketta pr2 (50pmol/µl); 1 µl entsyymiseosta; 0,2 µl RNase inhibiittoria ja 14,3 µl Sigma vettä. Reagenssiseosta pipetoitiin 22,5 µl 0,5 ml:n PCR-putkiin, jotka oli merkitty näytteiden tiedoilla. RNA:ta lisättiin putkiin 2,5 µl ja näytteet ajettiin ohjelmalla NDV2: 50 °C 30 min; 94 °C 15 min; 40 sykliä 94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min; 72 °C 4 min, 10 °C 18 h.

APMV-1 RT-PCR -menetelmällä ajettut näytteet ajettiin 2 % agarosigeelillä elektroforeesilaitteella. Ajopuskurina käytettiin 1xTBE-puskuria. Kokostandardina oli Invitrogenin 100 bp DNA Ladder. Näytteitä varten pipetoitiin kuoppalevyille 2 µl latauspuskuria. Siihen lisättiin 10 µl näytettä ja sekoitettiin ylös-alas pipetoimalla. Tämän jälkeen kuopasta otettiin 10 µl näytettä geelin kaivoon. Näytteet ajettiin 100 V:lla noin 1 h. Lopuksi geeli kuvattiin Alpha Innotech -kuvantamislaitteella. Kuvattu geeli laitettiin vetokaapissa olevaan ongelmajäteastiaan ja sieltä edelleen Eviran ongelmajätteisiin.

4.4 Hedelmöitettyjen kananmunien infektointi

Infektoimisessa käytetyistä näytteistä tehtiin aluksi verimaljat pipetoimalla pisara näytesuspensiota verimaljalle. Maljaa inkuboitiin 37 °C 24–48 h. Infektoimiseen käytettiin 9-11 vuorokauden ikäisiä hedelmöitettyjä kananmunia. Jokaista näytettä varten valmistettiin viisi munaa. Munat läpivalaistiin pimeässä huoneessa, jotta nähtiin sikiön olevan elossa. Muniin merkittiin läpivalaisun yhteydessä lyijykynällä sikiön olinpaikka rastilla sekä piirrettiin rengas ilma-aukon ympärille. Muniin merkittiin lisäksi näytenumero, munapasaasi ja päivämäärä.

Infektoiminen tehtiin laminaarikaapissa. Etanolilla kostutetulla vanulla pyyhittiin sitä kohtaa kananmunasta, jossa ilma-aukko oli. Ilma-aukkoa liekitettiin nopeasti etanolin haihduttua. Porattiin timanttikoralla varovasti pieni reikä kuoren läpi. Reikä pyyhittiin etanolilla ja liekitettiin nopeasti. Otettiin steriiliin ruiskuun 1 ml näytesuspensiota ja työnnettiin neula poratusta reiästä ilma-aukon läpi sikiön suuntaan. Varottiin kuitenkin osumasta itse sikiöön. Näytesuspensiota ruiskutettiin 0,2 ml per muna. Yhdellä ruiskulla infektoitiin siis kaikki yhden näytteen viisi munaa. Reikä pyyhittiin vielä

etanolilla kostutetulla vanulla ja liekitettiin. Porattu reikä peitettiin lopuksi pienellä pyöreällä tarralapulla. Munat laitettiin 37 °C lämpökaappiin.

Munat läpivalaistiin päivittäin, jotta nähtiin, oliko sikiö yhä elossa. Vuorokauden päästä infektoinnista kuolleet munat laitettiin autoklavoitiin roskeen, koska ne olivat todennäköisesti kuolleet pistoon infektoinnin yhteydessä. 2-5 vuorokauden päästä kuolleet munat laitettiin 4 °C jääkaappiin ainakin 4 h ennen allantoisnesteen keräämistä. Jos sikiö oli elossa vielä kuudentena päivänä infektoinnista, tapettiin se siirtämällä munat 4 °C jääkaappiin ainakin 4 tunniksi.

Jääkaapista otetut kuolleet munat avattiin ja niistä kerättiin allantoisneste. Munaan poratun reiän peittävä tarralappu siirrettiin sivuun. Steriileillä saksilla leikattiin reiästä lähtien ilma-aukulle piirrettyä viivaa pitkin munan kansi pois. Kaikki saman näytteen munat avattiin saksia välissä aina liekittäen. Munaa suojaava kalvo leikattiin varovasti puoliksi irti ja siirrettiin se sivuun. Tässä käytettiin apuna steriilejä pinsettejä. Steriilillä Pasteur-pipetillä kerättiin allantoisnestettä puhtaaseen näyteputkeen, jota pidettiin jäällä. Varottiin rikkomasta keltuaista tai verisuonia. Allantoisnesteestä otettiin näyte verimaljalle. Jokaisen munan allantoisneste kerättiin omaan näyteputkeen ja niistä tehtiin HA-testi.

Jos HA-testin tulokset olivat negatiiviset, jatkettiin viruseristystä 2. pasaasiin. Sitä varten yhdistettiin yhdellä näytteellä infektoitujen viiden munan allantoisnesteet pipetoimalla jokaista 300 µl yhteen näyteputkeen. Tällä näytepoolilla infektoitiin viisi hedelmöitettyä kananmunaa aivan kuten 1. pasaasissa. Kuolleista ja tapetuista munista tehtiin verimaljat ja HA-testi.

4.5 Hemagglutinaatiotesti

HA-testi tehtiin laminaarikaapissa. Monikanavapipetillä pipetoitiin 25 µl fosforilla puskuroitua keittosuolaliuosta (PBS) V-96-kuoppalevyn kaikkiin käytettäviin kuoppiin. Pipetoitiin 25 µl antigeeniä eli allantoisnestettä kyseiselle näytteelle merkityn rivin ensimmäiseen kuoppaan. Näytteiden lisäksi yhden rivin ensimmäiseen kuoppaan pipetoitiin 25 µl PBS-liuosta solukontrolliksi. Monikanavapipetillä laimennettiin ensimmäisestä kuopasta lähtien siirrostamalla 25 µl rivin loppuun. Rivin viimeisestä kuopasta pipetoitiin 25 µl pois. Näin saatiin antigeenilaimennossarja, jossa

laimennokset olivat 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 ja 1:4096. Lisättiin 25 µl PBS-liuosta sekä 25 µl 1 % kukon punasoluja kaikkiin kuoppiin. Peitettiin levy teipillä ja sekoitettiin varovasti levyn reunoja kopistelemalla. Inkuboitiin levyä 4 °C jääkaapissa 30 min.

Tulokset luettiin peililaitteen avulla. Levyä kallistettiin, jolloin nähtiin, missä kuopissa oli riittävästi virusta agglutinoimaan punasoluja. Jos punasolut lähtivät valumaan kallistaessa, oli tulos negatiivinen. Jos punasolut olivat agglutinoituneet, ei valumista tapahtunut, ja tulos oli positiivinen.

4.6 Pan-paramyksenovirus RT-PCR

Pan-paramyksenovirus RT-PCR-menetelmää varten valmistettiin PCR-reagenssiseos kuten APMV-1 RT-PCR-menetelmässä. Taulukossa 4 on käytettyjen reagenssien tilavuudet yhtä näytettä kohden. Tilavuudet olivat reagenssien valmistajan suositusten mukaisia. Näytteet ajettiin 2 % agarosigeelillä elektroforeesilaitteella ja kokostandardina oli 100 bp DNA Ladder.

Taulukko 4. Pan-paramyksenovirus RT-PCR reagenssiseos yhtä näytettä kohden.

Reagenssi	Tilavuus / µl
5 x PCR-puskuri (Qiagen)	5,0
dNTP's (Qiagen)	1,0
Aluke PMX1 50 pmol/µl (Oligomer)	0,5
Aluke PMX2 50 pmol/µl (Oligomer)	0,5
RNAase inhibiittori 20 U/µl	0,2
Entsyymi mix (Qiagen)	1,0
H2O (Sigma/Qiagen)	14,8

Käytettävä ajo-ohjelma poikkesi jonkin verran PLOS ONE -julkaisussa olleesta ohjelmasta. Tämä johtui siitä, että työssä käytettiin eri reagensseja kuin julkaisussa. Lisäksi käytettiin kaksivaiheisen RT-PCR-menetelmän sijasta yksivaiheista menetelmää. Yksivaiheisessa menetelmässä cDNA-synteesi ja PCR-reaktio tehdään yhdessä näyteputkessa. Alkuperäisessä julkaisussa ollut loppuekstensiovaihe jätettiin pois merkityksettömänä, koska syntyvä PCR-tuote oli hyvin lyhyt. Lisäksi syklien määrä nostettiin 35 syklistä 40 sykliin PCR-tuotteen lisäämiseksi. Taulukossa 5 on esitetty työssä käytetty ajo-ohjelma, joka syötettiin PCR-laitteelle nimellä PAN-PARA.

Taulukko 5. Pan-paramyksen RT-PCR:ssä käytetty ajo-ohjelma "PAN-PARA".

Vaihe	Lämpötila	Aika
Käänteistranskriptio	50 °C	30 min
RT-entsyymin inaktivaatio, polymeraasientsyymin aktivaatio ja templaatin denaturointi	95 °C	15 min
Denaturaatio	95 °C	30 s
Annealing	41 °C	30 s
Ekstensio	72 °C	30 s
Loppujäähdytys	10 °C	18 h

Heti aluksi käyttöön otettu ajo-ohjelma osoittautui parhaaksi testatuista vaihtoehdoista. Vaihtoehdoisena ohjelmalla kokeiltiin lämpötilaohjelmaa, jossa käänteistranskription ja entsyymin aktivaation jälkeen oli viisi sykliä, joissa annealing-lämpötila oli 41 °C sijasta 30 °C. Sen jälkeen tuli lisäksi 40 sykliä, joissa annealing-lämpötila oli 41 °C. Tätä testattiin sen vuoksi, että alhaisempi lämpötila olisi voinut tehostaa alukkeiden sitoutumista, koska korkeammassa lämpötilassa sitoutuminen on spesifisempää.

Lisäksi kokeiltiin kahta erilaista gradienttilämpötilaohjelmaa. Gradientit olivat melko samanlaiset kummassakin ohjelmassa, mutta ajot tehtiin kahdella eri laitteella. Työssä käytetyllä "Cecilia"-laitteella ei ollut mahdollista ajaa gradientti-PCR:ää, joten ajot suoritettiin kahdella muulla laitteella. "Veriti"-laitteella annealing-lämpötilaa muutettiin välillä 35-45 °C. Sillä ei saatu niin hyviä tuloksia kuin olisi toivottu. Jopa hyväksi todetulla 41 °C annealing-lämpötilalla saatiin melko heikkoja tuloksia. Sen vuoksi gradientti-ohjelma ajettiin myös "BioRad"-laitteella, jolla annealing-lämpötiloja vaihdeltiin välillä 33-41 °C. Sillä saatiin parempia tuloksia. Loppupäätelmänä kuitenkin oli, että jo aikaisemmin hyväksi todettu annealing-lämpötila 41 °C oli lähinnä optimaalista.

4.7 Sekvensointi

Sekvensoiminen koostui viidestä eri vaiheesta. Ensin agarosigeelielektroforeesilla ajettu positiivinen näyte leikattiin geeliltä. Seuraavaksi PCR-tuote puhdistettiin ylimääräisestä geelistä. Puhdistettu näyte leimattiin fluoresoivilla dideoksinukleotideilla (ddNTP) syklisekvensoinnissa, minkä jälkeen näyte puhdistettiin jälleen. Lopuksi näyte laitettiin sekvensaattoriin, joka erotti kapillaarielektroforeesin avulla eri pituiset ddNTP:illä leimatut syklisekvensointituotteet. Näin saatiin selville sekvensoitavan näytteen nukleotidijärjestys.

PCR-tuotteen leikkaaminen agarosigeeliltä

Pan-paramyoksovirus RT-PCR-menetelmällä saadut positiiviset näytteet leikattiin agarosigeeliltä. Geeli laitettiin piirtoheitinkalvon päälle. Kasvot suojattiin UV-valolta siihen tarkoitetun visiirin avulla. Veitsi käsiteltiin etanolilla huolellisesti. Haluttu kohta geelistä leikattiin siten, että mahdollisimman vähän ylimääräistä geeliä jäi leikattuun palaan. Pala siirrettiin näytteen tiedoilla merkittyyn eppendorf-putkeen.

PCR-tuotteen puhdistaminen

Geeliltä leikattu näyte puhdistettiin ylimääräisestä geelistä. Puhdistamisessa käytettiin Qiagenin QIAquick Gel Extraction Kit -reagenssipakettia. Menetelmä perustuu ns. spin-pylvästekniikkaan. Ensin geelipala liuotetaan puskuriin (QG) ja DNA sidotaan pylvään membraaniin korkean suolapitoisuuden avulla. Seuraavaksi näyte pestään etanolia sisältävällä pesupuskurilla (PE). Lopuksi puhdistettu näyte eluoidaan puskurilla, jossa on hyvin matala suolapitoisuus (EB). PCR-tuotteen puhdistaminen tehtiin reagenssipaketin ohjeiden mukaisesti [22, s. 25-26], ja sen jälkeen näyte oli valmis syklisekvensointireaktiota varten.

Syklisekvensointi

Yhdestä näytteestä valmistettiin kaksi näytettä syklisekvensointia varten. Kummallekin alukkeelle tarvittiin oma näyteputki. Taulukossa 6 on reaktioon tarvittavat reagenssit ja niiden määrät yhtä näyteputkea kohden.

Taulukko 6. Syklisekvensointireaktioon tarvittavat reagenssit yhtä näyteputkea kohden.

Reagenssi	Tilavuus / μ l
Terminator Ready Reaction Mix RR-100 BDv1.1	2,0
BigDye Terminator v1.1, v3.1 5x sekvensointipuskuri	3,0
Aluke forward tai reverse, 1 pmol/ μ l	3,2
H ₂ O	6,8

Reagensseja pidettiin koko ajan jäällä ja ne pipetoitiin 0,5 ml:n PCR-putkiin, joihin lisättiin lopuksi 5 μ l puhdistettua PCR-tuotetta. Näytteet ajettiin PCR-laitteen lämpötilaohjelmalla. Ajo-ohjelmassa oli 4 min alkudenaturaatio 95 °C:ssa seuraavaksi oli 30 sykliä, jotka koostuivat kolmesta vaiheesta - denaturaatio 30 s 96 °C:ssa,

annealing 30 s 50 °C:ssa, ekstensio 4 min 60 °C:ssa – ja lopuksi oli loppujäähdytys 4 °C.

Syklisekvensointituotteen puhdistaminen

Ennen sekvensointia syklisekvensointituote puhdistettiin vielä ylimääräisistä alukkeista ja dNTP:stä. Puhdistus tehtiin Qiagenin DyeEx -puhdistuspylväillä. Pylvään sisällä oleva materiaali sekoitettiin tasaiseksi vortexoimalla. Sen jälkeen korkkia kierrettiin auki ¼ kierrosta, pylvään alaosa katkaistiin taittamalla ja pylväs asetettiin 2 ml:n keräilyputkeen. Sentrifugoitiin 2600 rpm 3 min. 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkittiin näytteen tiedot ja pylväs asetettiin siihen. Pylvään korkki heitettiin pois ja syklisekvensointituote pipetoitiin pylväsmateriaalin keskelle. Sentrifugoitiin 2600 rpm 3 min, minkä jälkeen puhdistettu tuote oli mikrosentrifugiputken pohjalla.

Sekvensointi

Sekvensaattoriin vaihdettiin vedet ja puskuri, jos ne olivat yli kaksi päivää vanhoja. Näytteiden tiedot kirjoitettiin tietokoneelle sekvensointilevyn seuraavia vapaita kuoppia vastaaville kohdille. Ajoprotokollaksi valittiin BigDye1_POP7_50cm, mikä tarkoitti, että ajossa käytettiin 50 cm:n kapillaaria, POP7 polymeeriä ja BDv1.1 kemialla. Tulosten analysoimisessa käytettävä protokolla valittiin vastaamaan ajoprotokollaa: SeqRun_BigDye11_POP7_50cm. Levylle tehdyt muutokset tallennettiin, minkä jälkeen näytteet voitiin pipetoida laitteeseen.

Tray-nappia painamalla laite toi näytelevyn kädenulottuville. Näytteitä pipetoitiin levyn kuoppiin 10 µl siten, että paikat vastasivat koneelle syötettyjä näytetietoja. Tarkistettiin, ettei kuoppiin jäänyt ilmakuplia. Levy peitettiin sen päällä olleella kumimatolla ja se asetettiin muovikehikossa takaisin laitteeseen. Ajo käynnistettiin laitteen ohjeiden mukaisesti, ja kone ilmoitti ajo-ohjelman arvioitun kestoajan.

5 Tulokset

Tulokset on esitetty työn etenemisjärjestyksessä. RT-PCR-ajojen tuloksia on havainnollistettu agarosigeelielektroforeesista saaduilla geelikuvilla ja sekvensoinnin tuloksia pylväskaavion tapaisilla kuvilla. Taulukossa 7 on esitetty yhteenveto pan-

paramykvovirus RT-PCR -menetelmällä testatuista näytteistä ja niillä saaduista tuloksista.

Taulukko 7. Pan-paramykvovirus RT-PCR-menetelmällä ajetut näytteet ja saadut tulokset.

Näytteet	Tulokset	Lisätiedot ja jatkotestit	Lopputulokset
Positiiviset kontrollinäytteet	Positiiviset näytteet: APMV-2, -3, -6, -7, -8, -9, NDVH, TRT A2, -B2, -C Negatiiviset näytteet: APMV-4, NDV, NDV HI	Kokeiltiin erilaisia ajo-ohjelmia optimaalisen löytämiseksi. APMV-4- ja NDV-positiivisten kontrollien RNA-määrää nostettiin. Ajettiin NDV-positiivisia kesykyyhkynäytteitä.	Kaikki muut testatut positiiviset kontrollit monistuivat ajossa, paitsi APMV-4, NDV ja NDV HI. Testatut NDV-positiiviset kesykyyhkynäytteet monistuivat ajossa
APMV-1-referenssinäytteet	4 positiivista näytettä	APMV-1-positiivisia näytteitä tiedettiin olevan 6, monistumatta jäi kaksi näytettä, joiden Ct-arvot olivat APMV-1 real-time-RT-PCR-ajossa olleet yli 30.	6:sta APMV-1-positiivisesta näytteestä löydettiin 4.
Antigeenireferenssinäytteet (APMV-1—9)	2 positiivista näytettä	Näytteiden joukosta oli löydetty serologisin menetelmin yhteensä 2 APMV-positiivista näytettä: APMV-3, ja -6.	Kaikki paramykvoviruspositiiviset antigeenireferenssinäytteet monistuivat ajossa.
Vesilintunäytteet	2 positiivista näytettä	Positiivisten näytteiden juovat agarosigeelillä olivat hyvin haaleat ja siksi niitä kasvatettiin hedelmötetyissä kananmunissa 2.munapasaasiin asti. Näytteet sekvensoitiin ja sekvenssitietokantahaun tulosten perusteella tehtiin APMV-tyyppispesifit RT-PCR:t.	Löydettiin 2 paramykvoviruspositiivista näytettä, joista toinen oli APMV-tyyppispesifin RT-PCR:n perusteella NDVH-positiivinen ja toinen vaikutti APMV-6-positiiviselta, mutta ei monistunut APMV-6-spesifeillä alukkeilla.

Työssä käydyt lintunäytteet on yksilöity samoin kuin ne yksilöidään Evirassa, esim li 16868/14. Li-lyhenne tarkoittaa linnusta otettua näytettä. Sen perässä oleva numero on näytteen numero ja lopuksi on näytteen saapumisvuosi, tässä 2014.

5.1 APMV-1 real-time-RT-PCR ja RT-PCR

APMV-1 real-time-RT-PCR:llä ajettujen 61 vesilintunäytteen joukosta löytyi 4 positiivista. Näytteiden Ct-arvot (*cycle threshold*) olivat kuitenkin hyvin korkeita, mikä

tarkoittaa, että virusta oli näytteissä vähän. Ajon tulokset Ct-arvoineen on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. APMV-1 real-time-RT-PCR:llä saadut positiiviset näytteet ja niiden Ct-arvot.

Näyte	Ct-arvo
Li 16868/14	39,53
Li 16874/14	38,69
Li 16898/14	38,77
Li 14085/14	39,94

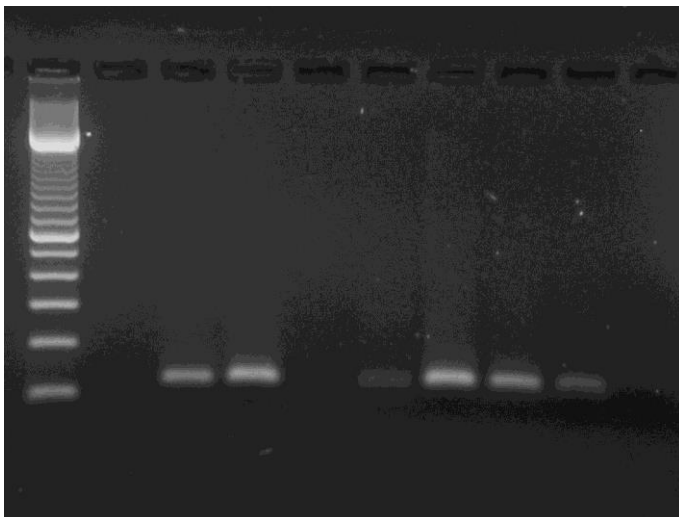
Real-time-menetelmällä löydetyt positiiviset näytteet ajettiin lisäksi APMV-1 RT-PCR:llä. RT-PCR:llä ei saatu yhtään positiivista tulosta. Tämä johtui siitä, että real-time-PCR on menetelmänä paljon herkempi kuin perinteinen PCR.

Real-time-ajon positiivisilla näytteillä infektioitiin hedelmöitettyjä kananmunia, jotta virukset olisi saatu eristettyä näytesuspensiosta tehokkaammin. Viruskasvatusta jatkettiin 2. pasaasiin saakka. Näyte li 14085/14 oli jo kasvatettu munissa, joten sitä ei enää laitettu muniin. Munista kerätyillä allantoisnesteillä tehtiin HA-testit. Kaikkien näytteiden tulokset olivat negatiiviset.

5.2 Pan-paramyxovirus RT-PCR

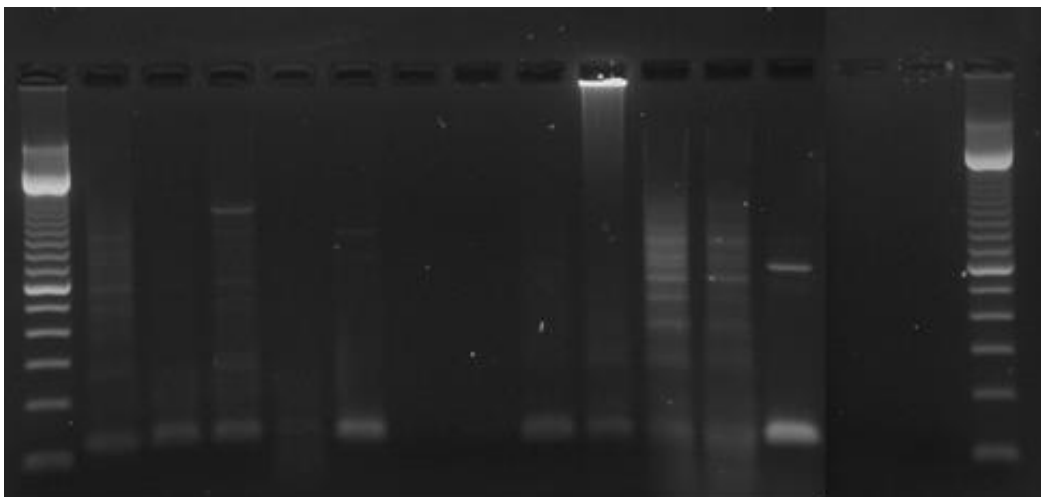
Positiiviset kontrollinäytteet

Pan-paramyxovirus RT-PCR -menetelmällä ajettiin aluksi positiiviset kontrollit: APMV-2, -3, -4, -6, -7, -8, -9 ja NDV. APMV-5 positiivista kontrollia ei ollut saatavilla, joten sitä ei voitu testata. Huomattiin, että kaikki positiiviset kontrollit saatiin monistettua RT-PCR-ajossa lukuunottamatta APMV-4 ja NDV positiivisia kontrollinäytteitä (kuva 6).



Kuva 6. Pan-paramyxovirus RT-PCR-menetelmällä ajetut positiiviset kontrollinäytteet. Vasemmalta lukien ensimmäisessä kaivossa on markkeri ja sen jälkeen: NDV, APMV-2, APMV-3, APMV-4, APMV-6, APMV-7, APMV-8, APMV-9 ja negatiivinen kontrolli.

Seuraavassa ajossa APMV-4- ja NDV-positiivinen kontrollinäyte ajettiin vielä uudelleen, jotta saatiin suljettua pois pipetoimisvirheen mahdollisuus (kuva 7). APMV-4-kontrollinäytteen RNA:n määrää kasvatettiin 2 µl:sta 4 µl:aan. Lisäksi pan-paramyxovirus RT-PCR-menetelmällä ajettiin TRT-A2, -B2 ja -C -positiiviset näytteet. Kokeiltiin myös NDVH-positiivista kontrollinäytettä ja tutkittiin toisella PCR-menetelmällä NDV-positiivisiksi saatuja kesykyyhkynäytteitä.

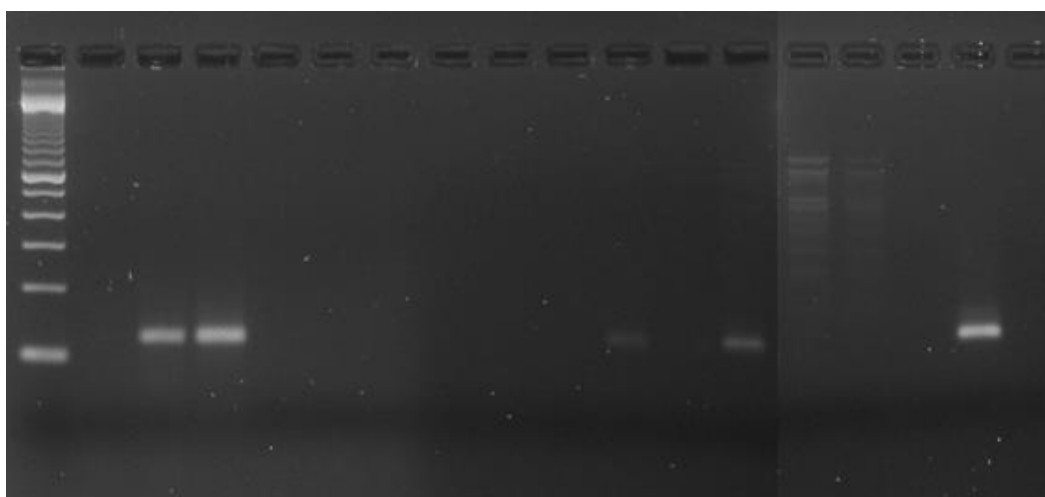


Kuva 7. Pan-paramyxovirus RT-PCR-menetelmällä ajetut positiiviset kontrollinäytteet sekä NDV-positiiviset kesykyyhkynäytteet. Vasemmalta lukien ensimmäisessä kaivossa on markkeri ja sitä seuraavat: TRT A2, TRT B2, TRT C, PMV-4, NDVH, NDV, NDV, 5 kpl NDV-positiivisia kesykyyhkynäytteitä, PMV-4 (4 µl) ja negatiivinen kontrollinäyte.

Huomattiin, ettei APMV-4-positiivisen kontrollin RNA:n määrän lisäämisellä ollut vaikutusta sen monistumiseen. Sitä ei saatu vielääkään näkyviin (kuva 7). TRT-A2, -B2 ja -C -positiiviset näytteet sekä NDVH-positiivinen kontrolli saatiin näkyviin menetelmällä. NDV-positiiviset kontrollit eivät vielääkään näkyneet. Sen sijaan toisella PCR-menetelmällä NDV-positiiviseksi testatut kesykyyhkynäytteet antoivat positiivisen tuloksen myös pan-paramyoksvirus RT-PCR -menetelmällä.

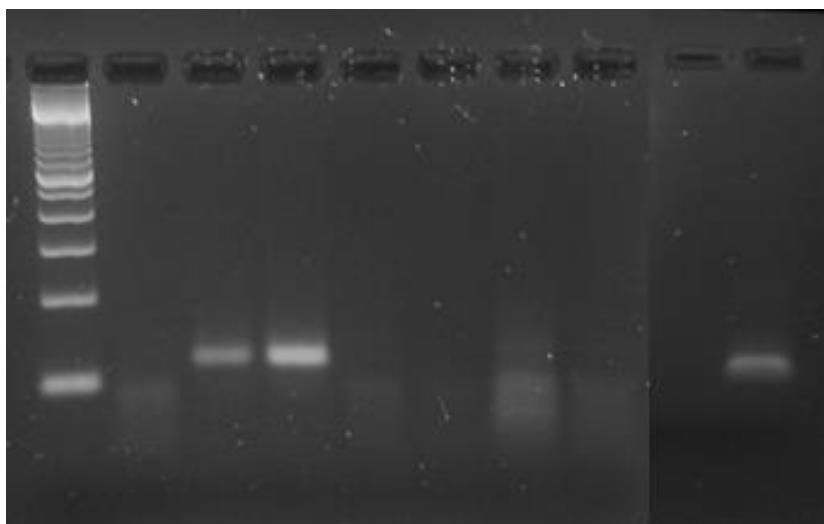
Referenssinäytteet

Eviran Eläintautivirologian tutkimusyksikön molekyylibiologian laboratorion referenssinäytteet oli testattu APMV-1 real-time RT-PCR -menetelmällä. Sillä saatuja tuloksia voitiin verrata uudella menetelmällä saataviin tuloksiin. Pan-paramyoksvirus RT-PCR:llä löydettiin neljä APMV-1-positiivista referenssinäytettä (kuva 8). Nämä näytteet olivat monistuneet myös APMV-1 real-time RT-PCR -ajossa. Real-time-menetelmällä oli saatu lisäksi kaksi muuta positiivista tulosta referenssinäytteistä, mitä ei saatu positiiviseksi uudella menetelmällä. Näiden näytteiden Ct-arvot olivat olleet yli 30. Real-time-menetelmä oli siis herkempi kuin RT-PCR-menetelmä. Kaikkien pan-paramyoksvirus RT-PCR:llä positiiviseksi saatujen näytteiden Ct-arvot olivat real-time-ajossa olleet alle 30. Samaan ajoin otettiin mukaan NDV HI -positiivinen kontrollinäyte. Se oli samalta valmistajalta kuin APMV-2-9-positiiviset kontrollinäytteet. Se ei kuitenkaan monistunut ajossa.



Kuva 8. Pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmällä ajetut Eviran molekyylibiologian laboratorion referenssinäytteet. Vasemmalta luettuna ensimmäisessä kaivossa on markkeri, sitä seuraa 14 kpl referenssinäytteitä, kaivossa 16 on NDV HI -positiivinen kontrollinäyte, kaivossa 17 APMV-3-positiivinen kontrollinäyte ja viimeisenä negatiivinen kontrollinäyte.

Pan-paramyoksovirus RT-PCR:llä ajettiin myös Eviran Eläintautivirologian tutkimusyksikön lintulaboratoriossa tutkitut antigeenireferenssinäytteet. Näytteitä oli 7 kpl, ja ne oli tutkittu serologisista menetelmin. Tiedettiin, että joukossa oli kaksi positiivista näytettä: toinen oli APMV-3- ja toinen APMV-6-positiivinen. Pan-paramyokso-menetelmällä onnistuttiin saamaan kumpikin näistä positiivisista näytteistä näkyviin (kuva 9).



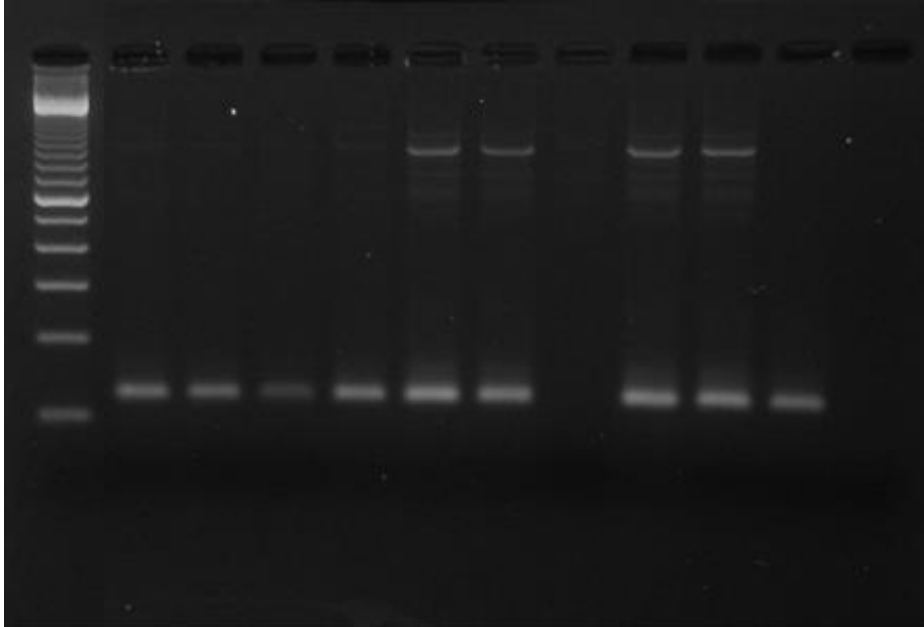
Kuva 9. Pan-paramyoksovirus RT-PCR-menetelmällä ajettut Eviran lintulaboratorion referenssinäytteet. Vasemmalta luettuna ensimmäisessä kaivossa on markkeri, sen jälkeen on 7 kpl referenssinäytteitä, kaivossa 9 on negatiivinen kontrolli ja viimeisenä APMV-3-positiivinen kontrollinäyte. Positiivisista referenssinäytteistä ensimmäinen (3. kaivo) on APMV-3-positiivinen ja toinen (4. kaivo) APMV-6-positiivinen.

Vesilintunäytteet

Työssä tutkitut vesilintunäytteet ajettiin pan-paramyoksovirus RT-PCR -menetelmällä. Jokaisessa ajossa oli mukana APMV-3-positiivinen kontrollinäyte sekä Sigma H₂O:sta eristetty RNA negatiivisena kontrollina. Vesilintunäytteiden joukosta löytyi 2 positiivista näytettä: li 16907 ja li 16915. Näytteet leikattiin agarosigeeliltä sekvensointia varten. Positiiviset näytteet näkyivät hyvin haaleina juovina geelillä. Jotta sekvensointiin olisi saatu suurempi määrä PCR-tuotetta, infektoitiin näiden kahden näytteen suspensioilla hedelmöitettyjä kananmunia.

Näytteellä li 16907 infektoiduista 5 munasta kuoli yksi ensimmäisen vuorokauden aikana, joten se heitettiin pois. Muista li 16907- ja li 16915 -näytteillä infektoiduista munista kerätyillä allantoisnesteillä ajettiin pan-paramyoksovirus RT-PCR. HA-testiä ei

tällä kertaa tehty, koska PCR-ajo haluttiin tehdä joka tapauksessa. Lähes kaikki munissa kasvatetut näytteet antoivat positiivisen tuloksen (kuva 10). Vain yksi li 16915-näytteellä infektoiduista näytteistä oli negatiivinen. Kummankin näytteen 1. munapasaasin positiivisista juovista leikattiin kaksi sekvensointia varten.



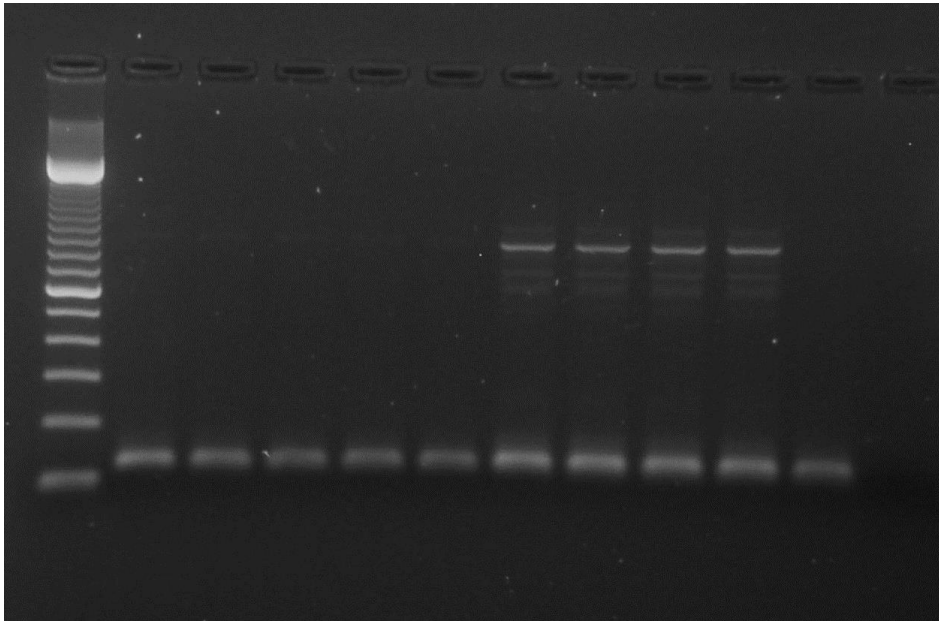
Kuva 10. Pan-paramyxovirus RT-PCR:llä ajetut vesilintunäytteet, joita on kasvatettu munissa 1. munapasaasiin asti. Vasemmalta lukien ensimmäisessä kaivossa on markkeri, seuraavissa neljässä kaivossa on näytteen li 16907/14 munista kerätyt näytteet, seuraavissa viidessä kaivossa on li 16915/14 munista kerätyt näytteet, toiseksi viimeisenä on APMV-3-positiivinen kontrollinäyte ja viimeisenä negatiivinen kontrollinäyte.

Viruskasvatusta munissa jatkettiin 2. pasaasiin. Li 16915 -näytteen munista kuoli yksi ensimmäisen vuorokauden aikana ja se heitettiin pois. Muiden 4 munan sikiöt olivat kuolleet 5 vuorokauden ikäisinä ja ne siirrettiin jääkaappiin. Näytteen li 16907 kaikki 5 munaa siirrettiin jääkaappiin 6 vuorokauden kasvatuksen jälkeen, jolloin kaikki olivat yhä elossa. Munista kerättiin allantoisnesteet ja niille tehtiin HA-testi. Taulukossa 9 ovat HA-testin tulokset. Näytteen tiitteri vastaa suurinta antigeenilaimennosta, jolla tulos oli positiivinen eli kukon punasolut olivat agglutinoituneet. Näytteen perässä olevalla merkinnällä $(z)_5$ tai $(z)_6$ tarkoitetaan, että sikiö on kuollut joko 5 tai 6 vuorokauden ikäisenä. Huomattiin, että viruseristys munissa oli onnistunut hyvin ja viruksen määrä 2. munapasaasin näytteissä oli suuri.

Taulukko 9. Li 16907- ja li 16915 -näytteiden 2. munapasaasin allantoisnesteillä tehdyn HA-testin tulokset.

Näyte	Tiitteri
Li 16907/14 2. munapasaasi (z) ₆ 1. muna	1:32
Li 16907/14 2. munapasaasi (z) ₆ 2. muna	1:8
Li 16907/14 2. munapasaasi (z) ₆ 3. muna	1:64
Li 16907/14 2. munapasaasi (z) ₆ 4. muna	1:32
Li 16907/14 2. munapasaasi (z) ₆ 5. muna	1:32
Li 16915/14 2. munapasaasi (z) ₅ 1. muna	1:512
Li 16915/14 2. munapasaasi (z) ₅ 2. muna	1:512
Li 16915/14 2. munapasaasi (z) ₅ 3. muna	1:512
Li 16915/14 2. munapasaasi (z) ₅ 4. muna	1:128

2. munapasaasin allantoisnesteistä eristetyillä RNA:illa ajettiin pan-paramyoksvirus RT-PCR. Kaikki näytteet antoivat positiivisen tuloksen (kuva 11). Sekä näytteen li 16907 että li 16915 bändeistä valittiin kaksi, jotka leikattiin agarosigeeliltä sekvensointia varten.



Kuva 11. Pan-paramyoksvirus RT-PCR:llä ajetut vesilintunäytteet, joita on kasvatettu munissa 2. munapasaasiin asti. Vasemmalta lukien ensimmäisessä kaivossa on markkeri, seuraavissa viidessä kaivossa on näytteen li 16907/14 munista kerätyt näytteet, seuraavissa neljässä kaivossa on li 16915/14 munista kerätyt näytteet, toiseksi viimeisenä on APMV-3-positiivinen kontrollinäyte ja viimeisenä negatiivinen kontrollinäyte.

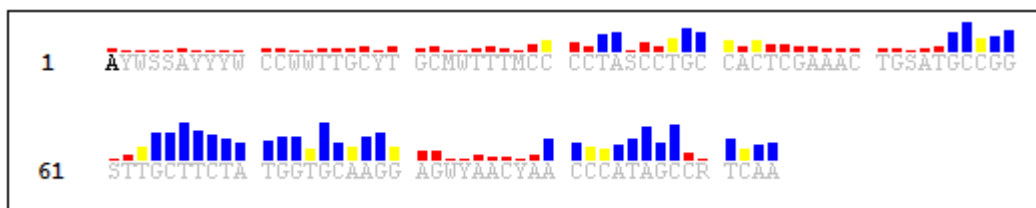
Sekvensointi

Ensimmäiseksi sekvensoitiin näytteet li 16907 ja li 16915, jotka oli ajettu pan-paramyoksovirus RT-PCT-menetelmällä (taulukko 10). Näytteitä ei oltu vielä kasvatettu hedelmöitettyissä munissa, joten viruksen määrä oli melko pieni. Sen vuoksi ei odotettu, että saadut sekvenssit olisivat olleet laadukkaita. Sekvensoinnissa käytettiin pan-paramyokso-menetelmän alukkeita PMX1 ja PMX2.

Taulukko 10. Ensimmäisen sekvensointikerran näytteet ja syklisekvensoinnissa käytetyt alukkeet.

	Näyte	Aluke
1	Li 16907/14	PMX1
2	Li 16907/14	PMX2
3	Li 16915/14	PMX1
4	Li 16915/14	PMX2

Tulokseksi saatiinkin melko heikkolaatuisia sekvenssejä, joista paras on esitetty kuvassa 12. Sekvenssissä nähdään luotettavat tulokset sinisinä, korkeina pylväinä ja laadultaan heikko sekvenssi punaisella. Keltaisella merkityt pylväät ovat laadultaan siltä väliltä.



Kuva 12. Näytteen li 16907 sekvenssi, joka on saatu alukkeella PMX1. Näytettä ei ole kasvatettu hedelmöitettyissä kananmunissa.

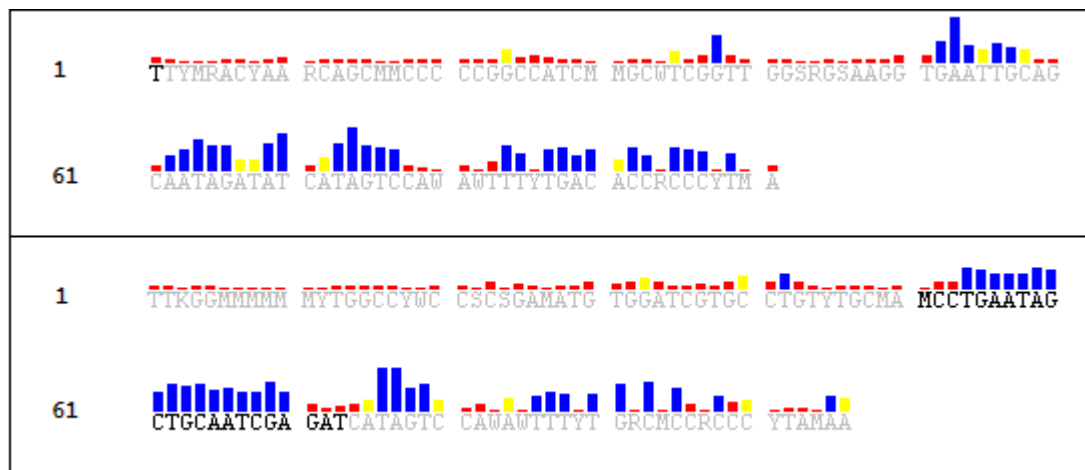
Saadut sekvenssit syötettiin NCBI:n BLAST -hakuun [21]. Hakutulos osoitti, että näyte li 16907 olisi APMV-6-positiivinen. Alukkeella PMX1 saadusta sekvenssistä 34 nukleotidia vastasi 92 %:sesti tietokannassa olevan APMV-6:n sekvenssiä. Näytteen li 16915 sekvenssi taas vastasi haun perusteella parhaiten NDV:tä. Näyte oli kuitenkin jo testattu APMV-1-negatiiviseksi, joten tulos ei ollut luotettava. Yhtäjaksoisen laadukkaan sekvenssin pituuden tulisi olla pidempi kuin saaduissa tuloksissa, jotta BLAST-haulla voitaisiin saada selkeämpiä tuloksia. Seuraavaksi sekvensoitiinkin hedelmöitettyissä

kananmunissa kasvatettuja näytteitä. 1. munapasaasin näytteet ja niiden kanssa syklistekvensoinnissa käytetyt alukkeet ovat taulukossa 11.

Taulukko 11. Toisen sekvensointikerran näytteet ja syklistekvensoinnissa käytetyt alukkeet.

Näyte		Aluke
1	Li 16907 1. munapasaasi (z) ₆ 1. muna	PMX1
2	Li 16907 1. munapasaasi (z) ₆ 1. muna	PMX2
3	Li 16907 1. munapasaasi (z) ₆ 4. muna	PMX1
4	Li 16907 1. munapasaasi (z) ₆ 4. muna	PMX2
5	Li 16915 1. munapasaasi (z) ₆ 2. muna	PMX1
6	Li 16915 1. munapasaasi (z) ₆ 2. muna	PMX2
7	Li 16915 1. munapasaasi (z) ₆ 4. muna	PMX1
8	Li 16915 1. munapasaasi (z) ₆ 4. muna	PMX2

Tulokseksi saatiin hieman laadukkaampia sekvenssejä (kuva 13) kuin ensimmäisessä ajossa. Vieläkään ei saatu tarpeeksi yhtäjaksoista laadukasta sekvenssiä, jonka avulla olisi voitu luotettavasti selvittää, mistä paramykosviruksesta oli kyse. NCBI:n BLAST-hakuun [21] syötettäessä näyte li 16907 vaikutti edelleen olevan todennäköisimmin APMV-6. Sen vuoksi suunniteltiin ja tilattiin alukkeet RT-PCR-menetelmää varten, jonka avulla pystyttiin toteamaan APMV-6-positiiviset näytteet. 2. munapasaasin näytteistä eristetyillä RNA:illa ajettiin APMV-6 RT-PCR. Ajoon otettiin mukaan myös li 16915 -näytteet. Sekä li 16907- että li 16915 -näytteiden tulokset olivat kaikki negatiivisia. Kyseessä ei siis ollut APMV-6, vaan jokin toinen paramykosvirus.



Kuva 13. Näytteiden li 16907 ja li 16915 sekvenssit, kun näytteitä on kasvatettu hedelmötetyissä kananmunissa 1. munapasaasiin asti. Ylempänä li 16907, 1. muna, aluke PMX2 ja alempana li 16915, 4. muna, aluke PMX2.

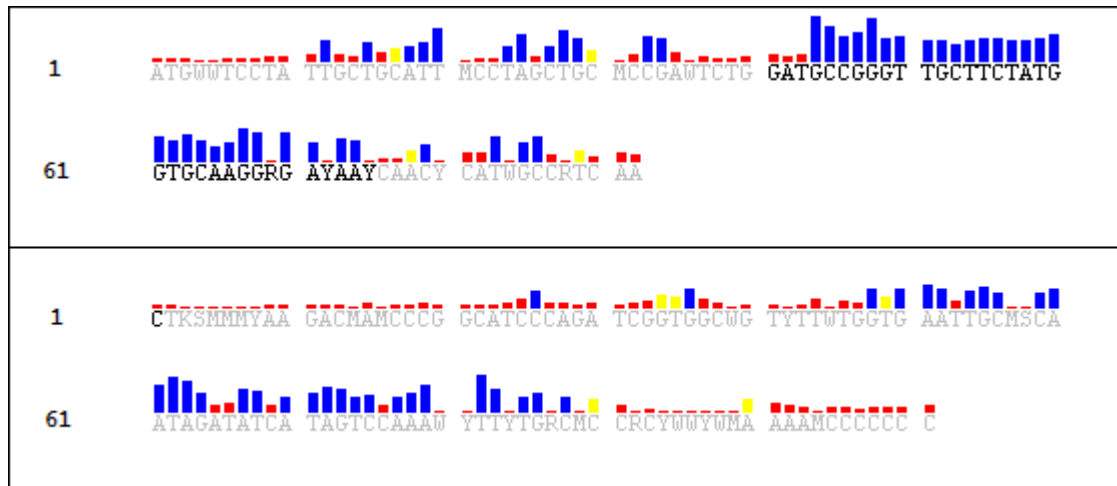
Näyte li 16915 vastasi NCBI:n BLAST-haun [21] mukaan edelleen eniten NDV:tä. Sen vuoksi näytteet ajettiin vielä varmuuden vuoksi kahdella RT-PCR-menetelmällä, joista toisella voitiin todeta NDV- ja toisella NDVH-positiiviset näytteet. NDVH RT-PCR:ssä käytettävällä alukeparilla saadaan esiin Glas I -virukset, jotka ovat pääasiassa villilinnuista eristettäviä matalapatogeenisia kantoja. Ajoon otettiin mukaan myös li 16907:n 2.munapasaasin allantoisnesteistä eristetyt RNA:t. Tulokset osoittivat, että näyte li 16915 oli NDVH-positiivinen. Li 16907 sen sijaan ei ollut NDV- eikä NDVH-positiivinen.

Kolmas sekvensointi tehtiin 2. munapasaasin viruseristysnäytteistä (taulukko 12) ja li 16915 -näytteiden sekvensoimisessa käytettiin NDVH:n alukkeita. Näytteen li 16907 sekvensointi tehtiin edelleen pan-paramyokso-menetelmän alukkeilla PMX1 ja PMX2.

Taulukko 12. Kolmannen sekvensointikerran näytteet ja syklisekvensoinnissa käytetyt alukkeet.

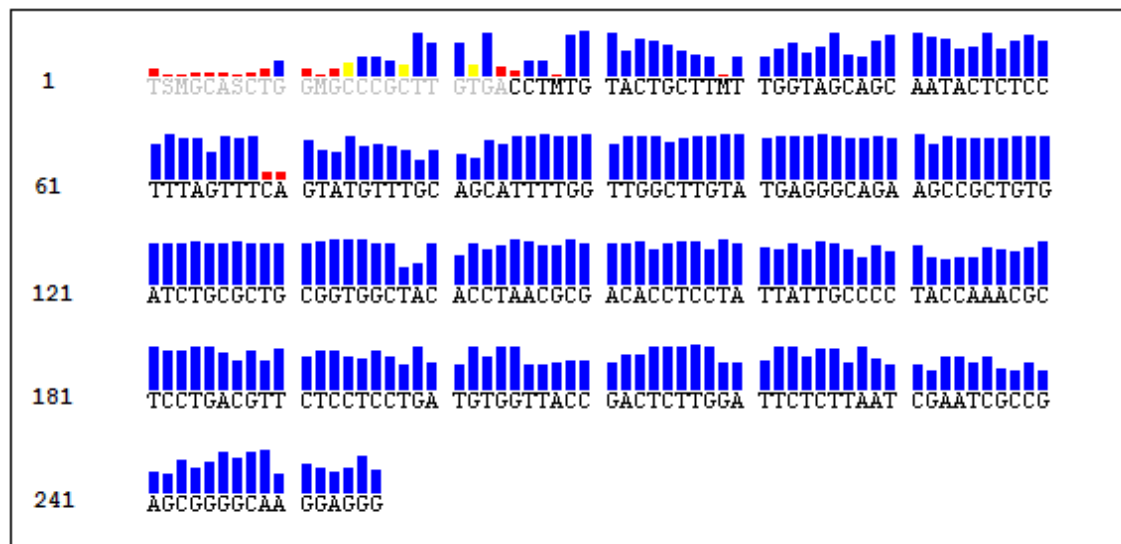
	Näyte	Aluke
1	Li 16907 2. munapasaasi (z) ₆ 1. muna	PMX1
2	Li 16907 2. munapasaasi (z) ₆ 1. muna	PMX2
3	Li 16907 2. munapasaasi (z) ₆ 2. muna	PMX1
4	Li 16907 2. munapasaasi (z) ₆ 2. muna	PMX2
5	Li 16915 2. munapasaasi (z) ₅ 1. muna	NDVH1
6	Li 16915 2. munapasaasi (z) ₅ 1. muna	NDVH2
7	Li 16915 2. munapasaasi (z) ₅ 2. muna	NDVH1
8	Li 16915 2. munapasaasi (z) ₅ 2. muna	NDVH2

PMX1- ja PMX2-alukkeilla saadut sekvenssit (kuva 14) olivat jälleen hieman parempia kuin aiemmilla sekvensointikerroilla. Huomattavaa eroa 1. munapasaasin näytteiden sekvensointituloksiin ei kuitenkaan ollut. NCBI:n BLAST-haulla [21] saatiin tulokseksi, että näyte li 16907 vastasi edelleen parhaiten APMV-6:n sekvenssiä.



Kuva 14. Näytteen li 16907 sekvenssit, kun viruskasvatusta hedelmöitettyissä kananmunissa on jatkettu 2. munapasaasiin asti. Ylempänä 1. munasta saatu näyte on sekvensoitu alukkeella PMX1 ja alempana 2. munasta otettu näyte on sekvensoitu käyttäen aluketta PMX2.

NDVH-alukkeilla sekvensoitujen li 16915-näytteiden sekvenssit (kuva 15) olivat paljon paremmat kuin PMX1- ja PMX2-alukkeilla saadut sekvenssit. Yhtäjaksoista hyvälaatuista sekvenssiä oli paljon, ja ne voitiin syöttää NCBI:n BLAST-hakuun [21] odottaen hyvin luotettavia tuloksia. Sekvenssit vastasivat haun perusteella parhaiten tietokannan NDV-sekvenssejä.



Kuva 15. Näytteen li 16915 sekvenssi, kun viruskasvatusta hedelmöitettyissä kananmunissa on jatkettu 2. munapasaasiin asti. Sekvensoitu näyte on saatu 2. munasta ja alukkeena on käytetty NDVH2:ta.

Menetelmän toimivuus

Pan-paramyoksvirus RT-PCR-menetelmällä ei saatu monistettua APMV-4-positiivista näytettä. Työssä käytetty positiivinen kontrolli Duck/Hongkong/D3/75 oli sama, joka oli listattu alkuperäisessä julkaisussa käytettyjen positiivisten kontrollien listassa [20, s. 3]. Myöskään tässä työssä tutkitut NDV-positiiviset kontrollinäytteet eivät antaneet positiivista tulosta. Sen sijaan toisella PCR-menetelmällä NDV-positiiviseksi todetut kesykyhkynäytteet todettiin positiivisiksi myös pan-paramyokso-menetelmällä.

Jotta saatiin lisää tietoa, miksi PMV-4-positiivinen kontrolli ei monistunut pan-paramyoksvirus RT-PCR-ajossa, haettiin NCBI-tietokannasta käytetyn kontrollin sekvenssi ja rinnastettiin siihen alukkeet PMX1 ja PMX2 (kuva 16). Rinnastamisessa käytettiin apuna BioEdit Sequence Alignment Editor -ohjelmaa [23]. Huomattiin, että sekvenssit erosivat toisistaan alukkeen PMX1 kohdalla 3 peräkkäisen nukleotidin verran ja alukkeen PMX2 kohdalla vain yhden nukleotidin verran.

```

5' - GARGGIYII ITGYCARAARNTNTGGAC -3' (PMX1)
5' GAAGGCCTC CAACAAAAACTATGGAC . . . GGGGATAACCAAGTTTTGGCGATTA 3' (PMV-4)

3' CTTCCGGAGGTTGTTTTTGATACCTG . . . CCCCTATTGGTTCAAAACCGCTAAT 5' (PMV-4)
3' - CCNCTRTTRGTYIRITAW CGIYAIT -5' (PMX2)

```

Kuva 16. Alukkeiden PMX1 ja PMX2 sekvenssit rinnastettuna PMV-4:n cDNA-sekvenssiin. Lihavoidulla näkyy APMV-4:n juosteiden sekvenssit. Siihen on rinnastettuna 5'-3'-juosteessa aluke PMX1 ja sen vastinjuosteessa aluke PMX2. Punaisella on merkitty ne kohdat sekvenssistä, joissa alukkeiden nukleotidijärjestys poikkeaa templaattista.

Alukkeisiin PMX1 ja PMX2 rinnastettiin BioEdit Sequence Alignment Editor -ohjelmalla [23] myös APMV-2, -3, -5, -6, -7, ja -8 sekä NDV. Rinnastuksen tuloksena oli, ettei mikään toinen näistä sekvensseistä eronnut alukkeiden nukleotidijärjestyksestä yli yhden peräkkäisen nukleotidin verran. APMV-3:n sekvenssi poikkesi APMV-4:n jälkeen eniten alukkeiden sekvensseistä. APMV-3:n sekvenssissä oli kuitenkin vain neljä kappaletta yhden peräkkäisen nukleotidin poikkeamia. APMV-4 ei siis monistunut todennäköisesti juuri sen vuoksi, että aluke PMX1 ei sitoutunut siihen tarpeeksi tehokkaasti usean peräkkäisen nukleotidin poikkeaman vuoksi.

Julkaistussa menetelmässä APMV-4:n monistuminen oli onnistunut. Julkaisussa oli käytetty eri reagensseja kuin tässä työssä ja lisäksi siinä oli käytetty yksivaiheisen RT-

PCR-menetelmän sijasta kaksivaiheista menetelmää. Nämä tekijät saattoivat mahdollistaa alukkeiden tehokkaamman sitoutumisen APMV-4:ään.

Alukkeiden ja NDV-sekvenssin rinnastuksesta ei käynyt ilmi, miksi NDV-positiiviset kontrollit eivät monistuneet pan-paramyoksovirus RT-PCR-ajossa. Ensimmäinen testattu NDV-positiivinen kontrolli oli saatu Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikköön saapuneesta positiivisesta näytteestä. Positiivinen näyte oli tehty inaktiiviseksi Evirassa eri menetelmällä kuin muut käytetyt kontrollinäytteet, jotka oli valmiiksi inaktivoituja. Tämä saattoi vaikuttaa kontrollinäytteen monistumiseen pan-paramyokso-menetelmällä. Toisaalta työssä testattu NDV HI -positiivinen kontrolli oli samalta valmistajalta kuin APMV-2-9-positiiviset kontrollinäytteet. Sitäkään ei silti onnistuttu monistamaan pan-paramyokso-menetelmällä.

Huomattiin, ettei menetelmässä käytetyillä degeneroiduilla alukkeilla saatu sekvensoinnissa kovinkaan hyviä tuloksia. Yhtäjaksoista laadukasta sekvenssiä saatiin niin lyhyitä pätkiä, ettei niitä NCBI:n BLAST-hakuun [21] syöttämällä saatu yksiselitteisiä tuloksia. Alukkeiden monistama alue oli hyvin lyhyt varsinkin sekvensointia ajatellen, mikä vaikutti omalta osaltaan myös sekvensoinnin tulosten laatuun. Menetelmän ideana oli juuri se, että eri paramyoksovirusten sekvenssit erosivat alukkeiden monistamalla alueella huomattavasti toisistaan. Sen perusteella ne oli tarkoitus pystyä erottamaan samoja alukkeita sekvensoinnissa hyödyntäen.

6 Päätelmät

Opinnäytetyön päätavoitteena oli tutkia ja testata tieteellisessä julkaisussa esitellyn kaikki lintujen paramyoksovirusten serotyypit (APMV-1—9) havaitsevan pan-paramyoksovirus RT-PCR -menetelmän toimivuutta.

Positiivisista kontrollinäytteistä menetelmällä onnistuttiin monistamaan APMV-2, -3, -6, -7, -8 ja -9 sekä TRT-A2, -B2, -C ja NDVH. APMV-5-positiivista kontrollia ei työn tehoketkellä ollut saatavilla. APMV-4- ja NDV-positiiviset kontrollit eivät monistuneet RT-PCR-ajossa, syynä oli mahdollisesti virus-stokin inaktivaatiomenetelmä, joka saattoi inhiboida PCR-reaktiota. APMV-4-positiivisen kontrollin sekvenssi erosi kolmen peräkkäisen nukleotidin verran alukkeen PMX1-sekvenssistä, mikä myös saattoi olla syy monistumisen epäonnistumiseen.

Opinnäytetyön tavoitteena oli lisäksi selvittää, oliko otoksessa vesilinnuista otettuja näytteitä (61 kpl) lintujen paramyxovirusia. Näytteet oli kerätty Maaningan Lapinjärvien linnuista vuonna 2014. Suomessa paramyxovirusten aiheuttamia tartuntoja esiintyy siipikarjassa hyvin vähän, mikä käy ilmi myös siitä, että Suomi on saanut siipikarjan rokotusvapaan aseman EU:ssa. Tutkitut näytteet olivat kuitenkin luonnonvaraisista vesilinnuista. On arvioitu, että paramyxovirusia voi levitä muuttolintujen ja muidenkin luonnonvaraisten lintujen välityksellä. Sen vuoksi voitiin olettaa, että tutkitussa näytejoukossa olisi ollut joitakin paramyxoviruspositiivisia näytteitä.

Vesilintunäytteet tutkittiin aluksi Eviron eläintautivirologian tutkimusyksikössä jo ennestään käytössä olevalla erittäin herkällä APMV-1 real-time RT-PCR-menetelmällä. Sillä löydettiin 4 APMV-1-positiivista näytettä. Virusmäärät olivat niissä hyvin pieniä, mikä ilmeni korkeista Ct-arvoista. Näytteitä kasvatettiin hedelmötetyissä kananmunissa, jotta virukset olisi saatu tehokkaammin eristettyä näytteistä. Virusten eristäminen ei kuitenkaan onnistunut, mikä on hyvin yleistä, mikäli näytteiden infektiiviteetti on laskenut jostakin syystä (esimerkiksi kylmäketju näytteen kuljetuksessa on katkennut).

Seuraavaksi kaikki 61 vesilintunäytettä tutkittiin käyttöön otetulla pan-paramyxovirus RT-PCR -menetelmällä. Positiivisia näytteitä löytyi 2 kappaletta. Nämä näytteet sekvensoitiin. Sekvensoimalla oli tarkoitus selvittää, mikä paramyxovirus oli kyseessä. Jotta PCR-tuotetta saatiin tarpeeksi suuri määrä sekvensointia varten, kasvatettiin näytteitä hedelmötetyissä kananmunissa 2. munapasaasiin asti.

Sekvensoiminen osoittautui odotetusti haastavaksi. Pan-paramyxovirus RT-PCR -menetelmän degeneroidut alukkeet PMX1 ja PMX2 eivät toimineet sekvensoinnissa niin hyvin kuin olisi toivottu. Alukkeiden monistaman alueen pituus oli vain 70 nukleotidia, mikä on erittäin lyhyt pätkä sekvensointia ajatellen. Sekvenssi ei lähes koskaan ole laadukasta heti sekvensoitavan juosteen alussa, joten laadukasta sekvenssiä saadaan näin lyhyestä pätkästä todella vähän. Alukkeissa PMX1 ja PMX2 oli niiden kaikista nukleotideista noin kolmannes vaihtelevia emäksiä. Se saattoi osaltaan vaikuttaa sekvensoimisen onnistumiseen. Alukkeilla PMX1 ja PMX2 saatiin parhaimmillaan noin 25 nukleotidin mittainen onnistunut yhtäjaksoinen osa sekvenssiä. Jotta NCBI:n BLAST-haulla [21] olisi saatu selville, mistä paramyxoviruksesta oli kyse, olisi tarvittu pidempi pätkä sekvenssiä.

Vaikka pan-paramyksen virus RT-PCR -menetelmä ei toiminut käytännössä niin hyvin kuin oli odotettu, se täydentää oivallisesti Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikön APMV-diagnostiikkaa. Menetelmä mahdollistaa myös muiden APMV-tyyppien kuin APMV-1:n toteamisen siipikarja- ja luonnonlintunäytteistä. Pan-paramyksen virus RT-PCR:llä positiivisiksi saadut näytteet vaativat jatkotutkimuksia todellisen APMV-alatyypin selvittämiseksi. Käytännössä tämä tarkoittaa serotyyppispesifien RT-PCR-ajojen ja sekvensointien toteuttamista. Toisena vaihtoehtona voisi olla uuden degeneroidun alukeparin suunnitteleminen siten, että niiden monistaman alueen pituus olisi huomattavasti nykyistä pidempi. Näin voitaisiin saada sekvensoinnilla pidempiä osia BLAST-hakuun soveltuvaa sekvenssiä ja lisäksi voisi olla mahdollista havaita myös APMV-4-positiiviset näytteet.

Lähteet

- 1 Maclachlan, James, Dubovi, Edward & Fenner, Frank. 2011. Fenner's Veterinary Virology. 4th ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press.
- 2 Virus Taxonomy: 2014 Release. 2014. Verkkodokumentti. International Committee on Taxonomy of Viruses. <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Luettu 12.10.2015.
- 3 Samal, Siba. 2011. The Biology of Paramyxoviruses. Norfolk: Caister Academic Press.
- 4 Miller, P., Afonso, C., Spackman, E., Scott, M., Pedersen, J., Senne, D., Brown, J., Fuller, C., Uhart, M., Karesh, W., Brown, I., Alexander, D. & Swayne, D. 2010. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702635>>. Luettu 5.8.2015.
- 5 Briand, François-Xavier, Henry, Aurélie, Massin, Pascale & Jestin, Véronique. 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416274/>>. Luettu 5.8.2015.
- 6 Terregino, C, Aldous, E., Heidari, A., Fuller, C., De Nardi, R., Manvell, R., Beato, M., Shell, W., Monne, I., Brown, I., Alexander, D. & Capua, I. 2013. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23708253>>. Luettu 5.8.2015.
- 7 Nayak, Baibaswata, Dias, Flavia Militino, Kumar, Sachin, Paldurai, Anandan, Collins, Peter & Samal, Siba. 2012. Avian paramyxovirus serotypes 2-9 (APMV - 2-9) vary in the ability to induce protective immunity in chickens against challenge with virulent Newcastle disease virus (APMV-1). Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290449/>>. Luettu 5.8.2015.
- 8 Munir, Muhammad & Zohari, Siamak. 2013. Mononegaviruses of Veterinary Importance, Volume I: Pathobiology and Molecular Diagnosis. Boston: CABI.
- 9 Maa- ja metsätalousministeriön asetus vastustettavista eläintaudeista ja niiden luokittelusta 843/2013. 2013. Verkkodokumentti. FINLEX. <<http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20130843>>. Luettu 4.8.2015.
- 10 Newcastlel tauti. 2015. Verkkodokumentti. Evira. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten+terveys+ja+elaintaudit/elaintaudit/sii+pikarja/newcastlentauti/>>. Päivitetty 9.1.2015. Luettu 3.8.2015.

- 11 Velayudhan, Binu T. 2006. Pathogenesis of Avian Metapneumovirus Type C Infection in Turkeys. Minnesota: University of Minnesota.
- 12 Kannan, Ganapathy. 2007. Avian metapneumovirus – an elusive pathogen of chickens (Part 1). Verkkodokumentti. World Poultry. <http://www.worldpoultry.net/PageFiles/32331/001_boerderij-download-WP6824D01.pdf>. Luettu 20.7.2015.
- 13 Siipikarjan pneumovirustartunta (APV-tauti). 2015. Verkkodokumentti. Evira. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elaimet/elainten+terveys+ja+elaintaudit/elaintaudit/sii-pikarja/art+trt/>>. Päivitetty 3.9.2015. Luettu 12.10.2015.
- 14 QIAGEN OneStep RT-PCR Handbook. 2012. Verkkodokumentti. Qiagen. <<https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=57743726-84e1-423a-9d8f-a3fa89bbe7eb&lang=en>>. Luettu 12.10.2015.
- 15 Huovilainen, Anita. 2015. Erikoistutkija; jaostopäällikko, Evira. Helsinki. Sähköpostikeskustelu. 24.7.2015.
- 16 Sharma, S. & Adlakha, S (eds.). 1996. Textbook of Veterinary Microbiology. New Delhi: Vikas Publishing House Pvt Ltd.
- 17 Spackman, Erica (ed.). 2008. Methods in molecular biology 436: Avian Influenza Virus. New Jersey: Humana Press.
- 18 Ek-Kommonen, Christine. 2013. Lintujen paramyxovirusten osoittaminen HA-testillä. Menetelmäohje. Evira, Eläintautivirologian tutkimusyksikkö. Helsinki: Evira.
- 19 DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide. 2009. Verkkodokumentti. 2nd ed. Applied Biosystems. <https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/geraldocuments/cms_041003.pdf>. Luettu 1.7.2015.
- 20 van Boheemen, Sander, Bestebroer, Theo, Verhagen, Josanne, Osterhaus, Albert, Pas, Suzan, Herfst, Sander & Fouchier, Ron. 2012. A Family-Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study. Verkkodokumentti. PLOS One. <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034961>>. Luettu 10.7.2015.
- 21 NCBI BLAST blastn suite. Verkkodokumentti. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch>. Luettu 1.8.2015.
- 22 QIAquick® Spin Handbook. 2006. Verkkodokumentti. <http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/QIAquick_Spin_Handbook.pdf>. Luettu 14.10.2015.

- 23 BioEdit Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP/7. 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>>. Luettu 5.7.2015.

Laitteet ja reagenssit

Työssä käytetyt laitteet ovat taulukossa 1. Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä oli yksilöity PCR-laitteet antamalla niille nimet. Nämä nimet näkyvät lainausmerkeissä laite-sarakkeessa. Käytetyt reagenssit on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 1. Työssä käytetyt laitteet.

Laite	Valmistaja	Malli
Real-time-PCR-laite	BioRad	CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cyclers
“Bertta”-PCR-laite	MJ Research Inc.	PTC-100™ Programmable Thermal Controller
“Cecilia”-PCR-laite	MJ Research Inc.	PTC-100™ Peltier Thermal Cyclers
“Ykä”-PCR-laite	Applied Biosystems	Veriti 96 well Thermal Cyclers, Model # 9902
Ravistelulaite	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Sentrifugi	Heraeus	Sorvall Biofuge fresco, max 13 000 rpm
Sentrifugi	Hettich Zentrifugen	Hettich Mikro 20
Sekvensaattori	Applied Biosystems	HITACHI 3130 Genetic Analyzer
Eristysautomaatti	Qiagen	Qiacube
Lämpölohko	Biometra	TB1 Thermalblock
Elektroforeesin virtalähde	BioRad	PowerPac Universal, 500 V, 2.5 A, 500 W
Elektroforeesin ajokammio	Thermo Scientific	Owl™ EasyCast™ B2

Työssä käytettiin neljää eri alukeparia: PMX1 ja PMX2, NDVF ja NDVR, NDV1 ja NDV2 sekä PMV6a ja PMV6b. PMV6a- ja PMV6b-alukkeet suunniteltiin ja tilattiin, jotta pan-paramyxovirus RT-PCR-ajossa positiivisiksi todetut näytteet, jotka vastasivat sekvensseiltään parhaiten APMV-6:sta, voitiin tutkia APMV-6:n varalta. Kaikki työssä käytetyt alukkeet ja niiden sekvenssit olivat:

- PMX1 ja PMX2: 5'- GAR GGI YII TGY CAR AAR NTN TGG AC -3' ja 5'- TIA YIG CWA TIR IYT GRT TRT CNC C -3'
- NDVF ja NDVR: 5'- GAG CTA ATG AAC ATT CTT TC -3' ja 5'- AAT AGG CGG ACC ACA TCT G -3'
- NDV1 ja NDV2: 5'- CTG CCA CTG CTA GTT GXG ATA ATC C -3' ja 5'- CCT TGG TGA XTC TAT CCG XAG -3'

- PMV6a ja PMV6b: 5'- GCC GAC CCG TAC TCA TTA AA -3' ja 5'- CAC GCT TTG GGT ATT CCA CT -3'.

Taulukko 2. Työssä käytetyt reagenssit.

Menetelmä	Reagenssi	Kataloginnumero	Valmistaja	Lisätietoa
RNA-eristys	ETAX A, min 94,0 paino-% 96,1 til-%	-	ALTIA Oyj	Helposti syttyvä neste ja höyry. Ärsyttää voimakkaasti silmiä.
Käsin	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (250)	52906	QIAGEN	Säilytys RT
Qiacube-laitteella	QIAamp® Viral RNA Mini QIAcube Kit (240)	52926	QIAGEN	Säilytys RT
Real-time-RT-PCR ja RT-PCR	® OneStep RT-PCR Kit:		QIAGEN	Säilytys -20 °C
	Buffer 5 x (Contains 12.5 mM MgCl ₂)	1012889		
	OneStep RT-PCR Enzyme Mix (2 µl/reaction)	1012890		
	dNTP Mix (10 mM each)	1005631		
	RNase-Free Water	1012888		
	RNase Inhibitor 2,000 U (20 U/µl)	100021540	Applied Biosystems	Säilytys -20 °C
	MgCl ₂ (25mM)	-	Applied Biosystems	Säilytys -20 °C
APMV-1 real-time-RT-PCR	Alukkeet: NDVR (50 pmol/µl) NDF (50 pmol/µl) Koettimet: ND pro 1 (50 pmol/µl) ND pro 2 (50 pmol/µl)	-	Oligomer Oy	Säilytys -20 °C
APMV-1-RT-PCR	Alukkeet: NDV1 (50 pmol/µl) NDV2 (50 pmol/µl)	-	Oligomer Oy	Säilytys -20 °C
Pan-paramyoksovirus RT-PCR	Alukkeet: PMX1 (50 pmol/µl) PMX2 (50 pmol/µl)	-	Oligomer Oy	Säilytys -20 °C
Syklisekvensointi	PMX1 (1 pmol/µl) PMX2 (1 pmol/µl) BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit Terminator Ready Reaction Mix RR-100 BDv1.1 5 x puskuri	4336774	Applied Biosystems	Säilytys -20 °C
Syklisekvensointituotteen puhdistus	DyeEx 2.0 Spin kit (250)	63206	Qiagen	Säilytys RT

minen				
PCR-tuotteen puhdistaminen	QIAquick Gel Extraction kit	28706	Qiagen	Säilytys RT
Agaroosigeelielektroforeesi	NuSieve 3:1 Agarose, For analysis of nucleic acids \leq 1 kb	50094	Lonza	Säilytys RT
	1 x TBE-puskuri (tilattu Eviran elatusainelaboratoriosta)	-	-	Säilytys RT
	Ethidium Bromide 0,625 mg/ml	E406-5ML	Amresco	Säilytys RT
	100 bp DNA Ladder	15628	Invitrogen	Säilytys +4 °C
	Gel loading solution	62526	Sigma	Säilytys RT