



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

AKUUTIN GASTROENTERIITIN AIHEUTTAJAVIRUSTEN TUNNISTAMINEN MULTIPLEX-PCR -MENETELMÄLLÄ

Siru Koskinen

Linda Luoma

Hanna Saari

Opinnäytetyö
Lokakuu 2016
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

KOSKINEN SIRU, LUOMA LINDA & SAARI HANNA:

Akuutin gastroenteriitin aiheuttajavirusten tunnistaminen multiplex-PCR -menetelmällä

Opinnäytetyö 64 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Lokakuu 2016

Akuutti gastroenteriitti, eli oksenteluna ja ripulina ilmenevä suoliston limakalvon tulehdus, on merkittävä maailmanlaajuinen terveysongelma. Virusperäiset gastroenteriitit ovat erittäin tartuntavaarallisia ja niiden aiheuttamat varotoimet kuluttavat terveydenhuollon resursseja, minkä vuoksi niiden mahdollisimman nopea diagnosoiminen potilailla on erityisen tärkeää.

Opinnäytetyössä käsiteltävä multiplex-PCR -menetelmä mahdollistaa useiden eri virusten tunnistamisen samanaikaisesti yhdellä testillä. Tarkoituksena oli vertailla kolmea eri multiplex-PCR -tunnistusmenetelmää toisiinsa. Vertailussa tutkittavia viruksia olivat adeno-, astro-, noro-, sapo- ja rotavirus.

Opinnäytetyön tilaajana toimi Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian yksikkö, jossa opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin 5.-9.10.2015. Opinnäytetyö oli kokeellinen, kvantitatiivinen ja vertaileva tutkimus, jonka tehtävänä oli vertailla multiplex-PCR -tunnistusmenetelmien toimintaa sekä soveltuvuutta laboratorion rutiinikäyttöön. Tavoitteena oli tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:lle luotettavaa vertailutietoa, jonka pohjalta valita molekyylibiologian yksikön käyttöön parhaiten sopiva menetelmä.

Tutkimuksessa olivat mukana R-Biopharmen RIDA®GENE Viral Stool Panel 1, Fast-Track Diagnosticsin FTD Viral gastroenteritis ja Seegenen Allplex™ Gastrointestinal Infection Full Panel tunnistusmenetelmät. Näistä käytettävyydeltään parhaiten Fimlab Laboratoriot Oy:lle sopi Seegenen Allplex™ GI-Virus Assay. RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 puolestaan ei ollut validoitu Fimlab Laboratoriot Oy:n tämänhetkiselle laitteistolle, mikä näkyi poikkeavina tuloksina. Muuten menetelmissä ei ollut tulosten suhteen eroja.

Opinnäytetyön otoskoko osoittautui muiden kuin norovirusten kohdalla vähäiseksi, minkä vuoksi jatkotutkimuksia pitäisi tehdä suuremmalla näytemäärällä. Myös, mikäli Fimlab Laboratoriot Oy päätyy valitsemaan RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 -menetelmän rutiinidiagnostiikkaansa, kyseinen menetelmä tulisi validoida ja koestaa uudelleen.

Asiasanat: akuutti gastroenteriitti, virusdiagnostiikka, multiplex-PCR, norovirus, rotavirus, adenovirus, astrovirus, sapovirus

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

KOSKINEN SIRU, LUOMA LINDA & SAARI HANNA:
The Use of Multiplex-PCR-Assay in the Diagnosis of Viral Gastroenteritis

Bachelor's thesis 64 pages, appendices 3 pages
October 2016

Viral gastroenteritis is a significant global risk affecting the lives of millions annually. It is highly contagious and the precautions taken to avoid its spreading cause a great strain on the healthcare industry. Therefore diagnosing and treating the disease quickly is critical.

The purpose of this study was to compare the Multiplex-PCR -assays of R-Biopharm, Fast-Track Diagnostics and Seegene. The aim was to produce verifiable results for Fimlab Laboratories Ltd so they can choose the most suitable assay for them. The study is structured in two parts: a survey on viral gastroenteritis, and a detailed report of the comparison of the assays. The comparison was made by using 94 different stool samples.

In terms of usability, the Allplex™ GI-Virus Assay from Seegene could be considered as the best choice. The assay from R-Biopharm was found to be unvalidated to the current equipment used in Fimlab Laboratories Ltd. This caused a deviation in otherwise similar test results between the assays.

The amount of positive samples can be considered insufficient and hence more research with a bigger sample size would be beneficial. It would also be advisable to validate and test the assay of R-Biopharm again, if Fimlab Laboratories Ltd chooses it.

Key words: viral gastroenteritis, viral diagnosis, multiplex-PCR, norovirus, rotavirus, adenovirus, astrovirus, sapovirus

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	8
3	OPINNÄYTETYÖSSÄ KÄYTETTÄVÄT TUTKIMUSMENETELMÄT	9
4	AKUUTTI GASTROENTERIITTI JA SEN AIHEUTTAJAVIRUKSET	12
	4.1 Virusinfektion määrittely	12
	4.2 Akuutin gastroenteriitin taudinkuva	13
	4.3 Norovirus	14
	4.4 Rotavirus	15
	4.5 Adenovirus	16
	4.6 Astrovirus.....	17
	4.7 Sapovirus	18
5	VIRUSTEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA.....	20
	5.1 Tutkimusindikaatiot	20
	5.2 Näytteenotto virustutkimuksissa.....	21
	5.3 Virusten tunnistamismenetelmät.....	22
6	MULTIPLEX-PCR	25
	6.1 PCR-menetelmä	25
	6.2 Toimintaperiaate	26
	6.3 Käyttö laboratoriodiagnostiikassa.....	29
7	VERTAILTAVIEN TUNNISTUSMENETELMIEN EROT JA YHTÄLÄISYYDET	31
	7.1 Menetelmien käyttötarkoitus	31
	7.2 Menetelmien toimintaperiaate	32
	7.3 Tunnistuskittien reagenssit ja näytteiden käsittely	33
	7.4 Yhteensopivat laitteistot	34
8	MENETELMÄVERTAILUN TOTEUTUS	35
	8.1 Lähtökohdat	35
	8.2 Näytteiden esikäsittely	35
	8.3 Nukleiinihapon eristys	36
	8.4 Näyttereagenssit	36
	8.5 Näytteiden pipetoinnit sekä PCR-ajo.....	38
9	MENETELMÄVERTAILUN TULOKSET	40
	9.1 Menetelmien käytön vertailu	40
	9.2 Saatu materiaali.....	42
	9.3 Tulosten käsittely.....	44
	9.4 Tulosten läpikäyminen.....	45

9.5 Johtopäätökset.....	49
10 POHDINTA.....	50
11 LÄHTEET	54
LIITTEET	62
Liite 1. Koestuksen tulokset	62

1 JOHDANTO

Gastroenteriitti eli suolistotulehdus on merkittävä kuolleisuuden aiheuttaja kehitysmaissa sekä huomattava taloudellinen taakka teollisuusmaiden terveydenhuollossa. Sairautta esiintyy etenkin nuorten lasten ja immuunipuutteisten potilaiden keskuudessa. (Terveyskirjasto 2009; Chow, Leung & Hon 2010; Binnicker 2015.) Akuutin gastroenteriitin oireita ovat ripuli ja oksentelu; ripuli-oksennustautiin sairastuu vuosittain arviolta noin 1,7 miljardia ihmistä (World Health Organization 2013; Binnicker 2015). Merkittäviä akuuttia gastroenteriittia aiheuttavia patogeeneja, eli taudinaiheuttajia, ovat virukset, joista yleisimpiä ovat rota-, adeno- ja astrovirus sekä kalikivirusryhmä (Terveyskirjasto 2009; Chow ym. 2010).

Virukset ovat taudinaiheuttajia, jotka vaikuttavat merkittävästi niin yksilön kuin yhteisöjen hyvinvointiin. Ehkäisyn, diagnoosin ja hoidon kannalta onkin tärkeää, että virusten luonnetta, eli niiden lisääntymistä ja taudinaiheuttamiskykyä, tutkitaan. (Carter & Saunders 2013, 3.) Virusten tunnistamiseen voidaan käyttää useita eri menetelmiä, kuten virusviljelyä, elektronimikroskopioa tai PCR:ää eli polymeraasiketjureaktiota (Cann 1999, 111; Lappalainen, Vainionpää & Hedman 2011). Reaaliaikainen PCR muistuttaa toimintaperiaatteeltaan tavallista PCR:ää, mutta siinä monistettavat kohteet visualisoidaan fluoresoivilla koettimilla (Makarewicz ym. 2015, 39). Parhaiten akuuttia gastroenteriittia aiheuttavien virusten eristykseen soveltuu ulostenäyte (Collier, Kellam, Oxford & Langdon. 2011, 319).

Opinnäytetyömme aihe on akuuttia gastroenteriittia aiheuttavien virusten tunnistaminen erilaisten multiplex-PCR-tunnistuskittien avulla. Tarkoituksenamme on vertailla kolmen eri valmistajan, R-Biopharmin, Fast-Track Diagnosticsin sekä Seegenen gastro-multiplex-PCR-tunnistuskittejä toisiinsa. Tavoitteena on, että tunnistuskittien toimivuudesta ja rutiinikäytäntöön soveltuvuudesta saadaan luotettavaa vertailutietoa, jonka pohjalta toimeksiantaja voi valita yksikön tarpeisiin sopivan menetelmän. Opinnäytetyössämme esiintyviä, multiplex-PCR-menetelmän avulla tunnistettavia gastroenteriitin aiheuttajaviruksia ovat adeno-, astro-, noro-, rota-, sekä sapovirukset.

Opinnäytetyö jakautuu kahteen eri osaan: teoreettiseen taustaan sekä menetelmäosioon, jossa raportoidaan opinnäytetyön koestusvaiheen eteneminen. Teoreettisessa osuudessa

käsitellään kunkin opinnäytetyössä käsiteltävän viruksen lisäksi yleisesti virusten laboriodiagnostiikassa hyödynnettäviä menetelmiä. Erityispainotus diagnostiikassa on kuitenkin PCR:llä sekä sen multiplex-sovellutuksella.

Opinnäytetyössä vertailtavia menetelmiä käsitellään ensin niiden menetelmään pohjautuvien yhtäläisyyksien ja erojen suhteen. Tämän jälkeen opinnäytetyöraportissa esitellään niiden käyttöön ja tuloksiin liittyviä yhtäläisyyksiä ja eroja. Opinnäytetyön menetelmäosuudessa puolestaan käsitellään menetelmien vertailu vaihe vaiheelta. Lopuksi tulokset kootaan yhteen erillisessä luvussa.

Teemme opinnäytetyön toimeksiannota Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian yksikköön, jossa tulemme suorittamaan opinnäytetyön kokeellisen osuuden aikavälillä 05.-09.10.2015. Valitsimme tämän toimeksiannon, koska halusimme tehdä opinnäytetyömme molekyylibiologian tutkimusalueelta ja pidimme viruksia mielenkiintoisena tutkimuskohteena.

2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla kolmen eri valmistajan, R-Biopharmin, Fast-Track Diagnosticsin ja Seegenen gastro-multiplex-PCR-tunnistuskitejä toisiinsa.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian yksikölle luotettavaa vertailutietoa, jonka pohjalta he voivat valita heille parhaiten sopivan tunnistuskitin.

Opinnäytetyön tutkimustehtäviä ovat tarjottujen tunnistuskittien vertailu niiden toiminnan ja laboratorion rutiinikäyttöön soveltuvuuden suhteen.

3 OPINNÄYTETYÖSSÄ KÄYTETTÄVÄT TUTKIMUSMENETELMÄT

Tutkimuksellinen opinnäytetyö voidaan toteuttaa teoreettisena tutkielmana, joka sisältää käytännön näkökulman. Yleisimmin tutkimus tehdään sille erikseen kerätyn aineiston pohjalta. Aineistoa analysoidaan joko kvalitatiivisesti eli laadullisesti tai kvantitatiivisesti eli määrällisesti. (Heikkilä 2014, 26.) Kvantitatiivisen tutkimusmenetelmän avulla voidaan kuvata muuttujien eli mitattavien ominaisuuksien välisiä suhteita ja eroja (Vilkkä 2007, 13). Koska opinnäytetyömme koostuu eri menetelmien vertailusta, valitsimme opinnäytetyömme tutkimusaiheeseen kvantitatiivisen näkökulman.

Teorialähtöinen vertailu ja aineistopohjainen analyysi kvantitatiivisessa tutkimuksessa edellyttävät määrällisten mittareiden ja niiden arvojen vertailukelpoisuutta (Pöntinen 2004, 44). Jotta tutkimustulokset olisivat luotettavia ja yleistettävissä, täytyy havaintoyksiköiden, eli tutkimuksessa analysoitavien kohteiden, määrä olla riittävä (Kananen 2008, 10, 13, 19). Mittayksiköinä kvantitatiivisessa tutkimuksessa toimivat luvut, tarkoittaen sitä, että saadut tutkimustiedot ja niistä esitettävät tulokset ovat numeerisessa muodossa, jossa niitä voidaan käsitellä tilastollisesti. Olennaiset numerotiedot selitetään sanallisesti kuvaten asioiden välisiä yhteyksiä ja eroavaisuuksia. Tuloksia ja tekstiä voidaan havainnollistaa kuvioita, taulukoita tai tunnuslukuja käyttäen. (Vilkkä 2007, 14, 117, 135; Kananen 2008, 16.)

Opinnäytetyössämme vertailemme kolmen eri valmistajan, Seegenen, Fast-Track Diagnosticsin sekä R-Biopharmin multiplex-PCR-tunnistusmenetelmiä. Koska kukin menetelmä antaa kullekin näytteelle tulokseksi vain sen, onko se tutkittavien virusten suhteen positiivinen ja negatiivinen, menetelmien antamia tuloksia voi helposti verrata toisiinsa. Tutkimuksen analysoitavina kohteina käytettiin yhteensä 94 eri potilasnäytettä.

Tieteellinen tutkimus jakautuu empiiriseen ja teoreettiseen tutkimukseen (Nummenmaa 2009, 23). Empiirinen eli kokemusperäinen tutkimus perustuu havaintoihin, numeerisen aineiston hankinnan suunnitteluun sekä tietojen keräämiseen, niiden esittämiseen ja analysoimiseen. Teoreettinen tutkimus sen sijaan pohjautuu perusolettamuksiin ja tutkimus voidaan tehdä käyttämättä mittalaitteita. (Nummenmaa 2009, 23; Valli 2015, 16.)

Opinnäytetyömme on empiirinen, sillä sen tavoitteena on ollut tuottaa koestuksen tuloksiin perustuvaa tietoa, jota analysoidaan ja esitetään. Tutkimusaineistomme koostui meille Fimlab Laboratoriot Oy:n keräämistä ulostenäytteistä, jotka oli valikoitu niin, että niiden joukossa oli vertailtavien multiplex-PCR -menetelmien kannalta oleellisten virusten suhteen sekä positiivisia että negatiivisia näytteitä.

Empiirisessä tutkimuksessa käsitellään eri muuttujia eli arvoltaan vaihtelevia, mitattavia ominaisuuksia, jotka jaetaan riippuviin ja riippumattomiin. Riippuvien muuttujien arvoihin ei voida suoraan vaikuttaa, mutta riippumattomiin muuttujiin voidaan. Kokeellisen tutkimuksen koeasetelma tulisi olla muodoltaan sellainen, että tutkittavaan riippuvaan muuttujaan voi ainoastaan vaikuttaa tutkijan säätelämä ominaisuus. (Nummenmaa 2009, 31, 33.) Tämä toteutetaan vakioimalla muut tekijät (Heikkilä 2014, 19). Säätelävän tekijän vaikutusta riippuvaan muuttujaan tutkitaan kontrolloiduissa olosuhteissa ja tutkimus toteutetaan yleensä laboratoriotilassa (Nummenmaa 2009, 33; Heikkilä 2014, 14).

Opinnäytetyössämme verrattiin toisiinsa kolmen eri multiplex-tunnistusmenetelmän saamia tuloksia samoista näytteistä. Koeasetelma pyrittiin vakioimaan niin, että muuttujana olisivat ainoastaan käytetyt koestusmenetelmät. Tämä toteutettiin käyttämällä tutkimuksen suoritukseen samoja laitteita sekä samoja näytteitä, joiden käsittely oli samantyyppistä menetelmästä toiseen.

Tieteellinen tutkimus on tiedon järjestelmällistä hankintaa sekä teorioiden, eli mallien muodostamista näiden hankittujen tietojen pohjalta. Tutkimusaineistoissa esiintyy usein vaihtelua, jota tilastollisilla menetelmillä pyritään kuvaamaan ja tarkastelemaan. (Nummenmaa 2009, 15-16, 18.) Kuvailevilla tilastollisilla menetelmillä mittaustulosten vaihtelu tiivistetään suurista lukujoukoista pienempään määrään lukuja. Näiden menetelmien avulla tutkittava aineisto voidaan esittää muodossa, joka on helpompi ymmärtää ja tulkita. (Nummenmaa 2009, 17.)

Johtuen laajasta tutkimusaineistostamme saamamme mittaustulokset vaativat jatkokäsittelyä niiden tulkinnan ja ymmärtämisen helpottamiseksi. Olemmekin opinnäytetyössämme pyrkinneet käyttämään tilastollisia menetelmiä saamiemme tuloksien selventämiseen. Olemme kuitenkin säilyttäneet tulokset myös alkuperäisessä muodossaan, jotta mahdollisten jatkotutkimusten tekeminen niiden pohjalta olisi mahdollisimman helppoa.

Empiirisen osan lisänä opinnäytetyössä tarkastellaan tutkimusongelmia teoreettisesta näkökulmasta sekä osoitetaan teorian ja tutkimustulosten välinen yhteys (Heikkilä 2014, 71). Olemme toteuttaneet tämän opinnäytetyöraportissamme tutustumalla tarkemmin gastroenteriittiä aiheuttaviin viruksiin sekä kuvaamalla niiden diagnostiikkaa, painottaen erityisesti koestuksessamme käytettyä multiplex-PCR -menetelmää.

4 AKUUTTI GASTROENTERIITTI JA SEN AIHEUTTAJAVIRUKSET

4.1 Virusinfektion määrittely

Infektio- eli tartuntataudit ovat sairauksia, jotka johtuvat mikrobeista tai niiden tuottamista toksineista eli myrkyistä (Lumio 2014). Virus voi aiheuttaa akuutin tai kroonistuvan infektion. Akuutissa eli produktiivisessa infektiossa infektiokykyisen viruksen uudistuotanto on usein runsasta, mutta taudin päättyessä loppuvaa. Joissain tapauksissa virustuotanto voi jatkua pitkäaikaisena, jolloin virusinfektiota kutsutaan krooniseksi eli persistoivaksi. Viruksen lisääntyminen voi tällöin kuitenkin olla vähäisempää akuuttiin infektiin nähden. Latentissa virusinfektiossa virus on elimistössä piilevä, eli sen aiheuttamat oireet ja virustuotanto ovat loppuneet. (Hukkanen, Saksela & Hyöty 2010, 433-434.) Piilevä virus saattaa aika ajoin aktivoitua uudelleen elimistön puolustuskyvyn heikentyessä esimerkiksi sairauden ja sen hoidon yhteydessä (Terveyskirjasto 2015). Virusinfektiosta on myös hidas muoto, jossa infektio väistämättä etenee ja pahenee, kunnes isäntäeliö kuolee (Hukkanen ym. 2010, 434).

Virustautien patogeneesi eli käsitys sairauden synnystä ja sen kehityksestä, koostuu virustautiin ja sen oireisiin johtavista virusinfektion tapahtumista (Hukkanen ym. 2010, 432; Terveyskirjasto 2016d). Infektiivinen annos, taudinaiheuttajien ja isännän ainutlaatuiset ominaisuudet, mikrobien säilyvyys ympäristössä sekä tartuntareitti ovat infektion leviämiseen vaikuttavia tekijöitä (Lounamo, Tuuminen & Kotilainen 2014, 793). Viruksen ominaisuuksista esimerkiksi sen solu- ja kudoshakuisuus eli tropismi, sekä taudinaiheuttamiskyky eli virulenssi, ovat osana virusinfektioiden patogeneesia. Patogeneesiin vaikuttavia isännän ominaisuuksia ovat muun muassa ikä, sukupuoli, yksilöllinen immuunivaste sekä ravitsemus. (Hukkanen ym. 2010, 432, 437.)

Tartunta yksilöstä toiseen voi tapahtua esimerkiksi ilma-, veri- ja kosketusteitse sekä ulosteella kontaminoituneen aineksen joutuessa suuhun (Lounamo ym. 2014, 793). Aerosolin tai muiden roiskeiden välityksellä leviävät muun muassa hengitysteitä infektoivat virukset. Toisenlaiset patogeenit, kuten sukupuoliteitse tarttuvat virukset, vaativat suoraa tai ihon läpäisevää kontaktia. Fekaalis-oraaliset, eli uloste-suu -tien kautta tarttuvat infektiot, voivat aiheuttaa laajojakin epidemioita levitessään kontaminoituneen ruo-

an tai juoman välityksellä. (Hukkanen ym. 2010, 434-435; Terveyskirjasto 2016a, 2016c.)

Infektion tarttuvuutta voidaan arvioida muun muassa R_0 -arvoa apuna käyttäen. R_0 -arvo (basic reproduction number) kuvaa infektioiden leviämistä väestössä eli sitä, kuinka monta ihmistä taudinkantaja voi tartuttaa. R_0 -arvon ollessa suuri voidaan olettaa, että tartunta todennäköisesti leviää edelleen ja voi aiheuttaa epidemian. Epidemioiden esittämiseen voidaan käyttää myös muita suureita, kuten kuolleiden prosenttiosuutta sairastapauksissa (case fatality rate) ja infektiotapausten kumulatiivista prosenttiosuutta (attack rate). (Lounamo ym. 2014, 793.) Näistä jälkimmäinen arvo kuvaa sitä osuutta väestöstä, joka sairastuu epidemian aikana (U.S. Department of Health and Human Services 2012, 187).

4.2 Akuutin gastroenteriitin taudinkuva

Gastroenteriitti on suoliston limakalvon tulehdus, jonka oireita ovat oksentelu ja ripulointi. Kyseessä on siis terveydentilan häiriö, jonka aikana löysää tai nestemäistä ulostetta erittyy päivässä normaalia enemmän. (Chow ym. 2010; World Health Organization 2016a.) Maha-suolikanavan infektion aiheuttamat ripuli-oksennustaudit ovat merkittävä maailmanlaajuinen terveysongelma. Maailman terveysjärjestö on arvioinut, että vuosittain sairastapauksia ilmenee 1,7 miljardia, ja niistä yli 750 000 johtaa alle viisivuotiaiden lasten menehtymiseen. (World Health Organization 2013; Binnicker 2015.)

Infektioperäiset ripuli-oksennustaudit syntyvät patogeenien päästessä elimistöön fekaalis-oraalista reittiä tai niiden tarttuessa henkilöstä toiseen ulosteella tai oksennuksella kontaminoitujen käsien välityksellä. Tautitapaukset voidaan jakaa niiden epidemiologian ja kliinisen kuvan mukaan kolmeen eri kategoriaan. Tauti voi olla akuutti, elimistöä kuivattava tila, joka oireilee vetisenä ripulina. Kyseessä voi olla myös akuutti suolisto-tulehdus ja tulehdus, jossa esiintyy veristä ulostetta. Yhtämittaisessa tautitilassa sairaus on pitkittynyt ja voi kestää yli kaksi viikkoa. (Keusch ym. 2016; Terveyskirjasto 2016e.) Virusperäisen gastroenteriitin aiheuttajia ovat adeno-, astro-, noro- rota- ja sapovirukset (Anttila, Nieminen & Maunula 2010, 1575). Maha-suolikanavan virusinfektion aiheuttajina voivat lisäksi toimia enterovirukset ja mahdollisesti myös koronavirukset (Eerola, Hytönen & Kuttila 2012, 27).

Epäiltäessä tarttuvaa ripulia, sairaaloissa ja muissa terveydenhuoltoyksiköissä on yleensä käytössä yksityiset, eristetyt huoneet, jotta taudin tarttumiselta potilaalta toiselle vältyttäisiin. Tutkimustuloksien valmistuminen vie aikaa ja usein hoitohenkilökunnan täytyy päättää jo ennen tulosten valmistumista, sijoittavatko he potilaan eristyshuoneeseen. Tämä on ongelma, sillä eristyshuoneet ovat usein vähissä ja ripuli on yleinen oire sairaalahoidossa olevilla potilailla, jolloin infektioperäistä gastroenteriittiä voi olla vaikea erottaa ei-tarttuvista tapauksista. Mikäli sairautta ryhdytään hoitamaan ei-tarttuvana ja potilasta ei eristetä, patogeeni voi päästä leviämään osastolla. Tarpeeton potilaiden eristäminen puolestaan kuluttaa sairaalan resursseja. (Goldberg ym. 2014.) Tavoitteena onkin, että laboratoriovastaus saadaan mahdollisimman pian. Virusten pikadiagnostiikka osana taudinmäärittäystä toimii apuna potilaiden sijoittamisessa osastoilla sillä aikaa, kun tutkitaan, onko kyseessä bakteeri- vai virusinfektio. (Loginov, Mannonen & Lappalainen 2016, 650.)

4.3 Norovirus

Norovirus on kalikiviruksiin kuuluva, akuuttia gastroenteriittiä aiheuttava yksijuosteinen RNA-virus (Anttila ym. 2010, 1576; Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim* 2012, 368). Noroviruksella ei ole lipidivaippaa, joka joillakin viruksilla toimii viruksen uloimpana kerroksena. Lämpimitaltaan virus on 38 nanometriä ja sen RNA-genomi on kooltaan 7500 emästä. (Vuento 2016, 16, 134.) Virusinfektion itämisaika on 12–36 tuntia, minkä jälkeen infektio oireilee ankarana oksenteluna, ripulina ja lievänä kuumeena. Yleensä varsinainen vatsatauti kestää enintään kaksi päivää, mutta viruseritys ulosteisiin jatkuu noin kuukauden. (Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim* 2012, 368.)

Infektioita tavataan kaikissa ikäryhmissä. Vakavia tapauksia esiintyy erityisesti nuorilla lapsilla, iäkkäillä potilailla sekä henkilöillä, joilla on ollut oireita jo ennestään. Norovirus leviää veden tai elintarvikkeen välityksellä, kontaminoituneilta pinnoilta, ilmateitse aerosolimuodossa sekä silloin, kun henkilö on kontaktissa sairastuneen kanssa. (Lounamo ym. 2014, 795–796.) Virionit, eli infektiokykyiset viruspartikkelit, pysyvät suhteellisen vakaina niitä ympäröivissä olosuhteissa; niiden on todettu selviävän jäädytyksestä, kuumennuksesta 60 asteessa sekä kloorilla desinfiointista (Bamford, Hyypiä & Saksela 2010, 449; Sidoti ym. 2015, 552). Infektoiva annos on pieni, muutamia kym-

meniä viruksia, minkä johdosta norovirus tarttuu herkästi. Grammassa kantajan ulostetta voi olla jopa sata miljardia virusta. (Lumio 2014.)

Ihmisen norovirukset jaetaan kolmeen genoryhmään I, II ja IV. Genoryhmä I sisältää yhdeksän genotyyppiä ja genoryhmässä II genotyyppejä on 22, joista genotyyppi GII.4 on maailmalla hallitsevin (Mattila & Järvinen 2011; Mori ym. 2016, 5.) Talvikautena 2014/2015 havaittiin genotyypin GII.17 uusi variantti, joka on aiheuttanut gastroenteriitin epidemioita Kiinassa ja Japanissa (Lu ym. 2015, 1240; Fast-Track Diagnostics 2016). Lun ja tutkijaryhmän (2015, 1241-1242) mukaan tämä variantti on viime vuosina levinnyt laajalle alueelle, ja sitä tulisi tulevaisuudessa tutkia enemmän, jotta sen luonteesta, kuten esimerkiksi sen rakenteesta, taudinaiheuttamiskyvystä sekä esiintyvyydestä saataisiin tarkempaa tietoa.

4.4 Rotavirus

Rotavirukset ovat *Reoviridae* -perheeseen kuuluvia viruksia, joiden rakenne on vaipaton, kolmikerroksinen ja ikosahedraalinen eli monitahokkaan muotoinen. Näitä viruksia esiintyy maaperässä ja vesiympäristössä, ja ne ovat maailmanlaajuisesti yleisimpiä akuutin gastroenteriitin aiheuttajia. (Mattila & Järvinen 2011; Aiyegbo ym. 2013; Karhumäki, Jonsson & Saros 2016, 25.) Rotavirukset jaetaan viruksen VP6-rakenneproteiinin serologisen reaktiivisuuden ja geneettisen muuntelun mukaan kahdeksaan ryhmään, A:sta H:hon, joista pääosin A, B ja C aiheuttavat infektoita ihmisissä. Rotavirus A on näistä yleisin, ja se jaetaan vielä eri serotyyppeihin. (Matthijnssens ym. 2011; Desselberger 2014; Araud ym. 2015.) Rotaviruksen aiheuttamaa oireellista ja tarttuvaa gastroenteriittia ilmenee yleisimmin nuorilla, 3 kk - 2-vuotiailla lapsilla (Karhumäki ym. 2016, 128; World Health Organization 2016c). Maailman terveysjärjestö WHO arvioi elokuussa 2016, että vuonna 2013 rotavirusten aiheuttamiin infektoihin kuoli maailmalla keskimäärin 215 000 alle viisivuotiasta lasta (World Health Organization 2016b).

Viruksen itämisaika on 1-2 päivää ja sen oireita ovat vetinen ripuli, kuume, oksentelu ja vatsakivut. Tauti on kestoaltaan 2-6 vuorokautta. (Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim* 2012, 368; Karhumäki ym. 2016, 128.) Pahimpana ripulin ja oksentelun aiheuttamana komplikaationa on kuivuminen (Mattila & Järvinen 2011; Karhumäki 2016).

Yleistä on myös lievempi tautimuoto, joka voidaan sairastaa kotona eikä vaadi sairaalahoitoa. Suomessa viiteen ikävuoteen mennessä lähes kaikki lapset ovat sairastaneet oireellisen tai oireettoman rotavirusinfektion. (Mattila & Järvinen 2011.) Ensimmäinen sairastettu rotavirusinfektio on taudinkuvaltaan vaikein, jonka jälkeen uusiutuvien infektioiden oireet ovat lievempiä (Mattila & Järvinen 2011; Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015b).

Rotavirusta vastaan on kehitetty rokote, joka tuli osaksi Suomen kansallista rokotusohjelmaa vuonna 2009 (Vesikari 2013, 2429). Rokotusohjelmassa käytettävä Rotateq-rokote annetaan maksutta 6-31 viikon ikäisille vauvoille (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015a). Rokote pitää sisällään viittä elävää rotaviruskantaa ja se on oraalinen, eli suun kautta annettava (Lääkeinfo.fi 2016). Rokotteen tehokkuudesta tehtyjen tutkimusten mukaan rotaviruksen aiheuttamaa gastroenteriittiä on pystytty vähentämään merkittävästi rokotteen käyttöönoton jälkeen (Hartwig ym. 2014).

Suomessa on esimerkiksi tehty tutkimus siitä, kuinka rotavirusrokotteen tehokkuus on vaikuttanut sairaalan hoitajaksojen kestoon. Tutkijat analysoivat rotaviruskausia 2000/2001 kaudesta 2011/2012 kauteen asti käyttäen Oulun ja Tampereen yliopistollisista sairaaloista kerättyjä hoidosta kotiuttamistietoja. Tämä aikaväli käsittää ajan ennen ja jälkeen rotavirusohjelman käynnistämisen. Kotiuttamisrekisteristä saatuihin tietoihin sisältyivät tautiluokitus ICD 10:n koodit A00-09 eli akuutin gastroenteriitin ja A08.0:n eli rotaviruksen aiheuttaman akuutin gastroenteriitin. Näitä tietoja käyttäen tutkijat selvittivät edellä mainittujen tautiluokitusten vaatimaa sairaalahoitoa, sekä hoitopäivien määrää ja niiden vähentymistä 0-16 -vuotiailla lapsilla. Tutkimus osoitti, että rotavirusrokotuksen käyttö ilmenee sairaaloissa selkeänä hoitopäivien vähentymisenä rotaviruksen aiheuttaman akuutin gastroenteriitin suhteen. (Hartwig ym. 2014.)

4.5 Adenovirus

Ihmisen adenovirukset luokitellaan *Adenoviridae* -perheeseen, Mastadenoviruksen sukuun (La Rosa ym. 2015). Nämä kaksijuosteiset ja lineaariset DNA-virukset ovat läpimitaltaan noin 80 nanometriä ja muodoltaan ikosahedraalisia, eli niiden kapsidi rakentuu kahdestakymmenestä tasasivuisesta, proteiinirakenneyksiköistä koostuvasta kolmiosta. Tunnusomaisena morfologisena piirteenä adenoviruksilla on kapea kuitu, joka

ulkonee ikosaedrin kustakin 12 kärjestä. (Bamford ym. 2010, 453; Collier ym. 2011, 10, 76; Lion 2014.) Adenoviruksen genomi on kooltaan 34-37 kb:tä ja se sisältää noin 40 geeniä (Lion 2014).

Adenoviruksen serotyypit tyyppiin 51 asti on aikaisemmin luokiteltu sen mukaisesti, kuinka ne neutraloivat seerumin vasta-aineita ja agglutinoivat punasoluja (Branton 2011, 275; La Rosa ym. 2015). Tämän jälkeen uusia adenovirustyyppijä on tunnistettu myös viruksen koko geeniperimän perusteella, genomiikan ja bioinformatiikan analyysijä apuna käyttäen (Lion 2014). Nyt adenovirustyyppijä on tunnistettu yli 60 ja ne jaetaan A:sta G:hen (Moyo ym. 2014). Pienillä lapsilla tavattavat oireelliset suolistoinfektiot ovat adenoviruksen serotyypin 40 ja 41 aiheuttamia (Collier ym. 2011, 76).

Adenoviruksen itämisaika kestää noin viikon verran ja taudin vakavuus voi vaihdella; pitkittynyt tila voi jatkua jopa kymmenen vuorokauden ajan (Mattila & Järvinen 2011). Kliiniset oireet ovat yleensä lieviä ja rajoittuvat itsestään, mutta adenovirukset kykenevät aiheuttamaan myös paikallisia epidemioita (Lion 2014). Osalla infektion saaneista voi esiintyä kuumetta ja sairaalahoitoa vaativaa pitkäkestoista ripulia (Loginov ym. 2016, 648).-Infektion aiheuttamat tautitilat voivat olla myös vakavia, ja ne ovat johtaneet kuolemantapauksiin jopa immuunipuolustuksen omaavilla henkilöillä (Lion 2014). Gastroenteriitin lisäksi adenovirukset aiheuttavat silmän infektoita ja sekä tulehduksia hengitys- ja virtsateissä (La Rosa ym. 2015).

4.6 Astrovirus

Ihmisen astrovirukset (Human Astroviruses) ovat vaipattomia, positiivissäikeisiä eli proteiinisynteesijä ohjaavia, yksijuosteisia RNA-virusia (Vuento 2016, 272; York ym. 2016). Nämä virukset löydettiin vuonna 1975 elektronimikroskoopin avulla. Viruksen genomi on kooltaan noin 6.2-7.8 kb:tä. (Bosch, Pintó, & Guix 2014.) Astrovirukset kuuluvat *Astroviridae* -perheeseen, joka jakautuu kahteen sukuun; Mamastroviruksiin, jotka sairastuttavat nisäkkäitä, sekä Avastroviruksiin, joiden aiheuttamia infektoita esiintyy eri lintulajeilla (Cordey ym. 2016).

Metagenomiikka eli jonkin kokonaisen yhteisön geenien tutkiminen on muuttanut käsitystä astrovirusista huomattavasti. Viruksesta on löydetty toisistaan poikkeavia muoto-

ja, jotka pystyvät infektoimaan erilaisia eläinlajeja, mukaan lukien ihmisiä. Ihmisen astroviruksista on tunnistettu kolme toisistaan eriävää ryhmää; klassinen astrovirus (MAstV 1) sekä uudemmat, ei-klassiset ryhmät HAstV-MLB ja HAstV-VA/HMO (Hultman & Auvinen 2010, 1278; Bosch ym. 2014). Klassiset astrovirukset on jaettu niiden antigeenisyyden mukaan kahdeksaan serotyyppiin, joista tyyppi yksi on maailmanlaajuisesti vallitsevin (Bosch ym. 2014; Yoneda ym. 2016, 4). Astroviruksista etenkin klassisia astroviruksia pidetään lasten gastroenteriittiä aiheuttavina patogeneinä. Myös ei-klassisten astrovirusten aiheuttamat infektiot liittyvät gastroenteriittiin, mutta niiden patogeenistä luonnetta ei olla vielä täysin pystytty osoittamaan (Bosch ym. 2014).

Astrovirus leviää yleisimmin kosketustartuntana ihmisten välillä ja on tarttumiskykyinen 1-100 partikkelin määrällä. Tauti oireilee ripulina, pahoinvointina, kuumeena sekä lihaskipuina. (Mattila & Järvinen 2011.) Tyypillistä on lievä vetinen ripuli, joka kestää enintään kolme päivää (Sidoti ym. 2015, 553). Tämä lievempi tautimuoto johtaa harvoin sairaalahoitoon ja infektiosta voi selvitä myös oireitta (Mattila & Järvinen 2011). Astroviruksista aiheutunutta kuolleisuutta on ilmennyt, mutta tapaukset ovat erittäin harvinaisia (Sidoti ym. 2015, 553). Kuolemantapauksia on esiintynyt lapsipotilailla, joiden immuunipuolustus on erittäin heikko (Bosch ym. 2014).

4.7 Sapovirus

Ensimmäinen havainto sapoviruksesta tehtiin vuonna 1976 Englannissa ulostenäytteistä ja vuotta myöhemmin viruksen alkumuoto tunnistettiin Japanissa Sapporossa gastroenteriitin massaesiintymisen yhteydessä (Sidoti ym. 2015, 552). Sapovirukset ovat pieniä, halkaisijaltaan noin 30-38 nm, ja rakenteeltaan ikosahedraalisia. Viruksen pinnalla on kuppimaisia painaumuksia, jotka ovat tyypillisiä kalikiviruksen morfologiassa. Sapoviruksen RNA-genomi on yksijuosteinen ja kooltaan noin 7.1-7.7kb:tä. Vuoteen 2015 mennessä ihmisen sapoviruksia oli luokiteltu viiteen geeniryhmään GI-GV. (Oka, Wang, Katayama & Saif 2015.)

Sapovirukset aiheuttavat akuuttia gastroenteriittiä sekä ihmisillä että eläimillä; viruksista johtuvia epidemioita ja satunnaisia tapauksia esiintyy kaikenikäisillä ympäri maailmaa. Sapoviruksien aiheuttamien gastroenteriittien on todettu olevan lievempiä kuin

noroviruksista ja rotaviruksista johtuvien tautitapausten. Sapovirusinfektioista johtuvat kuolemantapaukset ovat harvinaisia. (Oka ym. 2015; Sidoti ym. 2015, 552.) Suomessa sapovirusten aiheuttamia lasten maha-suolitulehduksia on noin 10 % tapauksista, ja ne vaativat sairaalahoitoa vain harvoin (Mattila & Järvinen 2011). Vakavampia kliinisiä tiloja esiintyy sairauksille alttiimmilla ryhmillä, kuten keskosilla ja immuunipuutteisilla potilailla (Sidoti ym. 2015, 552).

5 VIRUSTEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

5.1 Tutkimusindikaatiot

Akuuttia gastroenteriittiä aiheuttavien virusten tunnistamista laboratoriotutkimusten avulla ei yleensä koeta aikuisväestön kohdalla tarpeelliseksi tutkimukseksi, etenkin silloin, kun paraneminen tapahtuu itsestään muutamassa päivässä. Virusdiagnostiikkaa hyödynnetään lähinnä silloin, kun kyseessä on esimerkiksi lapsipotilaan pitkittynyt ripuli, tutkimuksen tulos tulee vaikuttamaan suoraan potilaan hoitoon, tai kun potilaan gastroenteriittiä epäillään tartuntavaaralliseksi. Tutkimuksia tehdään myös tautiepidemioiden yhteydessä, tarvittaessa yhdessä elintarvikevalvonnan ja muiden viranomaistahojen kanssa. (Mattila & Järvinen 2011.)

Virustutkimuksia ei akuutin gastroenteriitin ollessa kyseessä koskaan tehdä yksinään, vaan yhdessä muiden ulostetutkimusten, kuten bakteeriviljelyiden ja parasiittitutkimusten kanssa. Tarvittaessa voidaan tehdä myös muita tutkimuksia, esimerkiksi ripuliin liittyvän korkean kuumeen yhteydessä suositellaan veriviljelyn tekemistä. (Mattila & Järvinen 2011.) Sairaalaolosuhteissa ulosteen virusdiagnostiikkaa, erityisesti pikadiagnostiikkaa, hyödynnetään hoidon suunnittelun lisäksi silloin, kun arvioidaan potilaan eristämisen tarpeellisuutta virusperäisen gastroenteriitin leviämisen torjumiseksi (Vinjé 2014).

Useille akuuttia gastroenteriittiä aiheuttaville viruksille on tyypillistä niiden erittyminen ulosteeseen myös oireettomien jaksojen aikana: esimerkiksi norovirusta voidaan osoittaa ulostenäytteestä vielä viikkojen tai jopa kuukausien kuluttua varsinaisten oireiden kadottua. Tämä voi vaikeuttaa virustutkimusten tulosten tulkintaa ns. väärin positiivisten muodossa. (Buss ym. 2015.) Toisaalta, osittain tästä johtuen virusdiagnostiikkaa voidaan hyödyntää akuuttien, käynnissä olevien primaaristen virusinfektioiden tunnistamisen lisäksi latenttien, yhä uudelleen alkavien infektioiden tunnistamiseksi. Virusdiagnostiikkaa käytetään myös immuniteettitutkimuksiin, esimerkiksi rotavirusrokotteen tehon todentamiseen ja seurantaan. (Lappalainen ym. 2011.)

5.2 Näytteenotto virustutkimuksissa

Lappalainen, Vainionpää ja Hedman (2011) korostavat virustutkimusten yhteydessä huolellisesti tehtyjen esitietojen tärkeyttä. Heidän mukaansa muun muassa potilaan oireiden kuvailu, mahdollisten aiempien matkakohteiden listaaminen sekä rokotustietojen kertominen ovat olennainen apu viruslaboratoriolle, jotta se voi klinikon antamien tietojen pohjalta voi itse valita näytteelle sopivan tutkimuspaketin (Lappalainen ym. 2011). Tällöin laboratorion osuus laboratoriotutkimuksissa alkaa vasta näytteenottovaiheessa tai silloin kun näyte saapuu laboratorioon, ja varsinaisen tutkimuspyynnön tekee pyytävä yksikkö (Matikainen, Miettinen & Wasström 2010, 10,13). Mahdollisten epäselvyyksien kohdalla laboratoriolta voidaan kuitenkin kysyä neuvoja tutkimuspyynnön teon ja tutkimusten valinnan suhteen (Karhumäki ym. 2016, 202).

Akuuttia gastroenteriittiä aiheuttavien virusten kohdalla näytteenotto tutkimuksia varten on hyvä ajoittaa mahdollisimman pian oireiden alkamisesta. Näin voidaan varmistaa, ettei potilaan oma immuunipuolustus ole vielä ehtinyt vähentää infektiivisten virusten määrää. (Lappalainen ym. 2011.) Esimerkiksi rotavirusten kohdalla paras ajankohta näytteenotolle on 3-5 päivän sisällä oireiden ilmestymisestä (Vesikari 2013). Jos tarkoituksena sen sijaan on latenttien infektioiden diagnosointi, näytteenotto on parempi ajoittaa oireettomalle jaksolle (Lappalainen ym. 2011).

Akuuttia gastroenteriittiä aiheuttavien virusten kohdalla paras näyte virusten eristystä varten on puhtaaseen, kuivaan ja suljettavaan astiaan laitettu ulostenäyte (Collier ym. 2011, 319). Näytteenotto toteutetaan ulostamalla ensin puhtaaseen astiaan, josta tarvittava määrä näytettä siirretään näytepurkkiin. Siirrostamiseen voidaan käyttää esimerkiksi purkin kannessa olevaa lusikkaa, tai, ulosteen ollessa nestemäistä, kaataa näytettä suoraan purkkiin. (VSSH 2016.) Näytepurkki pyritään täyttämään puolilleen tai noin neljäsosaan purkin tilavuudesta (Fimlab Laboratoriot Oy 2013; VSSH 2016). Täyteen purkkia ei kuitenkaan tarvitse laittaa (Fimlab Laboratoriot Oy 2013, Huslab 2015 & VSSH 2016). Purkkiin kiinnitetään tarra, johon merkitään näytteenantajan nimen ja henkilötunnuksen lisäksi näytteenottoaika (Fimlab Laboratoriot Oy 2013 & VSSH 2016). Ulostenäytteiden mahdollisen tartuntavaaran sekä yleisen hygienian vuoksi näytepurkit laitetaan uudelleensuljettaviin muovipusseihin. Ne on myös toimitettava laboratorioon mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Mikäli näytteitä säilytetään yön yli, ne on laitettava jääkaappiin. (Collier ym. 2011, 319.)

Bakteriologisia tutkimuksia varten ulostetta kerätään usein myös näytteenottotikkiin pyörittämällä näytteenottotikkua ulosteessa ja sulkemalla se sen jälkeen tiiviisti geelitäytteiseen kuljetusputkeensa (Fimlab Laboratoriot Oy 2013). Myös esimerkiksi norovirusta voidaan tarvittaessa osoittaa tikkunäytteiden avulla (Vinjé 2014). Tikkunäytteitä ei kuitenkaan voida pitää yhtä hyvinä virustutkimusten toteutuksen kannalta kuin purkissa olevaa ulostenäytettä (Collier ym. 2011, 319).

5.3 Virusten tunnistamismenetelmät

Virusten tunnistusta varten on olemassa useita eri menetelmiä, joista kullakin on omat vahvuutensa ja heikkoutensa. Menetelmän valintaan vaikuttavat paitsi laboratorion käytössä olevat resurssit, myös potilaaseen liittyvät tekijät, kuten millaisia näytteitä potilaasta on mahdollista saada, kauanko oireiden alkamisesta on kulunut aikaa ja minkä tyyppinen tauti on kyseessä. (Lappalainen ym. 2011.)

Virusviljely on erittäin herkkä tutkimusmenetelmä, jossa potilas- tai tutkimusnäytteestä peräisin oleva virus istutetaan soluviljelmään tunnistamista varten. Tutkimus vaatii näytteenotolta ja kuljetukselta paljon: näytteen viruspartikkelien on oltava elossa näytteen saapuessa laboratorioon. Kuitenkin jo yksi lisääntymiskykyinen viruspartikkeli näytteessä riittää tutkimuksen onnistumiseen, mikä onkin muuten työlää ja hitaan menetelmän vahvuus. Eri viruslajien kyky kasvaa eri solutyypeissä vaihtelee suuresti, joten näytteitä tutkittaessa solukot valitaan huolellisesti sen perusteella, mitä viruksia näytteissä oletetaan esiintyvän. (Lappalainen ym. 2011.)

Viruksen lisääntyminen virusviljelmässä voidaan todeta esimerkiksi valomikroskoopilla nähtävän, kullekin viruslajille ominaisella tavalla ilmenevän solutuhon perusteella. Lopullinen tunnistus tehdään yleensä immunologisin menetelmin, esimerkiksi neutralisaatiotestillä, jossa viruksen kasvua pyritään estämään sille spesifisellä, viruslajikohtaisella vasta-aineella. (Lappalainen ym. 2011.) Tällöin soluviljelmästä eristettyyn, tietyn määrän viruksia sisältävään näytteeseen lisätään tunnetulle virustyyppille immunisoitua seerumia, minkä jälkeen näyte viljellään uudelle soluviljelmälle. Tätä uutta soluviljelyä seurataan päivittäin, jolloin solujen muutosten perusteella voidaan todentaa, onko käytetty vasta-aine vaikuttanut virusten kasvuun. Mikäli virusten kasvu on estynyt, alkupe-

räisessä viljelynäytteessä oli kyseisen vasta-aineen osoittamaa virusta. Viljelyssä kasvien virusten tunnistuksessa on mahdollista käyttää immunologisten menetelmien lisäksi muun muassa PCR:ää, eli polymeerasiketjureaktioon perustuvaa tunnistusta, sekä elektronimikroskopiaa. (Cann 1999, 85, 111.)

Elektronimikroskopiassa virus tunnistetaan sen morfologian ja koon perusteella (Cann 1999, 111; Lappalainen ym. 2011). Menetelmä vaatii varsinaisen elektronimikroskoopin lisäksi myös muuta erikoislaitteistoa, kuten ultramikrotomin (Lecatsas 2011). Näytteen valmistelussa mikroskopointia varten tarvitaan lisäksi muun muassa erikoisvärjäksiä, joiden tekemiseen vaaditaan erityisasiantuntemusta (Cann 1999, 113, 118-121 & 123; Lecatsas 2011). Osittain näistä tekijöistä johtuen elektronimikroskopia on väistynyt muiden virusten tunnistusmenetelmien tieltä. Mikroskopointi vaatii näytteeltä paljon: näytteen tulee sisältää vähintään 10^6 viruspartikkelia näytemillilitraa kohti, jotta menetelmä on mahdollinen. Akuuttia gastroenteriittiä aiheuttavien virusten kohdalla tämä vaatimus täyttyy yleensä helposti, minkä vuoksi elektronimikroskopiaa onkin aiemmin hyödynnetty paljon ripuliepidemioiden selvittämisessä. (Lappalainen ym. 2011.) Näiden virusten kohdalla on myös mahdollista käyttää niille spesifistä vasta-ainetta, jota lisätään näytteeseen ennen sen valmistelua mikroskopoitavaksi. Tällöin vasta-aineseerumi sakkaa näytteen samankaltaiset virusrakenteet toisiinsa, mikä paitsi helpottaa huomattavasti niiden löytämistä mikroskoopin avulla, myös auttaa varmentamaan niiden tunnistusta. (Collier ym. 2011, 119.)

Immunologiaa voidaan hyödyntää myös virusdiagnoosissa osoittamaan virusproteiineja potilasnäytteistä. Menetelmä perustuu vasta-aineisiin, jotka kiinnittyvät spesifisti etsittävien virusten proteiinirakenteisiin. Näytemateriaaliin kiinnittyneet vasta-aineet on merkitty erilaisilla leima-aineilla, jonka vuoksi ne voidaan havaita vaikkapa fluoresenssimikroskoopilla tai silmin nähtävällä värireaktiolla. Erilaisia immunologisia menetelmiä on useita, ja laboratorioissa käytettävä menetelmä vaikuttaa muun muassa tutkimusaikoihin suuresti. (Lappalainen ym. 2011.)

Muun muassa rotaviruksen ja noroviruksen osoitukseen on olemassa myös pikatestejä (Mattila & Järvinen 2011). Näissä testeissä viruksen antigeenin olemassaolo voidaan suoraan osoittaa potilaan ulosteesta esimerkiksi immunokromatografiaan perustuvalla menetelmällä. Tällöin testikittiin voi kuulua esimerkiksi ulostesuspensioon kastettavia liuskoja, tai kasetti jonka näytekuoppaan näyte pipetoidaan. Erilaisia kaupallisia testejä

on saatavilla useita, ja niitä voidaan käyttää laboratorioiden lisäksi myös vieritestauksessa. Huomattavaa kuitenkin on, että testit eivät sovi suurille tutkimusmäärille. (Loginov ym. 2016, 650, 652.)

6 MULTIPLEX-PCR

6.1 PCR-menetelmä

Virusten nukleiinihappojen osoitus tapahtuu yleensä polymeraasiketjureaktion, eli PCR:n avulla, jossa etsittävän viruksen geenijakso monistuu, mikäli sitä näytteessä on. Monistamiseen käytetään alukkeita, jotka sitoutuvat spesifisti haluttuun nukleiinihappoketjun osaan. (Lappalainen ym. 2011.) Menetelmällä voidaan saada analyysiin tarvittavia nukleiinihappojakson kopioita muutamassa tunnissa, ja diagnoosien tekeminen sekä tautien seuranta ovat mahdollisia pienelläkin näytemäärällä. (Roche Molecular Diagnostics 2016.) Positiivisissa näytteissä syntyvä monistustuote voidaan todeta esimerkiksi elektroforeesin avulla tai hybridisaatiomenetelmällä, jolloin tuote tunnistetaan leimattujen koettimien avulla. Nykyään yleisimpiä ovat kuitenkin reaaliaikaiset PCR-menetelmät, joissa mahdollisen monistustuotteen syntyminen nähdään välittömästi, eikä sitä enää PCR-reaktion jälkeen tarvitse erikseen todentaa. (Lappalainen ym. 2011.)

Reaaliaikainen PCR on kvantitatiivinen ja hyvin herkkä menetelmä spesifisten patogeenien ominaisuuksien tunnistamiseen. Menetelmän toimintaperiaate on samankaltainen kuin PCR:ssä, mutta siinä monistettavien kohteiden visualisointiin käytetään fluoresoivia koettimia, ja toiminta tapahtuu reaaliajassa. Menetelmästä riippuen voidaan käyttää SYBR vihreä- tai FRET eli Förster resonanssi energian siirto- pohjaista metodia. SYBR vihreä fluoresoi väriaineen kerääntyessä kaksijuosteiseen DNA:han. FRET on mekanismi, joka kuvaa energian siirtymistä kemoforien tai fluoroforien välillä. Useimmiten käytetään TaqMan-koettimia, jotka ovat leimattu luovuttaja-fluoroforilla sekä vastaanottaja-sammuttajalla, joka pysäyttää fluoroforin toiminnan. (Makarewicz ym. 2015, 39.)

PCR-menetelmien etuna on niiden suuri herkkyys, mikä toisaalta voi myös aiheuttaa ongelmia tulosten tulkinnassa; positiivinen tulos ei välttämättä tarkoita kyseisen viruksen aiheuttamaa infektiota, vaan voi johtua esimerkiksi kontaminaatiosta (Ford 2010, 304). Menetelmää, erityisesti sen uudempaa multiplex-PCR –sovellusta käytetään yhä laajemmalla alueella sekä terveydenhuollossa että tutkimustarkoituksiin (Lappalainen ym. 2011). Multiplex-PCR on arvokas väline monissa biologisissa ja lääketieteellisissä tutkimuksissa, sillä sen avulla voidaan samasta näytteestä monistaa yhtäaikaisesti useita

tutkittavia geenijaksoja. Monistaminen tapahtuu käyttämällä useita eri alukkeita samassa reaktioputkessa. Menetelmä on monitahoinen, ja se täytyy suunnitella ja optimoida huolellisesti kestävien ja tarkoituksenmukaisten tuloksien saavuttamiseksi. (Sint, Raso & Traugott 2012.)

6.2 Toimintaperiaate

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on nukleiinihappojen monistamiseen kehitetty menetelmä, joka perustuu tietyn nukleiinihappoketjun jakson kohdentamiseen spesifisillä, hyvin tunnetuilla synteettisillä alukkeilla (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 154; Lehmann & Schmitz 2015, 55). Alukkeet ovat yksijuosteisia ja lyhyitä, pituudeltaan noin 15-40 nukleotidia, ja ne rajaavat esimerkiksi monistettavan nukleiinihappoketjujakson kiinnittymällä sen vastakkaisiin päihin. Monistettavat jaksot sijaitsevat siis jo nukleotidijärjestykseltään tunnettujen jaksosten välissä. (Suominen ym. 2013, 153-154.)

Ennen esimerkiksi kohde-DNA:n käsittelyä ja PCR-monistusta se täytyy eristää tai muuten poistaa reaktioita häiritsevät epäpuhtaudet. Nykyisin nukleiinihappojen puhdistukseen käytetään silikamenetelmiä, jotka perustuvat niiden sitoutumiseen silikaan. Näissä menetelmissä esimerkiksi DNA sitoutuu silikaan korkeassa ionivahvuudessa, jossa on myös kaotrooppia, eli biomolekyylejä denaturoivaa yhdistettä. Silikamenetelmistä hyvä esimerkki on spin-kolonne, jossa nukleiinihappoketjua voidaan puhdistaa käyttämällä pieniä pylväitä, joihin silikamatriksi on sidottu. Tällöin varsinainen puhdistus suoritetaan joko mikrosentrifuugia käyttäen tai vakuumi-imulaitteilla. Näytteenä voi toimia myös esimerkiksi matalan sulamislämpötilan eli LGT-agarosigeeliltä leikattu, kaotroopin läsnä ollessa liuotettu pala nukleiinihappoketjua, joka sentrifugointia hyödyntäen saadaan läpi pylvään pohjaan kiinnitetystä silikakalvosta. Tällöin DNA sitoutuu silikaan, minkä jälkeen näytteelle suoritetaan pesu lisäämällä puskuroitua 80% etanolia ja sentrifugoimalla pylväs. Pylvääseen lisätään laimeaa puskuria, joka sentrifugoidaan kalvon läpi puhtaaseen vastaanottoputkeen. (Suominen ym. 2013, 103,106-107; Choi ym. 2014.)

Tarjolla on useita erilaisia automatisoituja, nukleiinihappojen eristykseen tarkoitettuja menetelmiä. Menetelmät on suunniteltu DNA:n ja RNA:n käsittelyyn siten, että ne pois-

tavat epäpuhtauksia ja soveltuvat erilaisille näytetyypeille. (Thatcher 2014.) Thatcherin (2014) mukaan automatisoidut menetelmät ovat yleensä yhtä tehokkaita kuin manuaaliset menetelmät: useissa julkaistuissa vertailututkimuksissa on todettu, että menetelmien välillä ei ole havaittavissa suuria eroja. Automatisoitua järjestelmää hankittaessa tulee ottaa huomioon muun muassa se, mitä näytteitä ja kuinka paljon niitä voidaan sisällyttää yhteen ajokertaan, näytteiden ajoon kuluva aika sekä keinot, joilla ristikontaminaatiota voidaan estää (Thatcher 2014).

PCR:ssä toiminnan perustana ovat termostabiilit, eli korkeita lämpötiloja kestävät DNA-polymeraasit, joita on eristetty muun muassa kuumissa lähteissä elävistä bakteereista. Näistä käytetyin on *Thermus aquaticus*- bakteerista eristetty Taq-polymeraasi, joka on kuitenkin virhealtis. Vaihtoehtona on myös vähemmän virheitä tekeviä polymeeraaseja, kuten esimerkiksi Pfu- ja DynaZyme-polymeraasit. PCR-menetelmässä käytetään hyvin usein lämpötilakontroloituja, pieniä mikrosentrifuugiputkia tai kuoppalevyjä, jotka ovat kooltaan usein esimerkiksi 384-kuoppaisia. (Suominen ym. 2013, 153.) PCR-laite (thermal cycler) lämmittää ja viilentää reaktioputkia, jotta lämpötila saataisiin jokaisessa PCR-syklin vaiheessa vaaditulle tasolle. Ohutseinäiset reaktioputket sallivat maksimaalisen lämmönjohtokyvyn ja lämmitetyt kannet estävät nesteiden tiivistymisen putkien yläosaan, mikä voisi muuten aiheuttaa konsentraation muutoksia. (Lehmann & Schmitz 2015, 57.)

Kaksisäikeinen DNA denaturoidaan eli muutetaan korkeassa, noin 95 celsiusasteen lämpökäsittelyssä yksisäikeiseksi, juosteiden erotessa toisistaan lämmön vaikutuksesta. Tämän jälkeen lämpötila lasketaan noin 50-60 °C: een annealing-reaktiota varten, jolloin alukkeet sitoutuvat komplementaarisesti DNA:han eli PCR:ssä toimivaan templaattiin. Lämpötilan lasku on niin lyhyt, että varsinainen templaatti ei ehdi renaturoitua eli sitoutua takaisin kaksijuosteiseksi, mutta pienikokoiset ja kokonsa vuoksi nopeammin liikkuvat alukkeet ehtivät kiinnittymään niille komplementaarisille alueille. Annealing-reaktion päätteeksi lämpötilaa nostetaan reaktioseoksessa olevan DNA-polymeraasin optimilämpötilan mukaisesti 72 °C:een, jonka seurauksena DNA-polymeraasi aloittaa uusien, DNA-ketjuille komplementaaristen, juosteiden valmistuksen. DNA-polymeraasientsyymi kiinnittyy alukkeen 3'-päähän ja alkaa liittää siihen vapaita nukleotideja templaatin mallin mukaisesti. (Suominen ym. 2013, 154; Horelli-Kuitunen & Orpana 2016, 117,451.)

DNA-polymeraasin toimintaa kutsutaan usein myös templaatin pidennysreaktioksi, jonka aikana templaatin kumpaankin juosteeseen syntyy vastinjuoste alukkeista lähtien. Juosteiden synteesi valmistuu muutamassa minuutissa, ja sen jälkeen lämpötila nostetaan jälleen 95 asteeseen. Kaikki nauhat irtoavat toisistaan tässä lämpötilassa, minkä jälkeen denaturointi-annealing-pidennys -reaktiosarjaa, eli sykliä, toistetaan haluttu määrä. (Suominen ym. 2013, 154.)

Ensimmäisessä syklissä alkuperäisestä DNA-segmentistä saadaan yksi kopio. Uuden syklin alkaessa sekä alkuperäinen DNA-nauha sekä edellisessä syklissä muodostunut kopio tuottavat uudet kopiot. PCR-menetelmässä on yleensä noin 30-40 sykliä. (Roche Molecular Diagnostics 2016.) Kun syklejä toistetaan tarpeeksi monta kertaa, hyvin pienestäkin määrästä templaatti-DNA:ta voidaan saada monistettua suuriakin määriä pituudeltaan tarkalleen määritettyjä DNA- jaksoja (Suominen ym. 2010, 154).

RT-PCR-menetelmässä käytetään koettimia, joiden toinen pää on leimattu fluoresoivalla väriaineella eli fluoroforilla ja toinen sammuttajalla, jonka tarkoitus on estää fluoroforin fluoresointireaktio silloin, kun koetin ei ole kiinnittynyt sille komplementaariseen nukleiinihappoketju-juosteeseen. Määritettävän kohteen, eli opinnäyttyömme tapauksessa viruksen, läsnä ollessa koettimet hybridisoituvat, eli kiinnittyvät alukkeiden rajaamaan nukleiinihappoketju- jaksoon. Fluorofori säteilee fluoresoivaa signaalia, joka havaitaan RT-PCRn optisella yksiköllä. (R-Biopharm 2014.) Mikäli reaktiossa on mukana spesifisiä virusjaksoja, niiden läsnäolo ilmenee fluoresenssin kasvuna, joka ilmoitetaan Ct-arvona eli syklin kynnyksarvona (Fast-Track Diagnostics 2015).

Multiplex-PCR eroaa tavallisesta PCR:stä siten, että reaktioseokseen sisällytetään useita alukesarjoja. Tämän ansiosta kohdenukleiinihapposekvenssejä voidaan havaita useista viruksista, jotka voivat aiheuttaa samoja kliinisiä oireita. (Collier ym. 2011, 320.) Multiplex-PCR:ssä käytetyt alukkeet tulee olla tarkoin suunniteltuja (Lappalainen 2013). Alukkeiden toiminta riippuu paljon esimerkiksi siitä, kuinka ne vaikuttavat toisiinsa ja mikä niiden sulamislämpötila on (Sint ym. 2012). Mitä suurempi samassa reaktiossa käytettävien alukkeiden määrä on, sitä todennäköisemmin reaktion aikana tulee tapahtumaan epäspesifistä monistumista. Alukeparien toimivuutta, herkkyyttä ja spesifisyyttä tulisi testata sekä yhdessä että erikseen. (Lappalainen 2013.) Reaktio-olosuhteiden ja potilasnäytteiden käsittelyn tulee olla jokaiselle näytelaadulle erikseen optimoituja, jotta

epäspesifisyyksiltä välttyttäisiin (Elnifro, Ashshi, Cooper & Klapper, 2000; Lappalainen 2013).

6.3 Käyttö laboratoriodiagnostiikassa

Mahasuolikanavan infektioiden osin laboratoriodiagnostiikka on tukeutunut tavallisten tekniikoiden, kuten mikroskopian, virusviljelyn, antigeeninosoituksen sekä reaaliaikaisen PCR:n, yhdistelmään. Menetelmät on todettu suorituskyvyltään toimiviksi, mutta ovat työläitä ja aikaa vieviä. (Binnicker 2015.) Hiljattain markkinoille tulleilla multiplex-molekyylipaneeleilla voidaan mahdollisesti nopeuttaa laboratoriotyöskentelyä, edistää diagnostista tarkkuutta sekä tehostaa sairaalan resurssien käyttöä (Goldberg ym. 2014). Näitä multiplex-molekyyli menetelmiä on kehitetty infektiosairauksien määrittämiseen ja patogeenien identifiointiin (Binnicker 2015). Menetelmän käyttöalueita virusdiagnostiikassa ovat gastroenteriittien lisäksi esimerkiksi keskushermostoinfektioiden, matkailijoiden kuumetautien ja verenvuotokuumeiden diagnostiikka, respiratoristen infektioiden diagnostiikka ja monitorointi sekä verenluovuttajien ja verituotteiden seulonta (Lappalainen 2013).

Multiplex-paneelien mainittavia ominaisuuksia ovat muun muassa vaadittavan näyttemäärän vähentyminen verrattuna aikaisempiin määrityksiin, tunnistuspaneelien laaja määritysalue patogeenien suhteen sekä tehostunut kyky havaita samanaikaisesti useita eri taudinaiheuttajia. (Binnicker 2015). Jotkut laboratoriot ovat kehittäneet omia multiplex-PCR -menetelmiä tiettyjen lajien tai geenivarianttien määritykseen. Määritys voidaan suorittaa analysoimalla ampikonin eli PCR -monistustuotteen pituutta agarosigeelillä. Saatavilla on myös kaupallisia tutkimuskittejä, jotka sisältävät kaikki määritykseen tarvittavat komponentit, mukaan lukien tiettyjen geenien osoittamiseen käytettävät alukkeet. (Brown & Brown 2011, 288; Makarewicz ym. 2015, 40.)

Multiplex-menetelmiä voidaan käyttää rutiinidiagnostiikassa sekä akuuttien että latenttien infektioiden diagnosoimiseen (Lappalainen ym. 2011). Maha-suolikanavan infektioiden tunnistuksessa käytettävät multiplex-menetelmät kohdentuvat nukleiinihappoihin ja eivät siten pysty erottamaan elinkykyisiä, jakautuvia taudinaiheuttajia lisääntymiskyvyttömistä patogeeneista. Tämä voi olla tärkeä tekijä mahasuoli-kanavan infektioiden diagnosoimisessa, sillä tunnistuspaneeleissa esiintyvien patogeenien, kuten esimerkiksi

adeno-, astro-, noro- ja rotavirusten on todettu erittyvän ulostenäytteisiin vielä pitkään sairastamisen jälkeen. (Binnicker 2015.)

7 VERTAILTAVIEN TUNNISTUSMENETELMIEN EROT JA YHTÄLÄISYYDET

7.1 Menetelmien käyttötarkoitus

Vertailemamme tunnistuskitit ovat R-Biopharmin RIDA®GENE Viral Stool Panel 1, Fast-Track Diagnosticsin FTD Viral gastroenteritis ja Seegenen Allplex™ Gastrointestinal infection Full Panel. Kaikki tunnistuskitit on tarkoitettu akuuttia gastroenteriittiä aiheuttavien virusten tunnistamiseen. Tutkimuskitit ovat myös kaikki multiplex-PCR -menetelmään perustuvia, eli ne tunnistavat useita viruksia yhden tutkimuksen avulla.

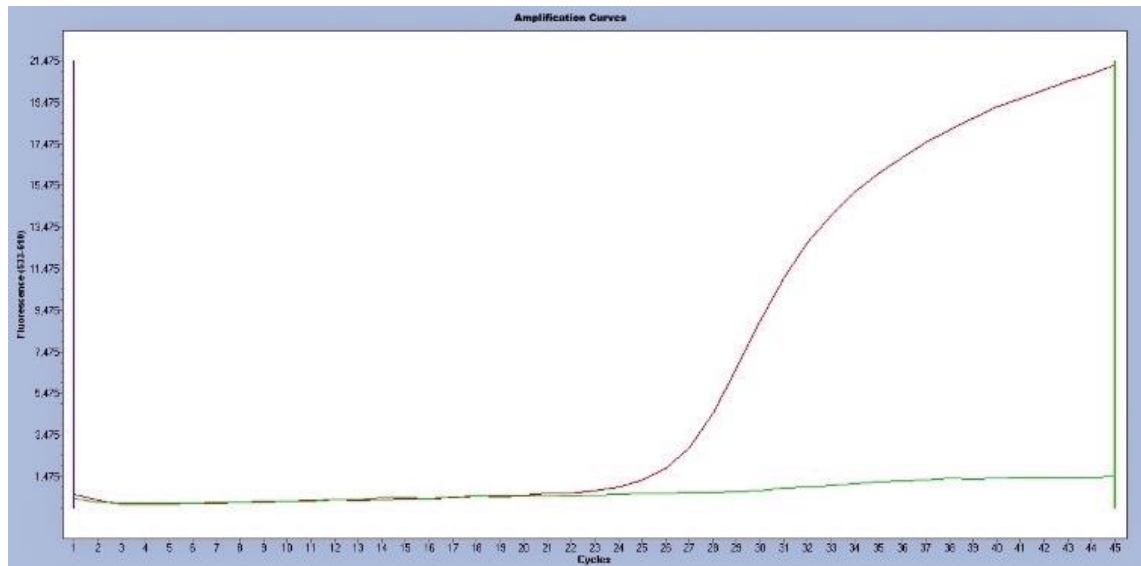
Seegenen Allplex™ Gastrointestinal Full Panel - menetelmän avulla voidaan löytää ja tunnistaa samalla kertaa 25 erilaista mahasuolikanavan patogeenia. Patogeenien tunnistus on jaettu neljään eri paneeliin, joista paneelia I käytetään virusten, norovirusten GI ja GII, rota-, adeno-, astro- sekä sapoviruksen tunnistukseen. (Seegene Inc. n.d.a.) Kyseiset virukset kuuluvat myös Fast-Track Diagnosticsin FTD Viral gastroenteritis – menetelmän tutkimuksiin (Fast-Track Diagnostics 2015). Biopharmin RIDA®GENE Viral Stool Panel I: sen erona muihin valmistajiin on se, että sen tunnistuskitti ei sisällä alukkeita sapovirusten määrittämiseen (R-Biopharm 2014). Valmistajien viruskohtaista tunnistuskittitarjontaa havainnollistetaan taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Eri tunnistuskiteillä tunnistettavat virukset

	RIDA®GENE	Seegene	Fast-Track
Norovirus	x	x	x
Rotavirus	x	x	x
Astrovirus	x	x	x
Adenovirus	x	x	x
Sapovirus	-	x	x

7.2 Menetelmien toimintaperiaate

Valmistajien menetelmät ovat reaaliaikaisia multiplex RT-PCR-menetelmiä. Kuviossa 1 on esitettynä RIDA®GENE Viral Stool Panel I:n onnistunut rotaviruskontrollin ajo. Näyteajossa näyte arvioidaan positiiviseksi, jos se yksin tai yhdessä sisäisen kontrollin kanssa muodostaa samanlaisen nousevan käyrän. (R-Biopharm 2014.)



KUVIO 1. Rotaviruksen onnistunut positiivisen ja negatiivisen kontrollin ajo (R-Biopharm 2014, muokattu)

Seegenen Allplex™ Gastrointestinal Full Panel Assay on reaaliaikainen yksivaiheinen multiplex RT-PCR-menetelmä, joka perustuu Seegenen patentoituun MuDT™ (Multiple Detection Temperatures) -teknologiaan, ja jossa hyödynnetään neljää, osittain samoja arvoja mittaavaa detektiokanavaa. MuDT™-teknologialla voidaan samanaikaisesti havaita ja erottaa useita määritettäviä taudinaiheuttajia. Mikäli infektiota aiheuttajana on yksi tietty patogeeni, MuDT™-teknologia, kuten moni muukin teknologia, tuottaa tälle patogeenille Ct-arvon käyttäen yhtä fluoresoivaa kanavaa. Erona MuDT™-teknologiassa on se, että usean eri patogeenin omaavan näytteen tapauksessa menetelmällä voidaan tuottaa Ct-arvo kullekin patogeenille samanaikaisesti käyttäen edelleen yhtä samaa fluoresoivaa kanavaa, siinä missä toisenlainen teknologia näyttäisi vain yhden, vallitsevan Ct-arvon. (Seegene Inc. n.d.a, n.d.b.)

7.3 Tunnistuskittien reagenssit ja näytteiden käsittely

Tunnistuskittit ovat valmiita paketteja, joihin on jo valmistusvaiheessa lisätty kaikki tutkimuksessa tarvittavat reagenssit; kukin valmistaja käyttää omia, patenttisuojattuja versioitaan. Analysointivaiheeseen tunnistuskittin lisäksi tarvitaan vain tutkittavaa materiaalia, eli tässä tapauksessa ihmisten ulostenäytettä. Ennen PCR-ajon suorittamista näytteen DNA täytyy kuitenkin eristää, jotta PCR-monistusreaktio mahdollistuisi.

FTD Viral gastroenteritis – menetelmän FTD-3-32 kitissä on aluke-koetin-seos norovirusille (G1 ja G2 sekä sisäinen kontrolli), yhteinen seos adeno-, astro-, ja rotaviruksille sekä oma seos sapovirukselle. Nämä aluke-koetin seokset ovat kooltaan 48 µl. Tunnistuskittissä on 150 µl:n positiivinen kontrolli sapovirukselle sekä 300 µl:n suuruinen positiivinen kontrolli muille kitin viruksille. Muita tunnistuskittiin sisältyviä reagensseja ovat 2000 µl:n negatiivinen kontrolli, 64 µl:n sisäinen kontrolli, 96 µl:n entsyymiseos sekä 1200 µl:n puskuriliuoksen. FTD-3-32 kitin reagenssit riittävät enintään 30 eri näytteen määritykseen yhdessä positiivisen ja negatiivisen kontrollin kanssa. Vastaavasti FTD-3-64 kitillä voidaan määrittää enintään 62 erillistä näytettä käytettäessä sekä positiivista että negatiivista kontrollia. (Fast-Track Diagnostics 2015.) FTD-3-64 kittiin sisältyvät reagenssimäärät ovat kaksinkertaiset FTD-3-32 kitin sisältöön nähden.

RIDA®GENE Viral Stool Panel I -kitti sisältää kaksi 700 µl:n reaktioseosta, yhden 770 µl:n aluke-koetin-seoksen, 80 µl:n entsyymiseoksen, kaksi 1800 µl:n sisäistä RNA-kontrollia, yhden 500 µl:n PCR-veden sekä 100 µl:n positiivisen kontrollin. Tunnistuskittin reagenssiampullien korkit ovat värikooditettuja. Yhden paketin reagenssit riittävät sataan määritykseen. (R-Biopharm 2014.)

Kunkin valmistajan reagenssit tulee säilyttää valolta suojattuina -20°C pakkasessa ja käyttää niiden eräpäivään mennessä, sillä valmistaja ei takaa niiden laatua enää vanhentumisen jälkeen. Reagenssit sulatetaan ennen niiden käyttöä ja ne tulee laittaa takaisin pakkaseen heti käytön jälkeen. Fast-Track Diagnostics (2015) suosittelee välttämään yli yhdeksää sulatus- ja pakastuskertaa, sillä reagenssien altistuminen toistuville lämpötilanvaihteluille voi vähentää menetelmän herkkyyttä. R-Biopharmin (2014) mukaan jäädytys-sulatusprosessin voi tehdä viidesti ilman, että se vaikuttaa menetelmän suorituskykyyn. Molemmat valmistajat kehottavat jakamaan reagenssit ensimmäisen sulatuskerän jälkeen pienempiin alieriin (R-Biopharm 2014; Fast-Track Diagnostics 2015).

Ulostenäyte suspensoidaan puskuriliuokseen kunkin valmistajan ohjeiden mukaisesti. RIDA®GENE Viral Stool Panel I -kitin työohjeen mukaan ulostenäyte olisi hyvä laimentaa suhteessa 1:10 ennen eristysprosessia. Suspensio vorteksoidaan hyvin ja suositellaan sentrifugoitavaksi kierrosnopeudella 12000 rpm minuutin ajan. Kitin sisäistä RNA-kontrollia (ICR) voidaan käyttää joko ainoastaan PCR-inhibitiokontrollina tai sen lisäksi myös eristyskontrollina näytteen valmistelussa. Mikäli ICR on käytössä vain inhibitiokontrollina, sitä lisätään mastermixin 1 µl. Kun kontrollia käytetään molempiin aiemmin mainittuihin tarkoituksiin, sen määrä on 20 µl, joka lisätään eristysvaiheessa. ICR:n lisäystä ei tule tehdä koskaan suoraan näytteeseen, vaan se lisätään näytepuskuriseokseen. (R-Biopharm 2014.)

FTD Viral gastroenteritis –menetelmässä ulostesuspensiota suositellaan sentrifugoitavaksi 14000 rpm kierrosnopeudella viiden minuutin ajan. Suspension supernatantti ja puskurisekoitetaan suhteessa 1:5. Valmistaja kehottaa eristämään 40 µl supernatanttia ja 160 µl puskuria, ja eluoimaan sen 55 mikrolitraan. Eristyskontrollina käytössä on BMV (brome mosaic virus) eli kattaran mosaiikkivirus. (Fast-Track Diagnostics 2015.)

7.4 Yhteensopivat laitteistot

Seegene (n.d.) on maininnut yhteensopivaksi laitteistoksi vain BIO-RADin CFX 96™ reaaliaikaisen PCR-järjestelmän, joka soveltuu käytettäväksi myös FTD Viral gastroenteritis – menetelmän kanssa. Muita Fast-Track Diagnosticsin (2015) mainitsemia RT-PCR-laitteistoja ovat Thermo Fisher Scientificin Applied Biosystems® 7500/7500Fast, Roche'n Light-Cycler®480 ja Qiagenen Rotor-Gene 3000, 6000, Q sekä Cepheidin SmartCycler® yhdessä Life Science software 2.0d:n kanssa. R-Biopharm (2014) listaa RIDA®GENE Viral Stool Panel I - työohjeessaan yhteensopiviksi PCR-instrumenteikseen Roche'n LightCycler® 480II- ja Stratagenen Mx3005P-laitteistot.

8 MENETELMÄVERTAILUN TOTEUTUS

8.1 Lähtökohdat

Toteutimme opinnäytetyön koestusvaiheen 05.-09.10.2015, jolloin käytimme yhden päivän tiloihin tutustumiseen sekä näytteiden esikäsittelyyn, minkä jälkeen käytimme seuraavat kolme päivää varsinaiseen koestukseen. Fimlab Laboratoriot Oy oli koestusta varten kerännyt yhteensä 96 eri potilasnäytettä omalta toimialueeltaan sekä Seinäjoen mikrobiologian yksikön potilasnäytteistä. Koska näytteet olivat aitoja potilasnäytteitä, ne oli analysoitu ja vastattu ennen opinnäytetyömme koestusvaihetta. Näytteiden joukossa oli sekä positiivisia että negatiivisia näytteiden edustavuuden varmistamiseksi. Alun perin käytettäväksi näytemääräksi suunniteltiin noin 150 ulostenäytettä, mutta määrää pienennettiin teknisistä syistä.

8.2 Näytteiden esikäsittely

Opinnäytetyömme koestusvaihe alkoi näytteiden uudelleenidentifioinnilla, jolloin korvasimme aiemmin käytössä olleet tutkimusnumerot juoksevalla numeroinnilla. Käytännössä tämä toteutettiin liimaamalla näyteputkien, sekä niitä vastaavien eristysputkien, kylkiin uudet tarralaput, sekä kirjaamalla erilliseen taulukkoon ylös kutakin numeroa vastaava aiempi tutkimusnumero. Varsinaiset henkilötiedot jäivät siis vain opinnäytetyömme toimeksiantajan, sairaalamikrobiologi Jari Hirvosen, tietoon.

Identifioinnin jälkeen toteutimme näytteiden siirrostuksen eristysputkiin, jotka sisälsivät 2 ml TE-puskuria, eli tris-EDTA:ta. Suoritimme siirrostuksen vetokaapissa, ja käytimme siinä sekä nukkatikkuja, että myöhemmin pumpulitikkuja näytetikkujen loputtua kesken. Saamamme ohjeen mukaan keräsimme siirrostustikkuun joko pienen nokareen näytettä tai kastoimme puolet tikusta nestemäiseen näytteeseen, minkä jälkeen sekoitimme siirrostustikkua voimakkaasti TE-puskurissa (kuva 1). Tavoitteena oli, että eristysputkessa oleva puskuriliuos vaihtaisi väriä, mutta että siihen ei jäisi kiinteitä paloja tai hitusia, jotka myöhemmin häiritisivät eristyksen suorittavan automaatin toimintaa. Johtuen näytemäärän suuruudesta jaoimme siirrostuksen tasan opinnäytetyön tekijöiden kesken: kukin siirrosti noin 32 näytettä.



KUVA 1. Ulostenäytteiden siirrostus eristysputkiin (Kuva: Hanna Saari 2015)

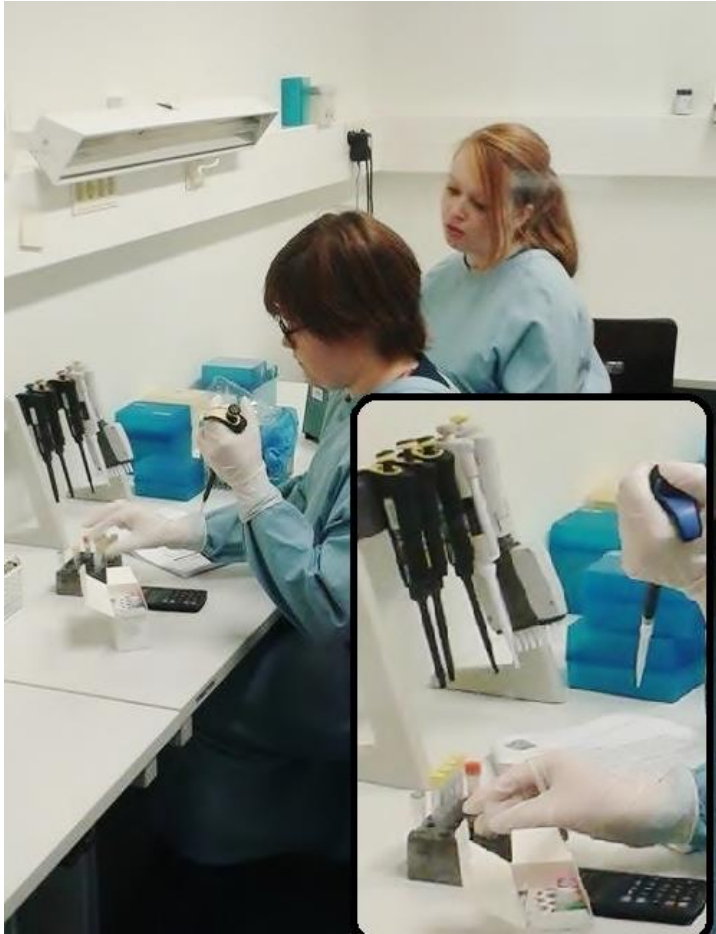
8.3 Nukleinihapon eristys

Toteutimme nukleinihappojen eristämisen näytteistä Abbott m2000 sp –automaatilla, jotta inhimillisten virheiden mahdollisuus saataisiin minimoitua, ja jotta tuloksena olisi mahdollisimman tasalaatuista materiaalia multiplex-PCR -menetelmien vertailuun. Eristyksessä käytimme totaalinukleinihappoeristyskittiä. Eristysautomaattia varten irrotimme eristysputkista korkit ja tarkistimme, että putkien näytemateriaali oli mahdollisimman homogeenista. Tarvittaessa poistimme mahdolliset kokkareet ja hituset kertakäyttöpipetillä varmistaaksemme, etteivät ne pääsisi tukkimaan automaatin pipetointijärjestelmiä.

8.4 Näyttereagenssit

Suurin osa reagenssien pipetoinnista tapahtui puhdastilassa, jonka käytöllä pyritään minimoimaan vieraan DNA:n tai RNA:n sekä niitä hajottavien entsyymien päätyminen tutkimusreagenssiin. Fimlab Laboratoriot Oy:llä puhdastilan erottaa muusta työskentelyalueesta välitila, jossa pukeudutaan suojatakkiin, kertakäyttöhansikkaisiin sekä yhteiskäytössä oleviin kenkiin ennen varsinaiseen puhdastilaan siirtymistä (kuva 2). Puh-

dastilassa olevia välineitä ei saanut tuoda tilasta ulos, eikä sinne myöskään saanut tuoda nukleiinihappoja tai niitä hajottavia entsyymeitä. Työskenneltäessä pyritään liikkumaan rauhallisesti ja välttämään avoimien reagenssiputkien ylitse kurottelua.



KUVA 2. Puhdastilatyöskentelyä (Kuva: Siru Koskinen 2015; Hanna Saari 2016)

Opinnäytetyössämme vertailtavien kittien reagensseja säilytettiin pakastimessa, minne ne myös pipetointien jälkeen palautettiin myöhempää käyttöä varten. Jokaisen kitin mastermixit pipetoitiin tehdaspuhtaisiin 2,5 ml:n Eppendorf-putkiin. Reagenssien käyttömäärät laskettiin kittien työohjeissa annettujen kaavojen mukaan. Vaikka tutustuimmekin työohjeisiin ja laskimme mastermixiin tarvittavat reagenssimäärät yhdessä, päädyimme jakamaan varsinaisen pipetointivaiheen niin, että kukin opinnäytetyön tekijä pipetoi yhtenä päivänä mastermixit ja keskittyi muina päivinä toisiin työvaiheisiin.

RIDA@GENE Viral Stool Panel 1: sen mastermix-määrän laskimme ensin annetun työohjeen mukaan niin, että mukana oli 10% ylimääräistä mahdollisten pipetointivirheiden varalta. Koska liuosta laskettiin näin tulevan yhteensä 2170 μ l, päädyimme jakamaan

mastermixin varmuuden vuoksi kahteen Eppendorfiin, mikä käytännössä tarkoitti alkuperäisten laskettujen mastermix-määrien jakamista kahdella.

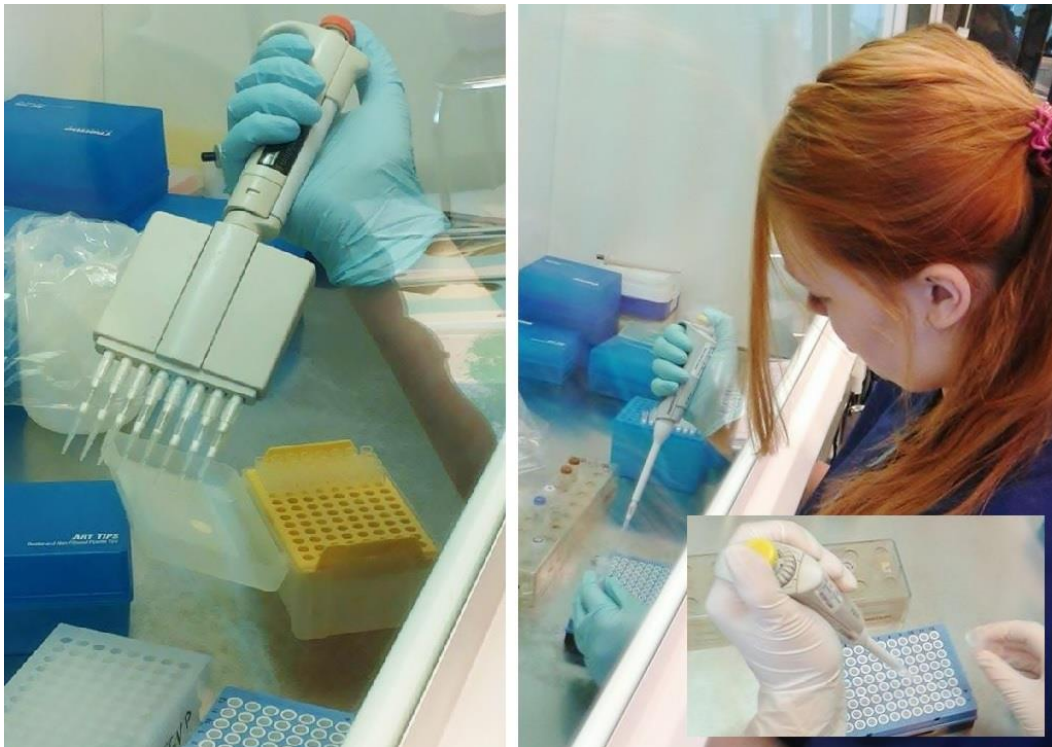
Fast-Track FTD Viral gastroenteritis –paneelissa saimme laskettua mastermixin liuosmäärät kertomalla 96:lla kirjallisessa ohjeessa kerrotut liuosmäärät yhtä reaktiota varten. Koska mastermixiä oli yhteensä 1440 µl, johon myöhemmin lisättiin vielä sisäinen kontrolli, totesimme yhden Eppendorf-putken riittävän. Menetelmässä tehdään yhteensä kolme PCR-ajoa, joista yhdessä on noroviruksen G1 ja G2 –kannat tunnistavia, toisessa astro-, rota- ja adenoviruksille tarkoitettuja ja viimeisessä sapoviruksen kanssa yhteensopivia alukkeita. Kolmesta PCR-ajosta johtuen menetelmä tarvitsee yhteensä kolme mastermixiä, joten ajoitimme seuraavan mastermixin pipetoinnin aina edellisen ajon yhteyteen välttyäksemme valmiiden mastermixien huoneenlämmössä seisottamiselta. Samasta syystä säilytimme reagenssiluokset pipetointien välillä jääkaapissa.

Seegene Allplex™ GI-Virus Assay –menetelmässä mastermixin liuosmäärät saatiin myös suoraan kertomalla yhteen reaktioon tarvittava määrä 96:lla. Lopulliseksi määräksi saimme 1920 µl mastermixiä, jonka totesimme mahtuvan yhteen Eppendorfiin.

8.5 Näytteiden pipetoinnit sekä PCR-ajo

Kaikissa menetelmissä mastermixiin lisättiin muiden reagenssien lisäksi myös sisäinen kontrolli, jotta välttyttäisiin sen lisäämiseltä näytteiden pipetointivaiheessa jokaiselle näytekupalle erikseen. Toteutimme tämän vaiheen ennen varsinaisten näytteiden pipetointia samassa vetokaapissa, kuin missä pipetoimme näytteet. Tasapuolisuuden vuoksi kukin opinnäytetyön tekijöistä suoritti yhden koestuskitin pipetoinnit (kuva 3).

Jokaisella menetelmällä käytettiin myös positiivista ja negatiivista kontrollia. Näistä positiivinen kontrolli oli kunkin menetelmän oma, mukana tuleva reagenssi, ja negatiivinen kontrolli toteutettiin pipetoimalla näytekuppaan tislattua vettä. Päädyimme laittamaan jokaiselle kuoppalevyille positiivisen kontrollin kuoppaan G12 ja negatiivisen kuoppaan H12.



KUVA 3. Pipetointi kuoppalevyn näytekaivoihin (Linda Luoma 2015; Hanna Saari 2016)

Koska käytimme koetuksessamme 96-kuoppalevyjä, päädyimme kontrollien lisäksi ajamaan jokaisella menetelmällä 94 näytettä. Näytteitä 95 ja 96 ei siis ajettu ollenkaan, eivätkä ne osallistuneet tutkimukseen. Myös nämä näytteet ovat kuitenkin säilytyksessä yhdessä tutkimuksessa käyttämiemme näytteiden kanssa $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakastimessa. Näytteistä on säilytetty sekä primaarinäytteet että niistä tehdyt eristysputket.

Ennen PCR-ajoa näytekupppalevyt sentrifugoitiin. Käytimme Fimlab Laboratoriot Oy:n tähän tarkoitukseen käyttämää Eppendorf Centrifuge 5430 –laitetta, johon on ohjelmoitu PCR-ajoja varten oma ohjelmansa. Teimme myös kaikki PCR-ajot yhdellä laitteella. Käytössämme oli Fimlab Laboratoriot Oy:n CFX96 Real-Time System –PCR-laite. Menetelmästä riippuen PCR-ohjelmat olivat joko valmiiksi ohjelmoituina laitteeseen tai ne ohjelmoitiin siihen erikseen sairaalamikrobiologi Jari Hirvosen toimesta.

9 MENETELMÄVERTAILUN TULOKSET

9.1 Menetelmien käytön vertailu

Kuten taulukossa 2 listataan, RIDA®GENE ja Fast-Track FTD Viral gastroenteritis eivät käyttöohjeissaan ota kantaa eristysvaiheeseen, mutta Seegene Allplex™ GI-Virus Assay –menetelmä sisältää omat eristysohjeensa. Tasapuolisuuden vuoksi päädyimme kuitenkin käyttämään kaikille menetelmille samaa näytemateriaalia, jonka eristämiseen käytimme automaattia. Eristysautomaattia käyttämällä minimoimme koestuksen tuloksiin vaikuttavien muuttujien, kuten esimerkiksi inhimillisestä virheestä johtuvan vaihtelun, määrän. Päädyimme eristysautomaatin käyttöön myös sen vuoksi, että sen käyttö on Fimlab Laboratoriot Oy:ssä vakiintunut käytäntö.

Reagenssien pipetointivaiheessa RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 erottui edukseen sillä, että reagenssiliuosten korkeissa oli selkeä merkintä niiden sisällöstä. Myös reagenssipurkkien kyljessä oli maininta, kuinka paljon niiden sisällä on reagenssia. Koimme tämän helpottavan pipetointia ja toimivan hyvänä varmistuskeinona, ettemme vahingossa päätyisi sekoittamaan reagenssiliuosten korkkeja – ja siten myös reagensseja – keskenään. Esimerkiksi Fast-Track FTD Viral gastroenteritis –menetelmän reagenssipurkeista puuttuivat tällaiset värikooditetut korkit, ja purkin sisällön joutui tarkistamaan purkinkylkien pieniä tekstejä lukemalla.

Toisin kuin RIDA®GENE:n menetelmässä, muiden vertailemiemme testikittien työohjeiden ilmoittamiin mastermix-liuosmääriin oli laskettu jo valmistajan toimesta pipetointivarat, emmekä siis joutuneet niitä erikseen laskemaan, mikä nopeutti laskutoimitusten tekoa. Toisaalta, koska työohjeiden pohjalta ei voi päätellä, kuinka suuret pipetointivarat ohjeisiin on laitettu, pipetointivaraa ei voi itsenäisesti säätää suuremmaksi tai pienemmäksi.

Taulukossa 2 olemme listanneet eri menetelmien vaatimia mastermix-liuosmääriä. Käytännössä koimme hankalaksi RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 – menetelmän mastermix-liuosmäärän, joka ohjeen mukaisesti kerrottuina ei mahtunut yhteen 2,5 ml:n Eppendorf-putkeen. Mastermixin jakaminen kahteen putkeen aiheutti ongelmia erityisesti 96-kuoppalevyille pipetoitaessa. Olisimme myös halunneet pipetoida koko mastermixin

kerralla ja siten välttyä mahdollisilta pienempien tilavuuksien aiheuttamilta pipetointivirheiltä.

Taulukon 2 listauksen mukaisesti totesimme, että RIDA®GENE –kitti vaati näytteiden pipetointivaiheessa vertailtavista menetelmistä vähiten näytettä: näytekaivoihin lisättiin vain yksi mikrolitra näytettä tai kontrollia. Muilla menetelmillä näytettä vaadittiin 5 µl, mikä toisaalta oli suurempana määränä helpompi pipetoida varmasti.

PCR-ajovaiheessa menetelmien väliset erot nousivat kaikista selvimmin esiin. Toisista menetelmistä poiketen RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 –kittiä ei oltu validoitu opinäytetyössämme käyttämällemme PCR-laitteelle. Jouduimme myös jättämään kyseisestä testipaneelistä adenovirustulokset pois, koska laitteen näytteiden analysointiin käytämät fluoresenssikanavat eivät sopineet yhteen testimenetelmän valmistajien antamien, tunnistuksessa käytettävien aallonpituuksien ohjeistojen kanssa. Vaikka tämä aiheuttaisikin ongelmia varsinaisessa laboratoriokäytössä, oman koestuksemme suhteen adenovirustulosten poisjättäminen tällä menetelmällä ei aiheuttanut ongelmaa, koska sairaalamikrobiologi Jari Hirvosen mukaan näytevalikoimaamme ei osunut yhtäkään adenovirusnäytettä. Taulukossa 2 esitellään kaikkien menetelmien yhteen ajoon kulu- neet ajat, joihin ei kuitenkaan ole laskettu mukaan pipetointivaiheita, eikä sentrifugoin- tia.

Seegene Allplex™ GI-Virus Assay sopi muista menetelmistä poiketen PCR- laitteellemme ilman ylimääräisiä ohjelmointeja. Osittain tämä johtunee siitä, että PCR- ajon tulosten varsinainen tulkinta tapahtui erillisen ohjelman avulla, jonne PCR:n anta- ma data tuli siirtää omaksi tiedostokseen. Muilla ohjelmilla vastaukset saatiin suoraan ilman välivaiheita.

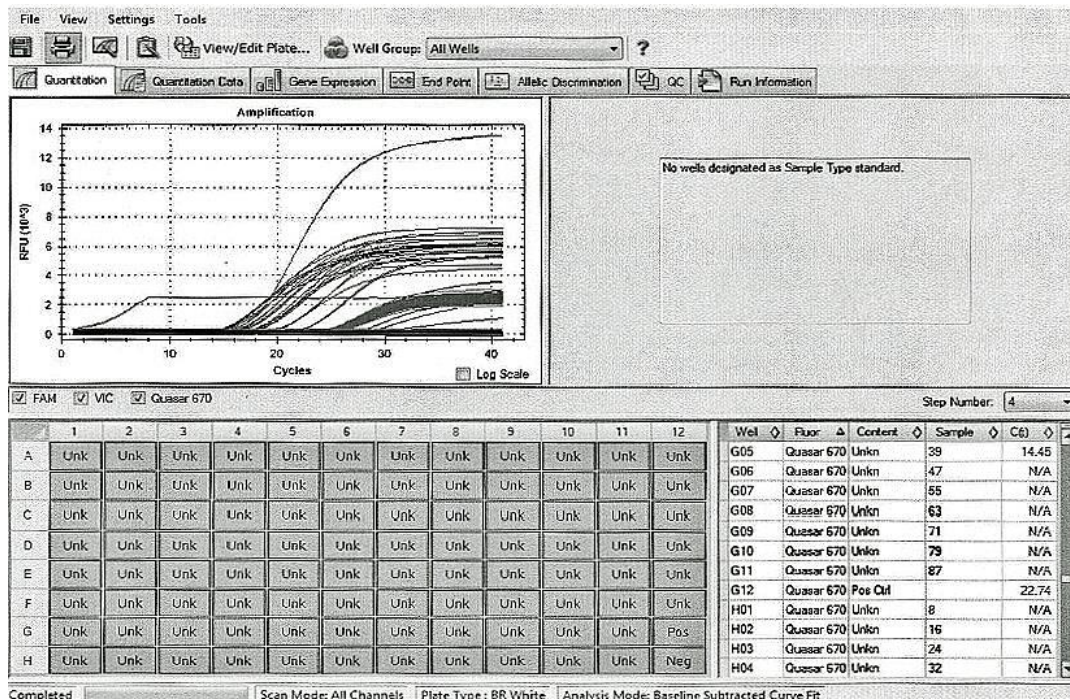
Fast-Track FTD Viral gastroenteritis –paneeli puolestaan vaati oman ohjelman luontia PCR-laitteellemme. Osittain tästä johtuen ajojen pituus ei ollut tiedossa ennen ensim- mäisen ajon loppua. Lopulta yhteen ajoon kului n. tunti ja 20 minuuttia. Omassa koe- stuksessamme menetelmä vaati 96 näytteellä yhteensä kolme ajoa (taulukko 2), joista jokainen vaatii oman näytelevynsä. Rutiinikäytössä menetelmä sopisikin parhaiten pie- nemmille näytemäärille. Tuloksia tarkastellessamme havaitsimme myös, että detektio- aallonpituudet eivät myöskään osuneet aivan kohdalleen, mikä voisi myös rutiinikäytös- sä aiheuttaa ongelmia tulosten varmennuksen suhteen.

TAULUKKO 2. Vertailtavien menetelmien eroja käytännön työskentelyn suhteen

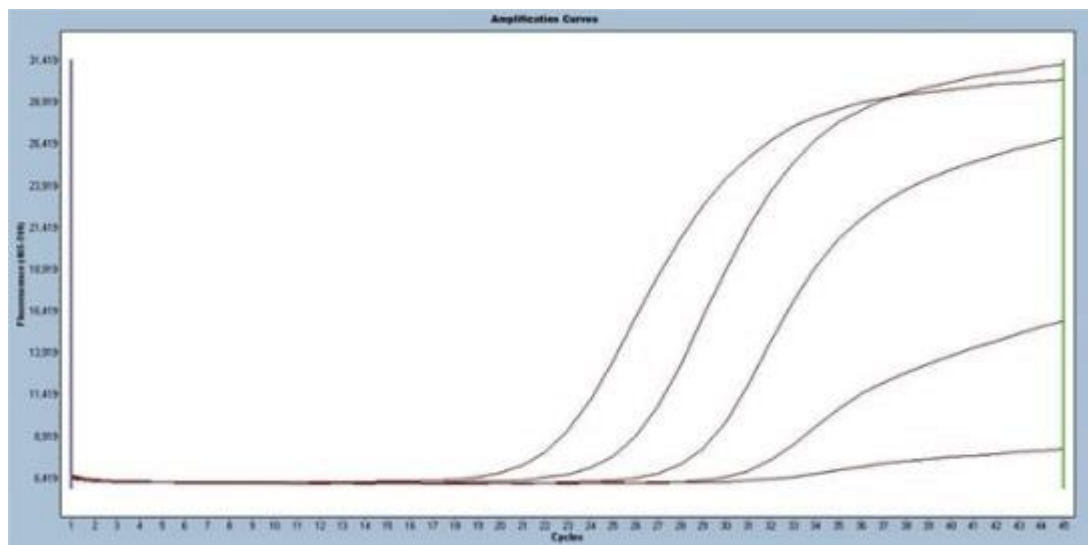
	RIDA®GENE	Seegene	Fast-Track
Eristys	-	oma ohjelma	-
mastermix reagenssimäärä / 96 näytettä	2170µl	1920µl	1440µl
Näytemäärä / näytekuppa	1µl	5µl	5µl
PCR-ajojen määrä	1	1	3
Yhden PCR-ajon kesto	n. 1h 20min	n.2h 44min	n.1h 20min

9.2 Saatu materiaali

Sekä Fast-Track FTD Viral gastroenteritis, että RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 -menetelmissä tulokset saatiin suoraan tulkittuina RT-PCR:ltä ajon jälkeen. Varsinaisten tuloslistauksien lisäksi on mahdollista myös nähdä PCR-ajon aikana tallentuva kuvaaja, josta voi reaaliaikaisesti seurata ajon edistymistä. Kuviossa 2 nähdään skannattu tuloste Fast-Track FTD Viral gastroenteritis-menetelmän PCR-ajon tulosnäköymästä ja kuviossa 3 puolestaan havainnollistetaan R-Biopharmin (2014) RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 -menetelmän tuloskuvaajaa.



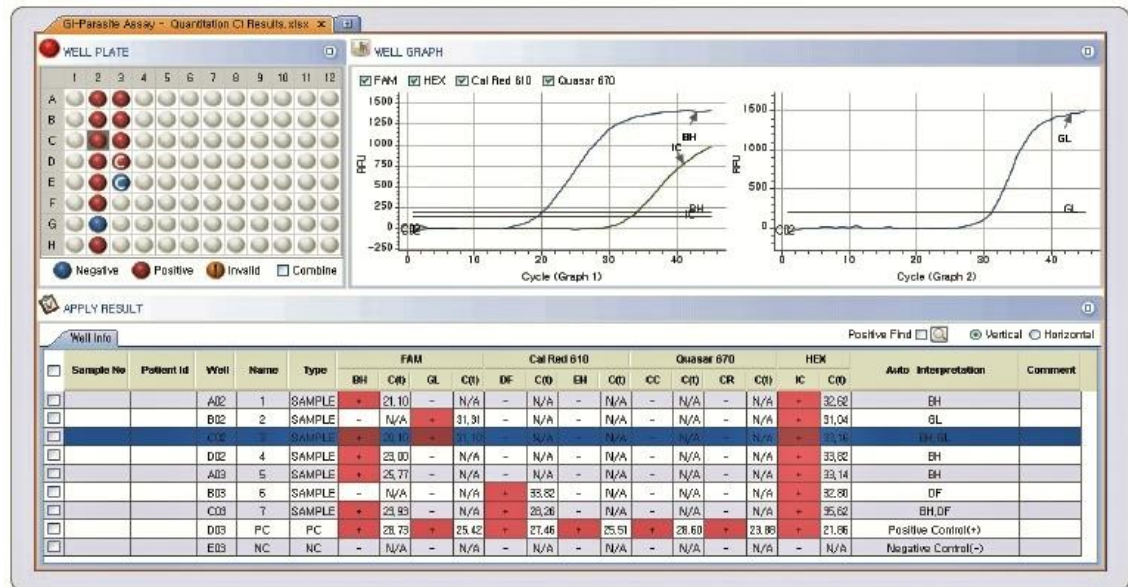
KUVIO 2. PCR-ajosta tallentunut tulospäätelmä (Fast-Track Diagnostics 2015, muokattu)



KUVIO 3. RIDA®GENE Viral Stool Panel 1-menetelmän tulospäätelmä (R-Biopharm 2014, muokattu)

Seegene Allplex™ GI-Virus Assay –menetelmän antamien tulosten tulkinta puolestaan ei ole suoraan saatavana PCR:llä, vaan välissä pitää olla erillinen tulkintaohjelma, jonne PCR:n tuottama tiedosto ensin siirretään. Tulosten tulkitseminen ilman tulkintaohjelmaa on myös mahdollista, mutta tulkintaohjelma mahdollistaa niiden suoran hyödyntämisen.

Muilla menetelmillä tulisi ennen varsinaista käyttöönnottoa tehdä Cutoff threshold –arvot, joilla poistettaisiin positiivisten löydösten joukosta ne, joiden signaalitasot ovat liian matalat, eli jotka ovat todellisuudessa negatiivisia. Seegenen (n.d.a) Allplex™ GI-Virus Assay :n tuloskuva on esitettyinä kuviossa 4.



KUVIO 4. Seegene Allplex™ GI-Virus Assay :n tuloskuva (Seegene Inc. n.d.a, muokattu)

9.3 Tulosten käsittely

Koska opinnäytetyömme tarkoituksena on vertailla käyttämiemme menetelmien saamia tuloksia keskenään, listasimme jo opinnäytetyön toteutusvaiheessa koestuksesta saamamme tulokset yhteen taulukkoon, jonka myöhemmin siirsimme Excel-muotoon (liite 1). Kyseisessä taulukossa on listattu kunkin tutkimuksessa mukana olleen näytteen näyttenumeroa vastaava juokseva numerointi sekä sen saamat tulokset jaoteltuna omiin sarakkeisiinsa sekä käyttämämme kolmen eri menetelmän, että viiden eri tutkitun viruksen (adeno-, astro-, noro-, rota- ja sapovirus) kohdalla. Tulokset saavat positiivisen tai negatiivisen arvon, jossa positiivinen tarkoittaa kunkin viruksen kohdalla PCR:ssä tapahtunutta monistumaa, eli siis diagnostista löydöstä. Lisätäksemme taulukon havainnollisuutta päädyimme myös merkitsemään jokaisen positiivista tulosta merkitsevän solun taulukosta vihreällä värillä. Mikäli kyseisen näytteen kohdalla oli esiintynyt adeno-, astro- tai sapovirusten suhteen eriäviä tuloksia eri menetelmien kohdalla, merkitsimme myös kyseisen näytteen numeron keltaisella värillä. Merkitsimme myös noro- ja

rotavirusten kohdalla punaisella ne näytteet, joissa jokin menetelmä oli saanut muista menetelmistä poikkeavan tuloksen. Lisäsimme taulukkoon myös sarakkeen, jossa laskeaan yhteen kunkin näytteen eri menetelmillä saamat positiiviset tulokset. Taulukossa on myös merkitty mustaksi adenovirussarake RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 –menetelmän kohdalla, koska kyseisellä menetelmällä ei koetuksessamme tämän viruksen tuloksia otettu huomioon.

Päädyimme koetuksessamme käsittelemään saamiamme tuloksia oikeina positiivisina ja negatiivisina sen perusteella, oliko vähintään kaksi käyttämästämme kolmesta menetelmästä päätynyt samaan tulokseen. Tätä rajanvetoa hyödynnettiin astro-, noro- ja rotavirusten kohdalla, joiden tunnistamiseen voitiin käyttää kaikkia kolmea testimenetelmää. Sen sijaan adeno- ja sapovirusten kohdalla, joita ei voitu tutkia RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 –menetelmällä, tämä rajanveto ei ollut mahdollinen. Emme kuitenkaan kokeneet tätä ongelmaksi tutkimuksen luotettavuuden kannalta, johtuen siitä, että kyseisiä viruksia ei 94 näytteen tutkimusaineistossamme juuri esiintynyt.

Seuraavana vaiheena tulosten käsittelyssä erottelimme alkuperäisestä taulukosta kunkin viruksen kullakin menetelmällä saadut positiiviset ja negatiiviset vastaukset ja taulukoimme niiden lukumäärät. Lisäksi laskimme aiemmin mainittuja rajanvetoja hyödyntäen astro-, noro- ja rotaviruksille oikeiden positiivisten ja negatiivisten tulosten lukumäärän.

9.4 Tulosten läpikäyminen

Norovirusta esiintyi tutkituissa näytteissä ehdottomasti eniten, ja 27 % näytteistämme osoittautui noroviruksen suhteen positiivisiksi. Tämän viruksen kohdalla sekä Seegene Allplex™ GI-Virus Assay että Fast-Track FTD Viral Gastroenteritis – tutkimuskitit päätyivät täsmälleen samoihin tuloksiin. RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 –menetelmä sen sijaan sai alkuperäisen, liitteenä olevan taulukon perusteella kahden näytteen, numeroiden 91 ja 93, kohdalla väärän negatiivisen tuloksen. Näiden kyseisten näytteiden kohdalla menetelmän sisäinen kontrolli oli kuitenkin jäänyt monistumatta eli jäänyt negatiiviseksi.

RIDA®GENE:n käyttöohjeen mukaan näyte voidaan hyväksyä sisäisen kontrollin ollessa negatiivinen vain silloin, jos jokin kitin sisältämistä kohdevirusia osoittavista koettimista monistuu, eli kun näyte osoittautuu jonkin viruksen suhteen positiiviseksi. Näiden kahden näytteen kohdalla näin ei ole kuitenkaan käynyt, eikä PCR-ajossa ole tapahtunut siis mitään monistumaa. Näin ollen kyseisiä tuloksia ei voida pitää luotettavina, vaan niiden kohdalla tutkimus pitäisi suorittaa uudelleen. Tämän huomioidaksemme olemmekin jättäneet kyseiset kaksi näytettä pois RIDA®GENE:n kohdalta taulukosta 3.

TAULUKKO 3. Noroviruksen suhteen positiiviset ja negatiiviset näytteet

Norovirus	Seegene	FastTrackDiagnostics	RidaGene
Positiiviset	25	25	23
Oikeat positiiviset	25		
Negatiiviset	69	69	69
Oikeat negatiiviset	69		

Näyteaineistostamme rotaviruksen suhteen positiivisia näytteitä oli odotusten mukaisesti toiseksi eniten norovirusten jälkeen. Kyseisen viruksen kohdalla esiintyi myös toiseksi eniten hajontaa tulosten suhteen. Aiemmin esittelemämme rajanvedon perusteella rotaviruspositiivisia näytteitä oli 3 % kaikista näytteistä. Kuten taulukosta 4 ilmenee, myös rotaviruksen kohdalla sekä Seegene että Fast-Track päätyvät täysin samoihin tuloksiin. RIDA®GENE:n saamat tulokset sen sijaan poikkeavat reilusti, yli 130 % oikeiksi positiivisiksi katsotuista näytteistä. Jaettaessa RIDA®GENE:lla saadut väärät positiiviset näytteiden kokonaismäärällä, päädytään siihen, että RIDA®GENE:lla kaikista vastauksista vääriä positiivisia on 4 %.

Koska RIDA®GENE:n käyttöohjeen perusteella näyte voidaan hylätä vain silloin, kun sekä sisäinen kontrolli että varsinainen kohde-DNA jäävät näytteessä monistumatta, rutiinikäytössä nämä tulokset olisi hyväksytty, etenkin kun osassa tuloksista myös sisäinen kontrolli on monistunut odotetulla tavalla. Selvitystä tilanteeseen voidaan kuitenkin etsiä näytteestä numero 47, joka RIDA®GENE:n menetelmällä on saanut positiivisen tuloksen kaikilla tutkimuskitin kohdevirusilla (adenovirusta huomioimatta). Mahdollista on, että poikkeavat tulokset johtuvat siitä, että menetelmä ei ole validoitu käyttämällemme PCR-laitteille. Toinen vaihtoehto on myös, että kyseisessä näytteessä on tapahtunut epäspesifiä monistumaa testin koettimien reagoitua jonkin muun näytteessä olleen

DNA:n kanssa, kuin mitä menetelmässä alun perin oli tarkoitettu. Tähän viittaisi myös näytteen 78 saama tulos, joka on sekä rotaviruksen että astroviruksen suhteen positiivinen. Tätä on kuitenkin mahdotonta varmistaa, koska emme tiedä menetelmässä käytettyjen koettimien tarkkaa rakennetta. Voi toki olla mahdollista, että kyseiset näytteet ovat todellisuudessa positiivisia kaikkien RIDA®GENE:n osoittamien virusten suhteen, mutta pidämme tätä kuitenkin epätodennäköisenä vaihtoehtona.

TAULUKKO 4. Rotaviruksen suhteen positiiviset ja negatiiviset näytteet

Rotavirus	Seegene	FastTrackDiagnostics	RidaGene
Positiiviset	3	3	7
Oikeat positiiviset	3		
Negatiiviset	91	91	87
Oikeat negatiiviset	91		

Astrovirus oli tutkimuksemme kolmesta viruksesta viimeinen, jota voitiin tunnistaa kaikilla vertailussa olleilla tutkimuskiteillä. Näin ollen se oli myös viimeinen niistä viruksista, joiden kohdalla oikeat positiiviset näytteet kyettiin todentamaan sen perusteella, että enemmistö käyttämistämme menetelmistä päätyi samaan tulokseen. Astroviruspositiivisia näytteitä todettiin olevan yhteensä 1 % näytteistä.

Astroviruksen kohdalla vertailemissamme menetelmissä tapahtui myös eniten hajontaa tunnistuksen suhteen. Kuten taulukosta 5 voidaan havaita, Seegene ja Fast-Track jatkavat edelleen samoilla linjoilla, eikä menetelmien suhteen voi havaita mitään eroa tulosten suhteen. RIDA®GENE sen sijaan saa positiivisia tuloksia 400% enemmän kuin vertailun muut menetelmät. Varsinainen väriin positiivisten virheprosentti pysyy kuitenkin samana kuin rotavirustenkin kohdalla: 4 % kaikista tuloksista voidaan katsoa olevan väärä positiivisia.

TAULUKKO 5. Astroviruksen suhteen positiiviset ja negatiiviset näytteet

Astrovirus	Seegene	FastTrackDiagnostics	RidaGene
Positiiviset	1	1	5
Oikeat positiiviset	1		
Negatiiviset	93	93	89
Oikeat negatiiviset	93		

Vaikka RIDA®GENE:n testikitillä voikin rutiinitilanteessa määrittää adenovirusuusia ulostenäytteestä, emme voineet tehdä sitä opinnäytetyömme vertailussa laitteiston epäsojivuuden takia. Tämän vuoksi emme voineet käyttää muiden virusten kohdalla käyttämämme rajanvetoa oikeiden positiivisten löytämiseen.

Vertailun testikiteistä ainoastaan Fast-Track FTD Viral Gastroenteritis tunnisti näytteen 55 adenoviruspositiiviseksi. Kyseinen näyte oli myös tunnistettu kaikkien vertailusamme mukana olleiden näytteiden perusteella myös norovirusuun suhteen positiiviseksi. Epäselväksi jääkin, onko kyseessä todella adenoviruspositiivinen näyte, joka on vain jäänyt norovirusuun taakse piiloon, vai esimerkiksi epäspesifinen monistuma. Taulukossa 6 on esitetty adenovirusmäärityksen tulokset.

TAULUKKO 6. Adenovirusuun suhteen positiiviset ja negatiiviset näytteet

Adenovirus	Seegene	FastTrackDiagnostics	RidaGene
Positiiviset	0	1	-
Negatiiviset	94	93	-

Vertailemistamme tunnistuskiteistä Fast-Track ja Seegene tarjosivat sapovirusuun tunnistusmahdollisuuden. Näiden testikitien perusteella kyseistä virusuun ei tutkimusaineistossamme esiintynyt lainkaan (taulukko 7).

Koska Fast-Track –menetelmässä sapovirus ajetaan omana PCR-monistuksenaan, huomasimme tuloksista, että kahdessa näytteessä, numeroissa 2 ja 33, sisäinen kontrolli oli jäänyt monistumatta. Kuten RIDA®GENE:llä vastaavassa tilanteessa, myös Fast-Track ohjaa tällöin uusimaan näytteen ajon, mikäli näytteessä ei ole tapahtunut mitään monistumaa. Koska näissä näytteissä ei tapahtunut PCR-ajon onnistumista osoittavaa DNA-monistumista, päädyimme poistamaan kyseiset näytteet Fast-Track Diagnostics:n sarakkeesta kokonaan.

TAULUKKO 7. Sapovirusuun suhteen positiiviset ja negatiiviset näytteet

Sapovirus	Seegene	FastTrackDiagnostics	RidaGene
Positiiviset	0	0	-
Negatiiviset	94	92	-

9.5 Johtopäätökset

Käytettävyyden suhteen parhaiten Fimlab Laboratoriot Oy:n tämänhetkiseen laitteistoon sopii Seegenen Allplex™ GI-Virus Assay, jonka käyttäminen ei vaadi tällä hetkellä käytössä olevalta laitteelta mitään uudelleen ohjelmointeja. Toisaalta, valmistajan mukaan menetelmällä päästään parhaaseen tulokseen menetelmän omaa eristysohjetta noudattamalla. Oman koestuksemme yhteydessä havaitsimme Seegenen vertailukiteistä helpoimmaksi käyttää, ja saamiemme tulosten perusteella sitä voi pitää vähintäänkin yhtä luotettavana kuin muitakin menetelmiä.

Opinnäytetyömme koestusvaiheessa RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 –testikitin luotettavuus kärsi suuresti laitteiston yhteensopimattomuudesta. Saamamme materiaalin perusteella voimme melko varmasti sanoa, että testikitin ja varsinaisen monistuslaitteen eriävät asetukset aiheuttavat häiriöitä saatuihin tuloksiin väärin positiivisten muodossa. Tilanne todennäköisesti myös korjautuisi menetelmän validoinnin yhteydessä, ja mikäli menetelmän valinnassa painotetaan erityisesti nopeutta, RIDA®GENE on edelleen varteenotettava vaihtoehto.

Ajankäytön suhteen Fast-Track FTD Viral Gastroenteritis oli vertailemistamme menetelmistä hitain käyttämällemme näytemäärälle, ja kolmesta erillisestä ajosta johtuen se myös kulutti materiaaleja kaikista eniten. Toimintansa puolesta se kuitenkin vaikutti vertailumme luotettavimmista tutkimuskiteistä yhdessä Seegenen kanssa.

10 POHDINTA

Opinnäytetyömme tehtiin Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian yksikköön sairaalamikrobiologi Jari Hirvosen toimeksiantona. Työmme tarkoituksena oli vertailla toimeksiantajan valitsemia, eri valmistajien gastro-multiplex-PCR-tunnistuskittejä toisiinsa, ja tuottaa tämän vertailun perusteella luotettavaa vertailutietoa, jonka pohjalta mikrobiologian laboratorio voisi valita heille parhaiten sopivan tunnistuskitin. Vertailussa mukana olleita R-Biopharmin, Fast-Track Diagnosticsin ja Seegenen gastro-multiplex-PCR-tunnistuskittejä käytetään akuutin gastroenteriitin aiheuttajavirusten tunnistamisessa. Varsinaisen käytännössä tapahtuvan toiminnan testaamisen lisäksi päädyimme tutustumaan tarkemmin myös kyseisten kittien toimintaperiaatteisiin sekä esittelemään niiden eroja ja yhtäläisyyksiä muodostaaksemme kustakin vertailtavasta menetelmästä mahdollisimman kokonaisvaltaisen kuvan.

Opinnäytetyömme varsinaisen koestusvaiheen toteutimme 05.-09.10.2015 Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian yksikön molekyylibiologian laboratoriossa. Kyseisen viikon aikana tutustuimme laboratoriotiloihin ja työpisteisiin, esikäsittelimme tutkimuksessa tarvittavat näytteet sekä toteutimme varsinaisen koestusosuuden. Tutkimuksessa käytettävän laitteiston ja valmistajien tunnistuskittit saimme käyttöömmme yksiköstä. Aineistomme koostui Fimlab Laboratoriot Oy:n meille keräämistä, jo vastatuista potilaiden ulostenäytteistä. Saadessamme toimeksiannon emme vielä tarkasti tienneet, kuinka suuri analysoitava näytemäärä tulisi olemaan. Lopulliseksi tutkimusaineistoksi muodostui 94 potilasnäytettä. Näytteet oli kerätty toimeksiantajan omalta toimialueelta sekä Seinäjoen mikrobiologian yksikön potilasnäytteistä. Näytteiden joukossa oli sekä positiivisiksi että negatiivisiksi todettuja näytteitä tutkimusaineiston edustavuuden varmistamiseksi.

Pyrimme työskentelemään laboratoriossa mahdollisimman huolellisesti ja aseptisesti, sekä noudattaen Fimlab Laboratoriot Oy:n toimintatapoja. Panostimme erityisesti aseptiikan ylläpitämiseen näytteiden käsittelyssä johtuen näytemateriaalien tartuntavaarallisuudesta luonteesta. Halusimme myös varmistaa yksityisyydensuojan toteutumisen käyttämällä näytteiden identifiointiin henkilötunnusteiden sijaan juoksevaa numerointia. Myöskään näytteistä aiemmin tehdyt diagnoosit eivät tulleet tietoomme missään tutkimuksen vaiheessa, jotta kyseinen tieto ei pääsisi vaikuttamaan koestuksemme tulokseen.

Jokaisessa koestuksen työvaiheessa tähtäsimme siihen, että kaikkia näytteitä ja menetelmiä käsiteltäisiin tasa-arvoisesti. Lisäksi pyrimme noudattamaan Fimlab Laboratoriot Oy:n vakiintuneita toimintatapoja näytteiden analysoinnissa varmistaaksemme saamiemme tuloksien toistettavuuden. Esimerkiksi nukleiinihappojen eristämisen näytteistä käytimme automaattia, jotta multiplex-PCR -menetelmien vertailuun käytettävä materiaali oli mahdollisimman tasalaatuista ja inhimillisten virheiden mahdollisuus saatiin minimoitua. Lisäksi, vaikka käyttämämme eristysautomaatti olisi sallinut sisäisen kontrollin lisäämisen jo eristysvaiheessa, ja vaikka Seegene Allplex™ GI-Virus Assay:n ohje niin kehotetaankin tekemään, emme lisänneet näytteisiin sisäistä kontrollia tässä vaiheessa. Päätimme tehdä näin, koska käytimme samoja eristystuotteita kaikissa kiteissä vähentääksemme koestuksen lopputulokseen vaikuttavien muuttuvien tekijöiden määrää. Näin pystyimme myös varmistamaan, etteivät yhdessä kitissä käytetyt reagenssit päässeet vaikuttamaan muiden kittien toimintaan.

Koska kyseessä oli opinnäytetyö, päädyimme jakamaan eri kittien pipetointeja eri tekijöille, vaikka tämä saattoikin lisätä koestukseen muuttujia erilaisten pipetointien muodossa. Koimme, ettei ole järkevää antaa yhden ihmisen tehdä vain yhtä työvaihetta, koska yhtenä oppimistavoitteenamme oli harjoitella molekyylibiologian laboratoriossa toimimista. Koska myöskään tuloksissa ei ole suurta vaihtelua eri menetelmien välillä, pidämme tekijän vaihtumisesta johtuvia vaihteluja huomaamattoman vähäisinä.

Opinnäytetyön kirjallinen osuus toteutettiin TAMK:n kirjallisen raportointiohjeen mukaisesti. Opinnäytetyön teoreettinen osuus muodostuu virusinfektion selvittämisestä, akuutin gastroenteriitin ja sen aiheuttajavirusten esittelemisestä, virusten tunnistamis- ja eristämismenetelmistä sekä multiplex-PCR-menetelmän käyttö- ja toimintaperiaatteen kuvaamisesta. Lähdemateriaalina käytettiin tieteellisestä kirjallisuudesta ja lehtiartikkeleista saatua opinnäytetyön aihetta käsittelevää teoretistä tietoa ja aiempaa tutkimustietoa. Suurin osa lähteistä koostuu englanninkielisten artikkelien verkkojulkaisuista.

Opinnäytetyömme tulokset sopivat yksiin alkuolettamustemme kanssa: vertaamamme menetelmät eroavat toisistaan lähinnä käytettävyyden, eivät niinkään tulosten suhteen. Suurin osa eri menetelmillä saaduista tuloksista menee täysin yksiin, ja poikkeuksen muodostava RIDA@GENE Viral Stool Panel 1 -kittikin olisi todennäköisesti validoitu päätynyt samoihin tuloksiin enemmistön kanssa. Koimme kuitenkin, että erityisesti

muiden kuin noroviruksen kohdalla käsittelemämme näytemäärä oli vähäinen, ja että tutkimuksia olisi hyvä jatkaa suuremmalla näytemäärällä. On todettava myös, että mikäli Fimlab Laboratoriot Oy päätyy valitsemaan RIDA®GENE:n kitin rutiinidiagnostiikkaansa, se tulisi validoida ja koestaa uudelleen.

Haasteena opinnäytetyössämme koimme työtehtävien tasaisen jakamisen kolmen tekijän kesken erityisesti kirjallisessa osuudessa. Lisäksi ongelmaksi muodostui se, että heti koestusosuuden jälkeen ryhmämme hajaantui eri puolille Suomea ja Eurooppaa harjoittelujaksojen, töiden sekä ulkomaanvaihdon vuoksi. Opinnäytetyömme oli myös pitkään taka-alalla sairastapauksien johdosta. Näistä tekijöistä johtuen opinnäytetyömme valmistui myöhässä. Mainittava kuitenkin on, että opinnäytetyömme valmistui ennen arviointua valmistumisaikaamme.

Koimme, että saisimme hyödynnettyä kunkin työpanosta parhaiten jakamalla jokaiselle selkeät vastualueet. Jokaisen vastuuhenkilön tehtäviin kuului aihealueen rajaus, laadukkaiden lähteiden etsiminen sekä tekstin saattaminen hyväksyttävään ja ymmärrettävään muotoon. Käytimme kirjoituskanavana Google Docs-palvelua, johon kukin pystyi sijoittamaan osuutensa kaikkien nähtäväksi. Tällä tavoin kaikki tekijät pystyivät seuraamaan kirjoitusprosessin kulkua, tarkkailemaan sisältöä ja sen laadukkuutta sekä tekemään mahdollisia korjausehdotuksia. Tekstin sisällön rajaamisessa ja jaottelussa esiintyi välillä ongelmia, ja välillä kirjallisessa raportoinnissa esiintyi turhankin paljon toistoa. Kirjoitusprosessissa täytyi myös huomioida kunkin tekijän persoonallinen kirjoitustyyli, sillä tavoitteena oli saada aikaan yhtenäinen kokonaisuus.

Erityisesti koemme onnistuneemme juuri opinnäytetyön jäsenten keskinäisessä kommunikoinnissa. Huolimatta kunkin jäsenen kohtaamista henkilökohtaisista vastuksista sekä maantieteellisestä sijainnista olemme pystyneet pitämään yhteyttä toisiimme sekä keskustelemaan asioista ilman ulkopuolisten väliintulon tarvetta. Vaikka emme olekaan missään vaiheessa varsinaisesti päässeet yhdessä kirjoittamaan raporttiosuutta, opinnäytetyön kirjoitustyylin on myös pysynyt hyvin yhtenäisenä.

Pidämme opinnäytetyötämme onnistuneena, ja koemme saavuttaneemme käsittelemällemme aihealueelle sopivan syvyyden niin lähteiden käytön kuin varsinaisen raportoinninkin suhteen. Olemme onnistuneet myös pitämään opinnäytetyöraporttimme rakenteen mahdollisimman selkeänä ja luettavana. Koemme myös kehittyneemme suuresti

opinnäytetyötä tehdessämme. Pääsimme työmme yhteydessä tutustumaan tarkemmin käytössä oleviin molekyylibiologisiin menetelmiin sekä virologiaan. Saimme samalla myös käytännön kokemusta vertailevan tutkimuksen tekemisestä ja molekyylibiologian laboratoriossa työskentelystä.

11 LÄHTEET

- Aiyegbo, M. S., Eli, I. M., Spiller, B. W., Williams, D. R., Kim, R., Lee, D. E., Liu, T. Li, S., Stewart, P. L. & Crowe, J. E. 2013. Differential Accessibility of a Rotavirus VP6 Epitope in Trimers Comprising Type I, II, or III Channels as Revealed by Binding of a Human Rotavirus VP6-Specific Antibody. *Verkkójulkaisu artikkelista Journal of Virology* 88 (1), 469-476. Julkaistu 23.10.2013. Luettu 06.09.2016. <http://jvi.asm.org/content/88/1/469.full>
- Anttila, V-J., Nieminen, T. & Maunula, L. 2010. Norovirusten aiheuttamat gastroenteriitit laitosten ongelmana. *Verkkójulkaisu artikkelista Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 126 (13), 1575-1581. Luettu 03.09.2016. <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98916.pdf>
- Araud, E., DiCaprio, E., Yang, Z., Li, X., Lou, F., Hughes, J. H., Chen, H. & Li, J. 2015. High-Pressure Inactivation of Rotaviruses: Role of Treatment Temperature and Strain Diversity in Virus Inactivation. *Verkkójulkaisu artikkelista Applied and Environmental Microbiology* 81 (19), 6669–6678. Julkaistu 17.07.2015. Luettu 27.09.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4561716/>
- Bamford, D., Hyypiä, T. & Saksela, K. 2010. Virusten yleiset ominaisuudet, rakenne ja luokittelu. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 449-459.
- Binnicker, M. J. 2015. Multiplex Molecular Panels for Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation, and Cost-Effectiveness. *Verkkójulkaisu artikkelista Journal of Clinical Microbiology* 53 (12), 3723-3728. Julkaistu 26.08.2016. Luettu 06.09.2016. <http://jcm.asm.org/content/53/12/3723.full>
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. 2014. Human Astroviruses. *Verkkójulkaisu artikkelista Clinical Microbiology Reviews* 27 (4), 1048–1074. Julkaistu 01.10.2014. Luettu 22.08.2016. <http://cmr.asm.org/content/27/4/1048.full>
- Branton, P. 2011. Adenoviruses. Teoksessa Acheson, N. *Fundamentals of molecular virology*. 2. painos. Kanada: John Wiley & Sons, Inc., 274-284.
- Brown, T.A. & Brown, K. 2011. *Biomolecular Archaeology: An Introduction*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Buss, S. N., Leber, A., Chapin, K., Fey, P. D., Bankowski, M. J., Jones, M. K., Rogatcheva, M., Kanack, K. & Bourzac, K. M. 2015. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis. *Verkkójulkaisu artikkelista Journal of Clinical Microbiology* 53 (3), 915–925. Julkaistu 14.01.2015. Luettu 05.07.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4390666/>
- Cann, A. (toim.) 1999. *Virus Culture: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press. Luettu e-kirjana 09.08.2016. <http://web.a.ebscohost.com.elib.tamk.fi/ehost/detail/detail?sid=41eb4adb-7c8b-4e0a-a831->

[fef43d350b35%40sessionmgr4008&vid=0&hid=4114&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#AN=98442&db=nlebk](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215960/)

Carter, J. & Saunders, V. 2013. Virology. Principles and Applications. 2. painos. Espanja: Wiley.

Choi, S. J., Choi, Y. I., Kim, L., Park, I. S., Han, J. Y., Kim, J. M., & Chu, Y. C. 2014. Preparation of Compact Agarose Cell Blocks from the Residues of Liquid-Based Cytology Samples. Verkkojulkaisu artikkelista Korean Journal of Pathology, 48 (5), 351–360. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215960/>

Chow, C. M., Leung, A. K., & Hon, K. L. 2010. Acute gastroenteritis: from guidelines to real life. Verkkojulkaisu artikkelista Clinical and Experimental Gastroenterology 3, 97–112. Julkaistu 15.07.2010. Luettu 23.08.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108653/>

Collier, L., Kellam, P., Oxford, J. & Langdon, B. 2011. Human virology. 4. painos. Yhdysvallat: Oxford University Press Inc.

Cordey, S., Vu, D-L., Schibler, M., L’Huillier, A. G., Brito, F., Docquier, M., Posfay-Barbe, K. M., Petty, T. J., Turin, L., Zdobnov, E. M. & Kaiser, L. 2016. Astrovirus MLB2, a New Gastroenteric Virus Associated with Meningitis and Disseminated Infection. Verkkojulkaisu artikkelista Emerging Infectious Diseases 22 (5), 846–853. Julkaistu toukokuussa 2016. Luettu 22.08.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861523/>

Desselberger, U. 2014. Rotaviruses. Verkkojulkaisu artikkelista Virus Research 190, 75–96. Julkaistu 09.07.2014. Luettu 27.09.2016. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170214002640>

Eerola, E., Hytönen, J. & Kuittila, M. (toim.) 2012. Kliinisen mikrobiologian ja genetiikan tutkimukset 2012-2014. Porvoo: Bookwell Oy. https://apps.utu.fi/media/nakoislehdet/UTUlab/ohjekirja/utulab_opas_2012-2014.pdf

Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., & Klapper, P.E. 2000. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. Verkkojulkaisu artikkelista Clinical Microbiology Reviews 13 (4), 559–570. Julkaistu lokakuussa 2000. Luettu 16.10.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88949/>

Fast-Track Diagnostics. 2015. FTD Viral gastroenteritis-työmanuaali. Tulostettu versio 08.05.2015. Aineisto saatu sairaalamikrobiologi Jari Hirvoselta.

Fast-Track Diagnostics. 2016. Novel norovirus GII.P17-GII.17 genotype - suspected spread to Europe! Julkaistu 09.03.2016. Luettu 26.07.2016. <http://www.fast-trackdiagnostics.com/news-events/novel-norovirus-giip17-gii17-genotype-suspected-spread-to-europe!/>

Fimlab Laboratoriot Oy. 2013. Ohjekirja. Ulosteviljely 1 / Salmonellaviljely ulosteesta. Luettu 25.07.2016. http://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=193;setid=5787

Fimlab Laboratoriot Oy. 2015. Ohjekirja. Norovirus, nukleiinihappo (kval). Luettu 25.07.2016. http://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=6354

Ford, M. (toim.) 2010. Medical microbiology. 2. painos. Iso-Britannia: Oxford University Press.

Goldberg, S. D., Bacelar, M., Brazier, P., Bisnauthsing, K. & Edgeworth, J. D. 2014. A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalised patients. Verkkojulkaisu artikkelista Journal of Infection 70 (5), 504–511. Julkaistu 29.11.2014. Luettu 05.07.2016. [http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(14\)00353-3/fulltext](http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(14)00353-3/fulltext)

Hartwig, S., Uhari, M., Renko, M., Bertet, P., Hemming, M. & Vesikari, T. 2014. Hospital bed occupancy for rotavirus and all cause acute gastroenteritis in two Finnish hospitals before and after the implementation of the national rotavirus vaccination program with RotaTeq®. Julkaistu 11.12.2014. Luettu 16.07.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266892/>

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Porvoo: Bookwell Oy.

Hirvonen, J. 2015. Henkilökohtainen tiedoksianto.

Horelli-Kuitunen, N. & Orpana, A. 2016. Kromosomi- ja geenimuutosten laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 109-125.

Hukkanen, V., Saksela, K. & Hyöty, H. 2010. Virusinfektioiden patogeneesi. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 432-448.

Hultman, J. & Auvinen, P. 2010. Metagenomiikka avaa uusia ovia mikrobiologiassa. Verkkojulkaisu artikkelista Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 126 (11), 1278-1285. Luettu 17.10.2016. <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98836.pdf>

Huslab. 2015. Ulostenäyte virologisiin tutkimuksiin. Palvelutuotanto, työohje. Julkaistu 05.03.2015. Luettu 25.07.2016. http://huslab.fi/preanalytiikan_kasikirja/ulostenaytteet/ulostenayte_virologisiin_tutkimuksiin.pdf

Kananen, J. 2008. Kvantti. Kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisuja 89. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

Karhumäki, E., Jonsson, A. & Saros, M. 2016. Mikrobit hoitotyön haasteena. 4. uudistettu painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

Keusch, G. T., Fischer Walker, C., Das, J. K., Horton, S. & Habte, D. 2016. Diarrheal Diseases. Teoksessa Black, R. E., Laxminarayan, R., Temmerman, M. & Walker, N. 2016. Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health: Disease Control Priorities. 3. painos. Washington DC: The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. Julkaistu 05.08.2016. Luettu 12.09.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK361905/#part2.ch9.sec4>

La Rosa, G., Della Libera, S., Petricca, S., Iaconelli, M., Donia, D., Saccucci, P., Cenko, F., Xhelilaj, G. & Divizia, M. 2015. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013–2015. Verkkajulkaisu artikkelista Bio-Med Research International 2015, 142912. Julkaistu 03.08.2015. Luettu 08.08.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538309/>

Lappalainen, M., Vainionpää, R. & Hedman, K. 2011. Infektiosairaudet [Duodecim Oppiportti]. Julkaistu 01.01.2011. Luettu 05.07.2016. http://www.terveysportti.fi.elib.tamk.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=isa00401

Lappalainen, M. 2013. Multiplex-PCR ym. uudet monianalyyttimenetelmät - Laboratorion näkökulma. HUSLAB, Virologian ja immunologian osasto. Julkaistu 01.10.2013. Luettu 16.10.2016. <http://www.thl.fi/attachments/Shp-SIRO-FiRe/8.%20Maija%20Lappalainen%20SIRO-FiRe%202013%20LYH.pdf>

Lecatsas, G. 2011. Virus electron microscopy: Festschrift. Verkkajulkaisu artikkelista Southern African Journal of Infectious Diseases 26 (4), 182-183. Luettu 09.08.2016. <http://www.sajei.co.za/index.php/SAJEI/article/view/348/500>

Lehmann, M. & Schmitz, R. P .H. 2015. Nucleic Acid Amplification Techniques. Teoksessa Popp, J. & Bauer, M. Modern Techniques for Pathogen Detection. Saksa: Wiley-Blackwell. VCH Verlag GmbH & Co., 55-102. Luettu 05.09.2016. <http://site.ebrary.com.elib.tamk.fi/lib/tamperepoly/reader.action?docID=11025877&ppg=41>

Lion, T. 2014. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. Verkkajulkaisu artikkelista Clinical Microbiology Reviews 27 (3), 441–462. Julkaistu 01.07.2016. Luettu 08.08.2016. <http://cmr.asm.org/content/27/3/441.full>

Loginov, R., Mannonen, L. & Lappalainen, M. 2016. Ripulivirusten pikadiagnostiikka. Verkkajulkaisu artikkelista Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 132 (7), 648-53. Luettu 18.07.2016 <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo13066.pdf>

Lounamo, K., Tuuminen, T. & Kotilainen, H. 2014. Infektioiden tarttuvuustekijät. Verkkajulkaisu artikkelista Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 130 (8), 793-799. Luettu 25.06.2016. <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo11602.pdf>

Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., Zheng, H., Tan, X., Lin, H., Rutherford, S., Guo, L., Ke, C. & Hui, L. 2015. Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. Verkkajulkaisu artikkelista Emerging Infectious Diseases 21 (7), 1240-1242. Julkaistu heinäkuussa 2015. Tulostettu 26.07.2016. <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/7/pdfs/15-0226.pdf>

Lumio, J. 2014. Infektioiden tartunta, taudin synty ja leviäminen. Lääkärikirja Duodecim [Terveyskirjasto]. Julkaistu 20.11.2014. Luettu 07.07.2016. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00569

Lääkeinfo.fi. 2016. ROTATEQ oraaliliuos. Lääketietokeskus. Luettu 17.07.2016. http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=6106&i=SANOFI+PASTEUR+MSD_ROTATEQ

Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. (toim.) 2012. Mikrobin aiheuttamat ripulitaudit. Verkkojulkaisu artikkelista Lääkäriin käsikirja 28 (4), 365-368. Julkaistu 23.01.2012. Luettu 13.05.2015. <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo10102.pdf>

Makarewicz, O., Stein, C., Pfister, W., Löffler, B. & Pletz, M. 2015. Identification Methods - An Overview. Teoksessa Popp, J. & Bauer, M. Modern Techniques for Pathogen Detection. Saksa: Wiley-Blackwell. VCH Verlag GmbH & Co., 19-50. Luettu 05.09.2016.

<http://site.ebrary.com.elib.tamk.fi/lib/tamperepoly/reader.action?docID=11025877&ppg=41>

Matikainen, A.-M., Miettinen, M. & Wasström, K. 2010. Näytteenottajan käsikirja. Helsinki: Edita Prima Oy.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P. P.C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U. & Van Ranst, M. 2011. Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Verkkojulkaisu artikkelista Archives of Virology 156 (8), 1397–1413. Julkaistu 20.05.2011. Luettu 27.09.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398998/>

Mattila, L. & Järvinen, A. 2011. Virusripulit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. [Duodecim Oppiportti]. Julkaistu 01.01.2011. Luettu 18.06.2016.

<http://www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi/op/isa03505/do>

Mori, K., Nagano, M., Kimoto, K., Somura, Y., Akiba, T., Hayashi, Y., Sadamasu, K. & Kai, A. 2016. Detection of Enteric Viruses in Fecal Specimens from Nonbacterial Foodborne Gastroenteritis Outbreaks in Tokyo, Japan between 1966 and 1983. Japanese Journal of Infectious Diseases. Julkaistu 30.06.2016. Tulostettu 18.07.2016. https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2015.456/pdf

Moyo, S. J., Hanevik, K., Blomberg, B., Kommedal, O., Nordbø, S. A., Maselle, S., & Langeland, N. 2014. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. Verkkojulkaisu artikkelista BMC Infectious Diseases 14, 666. Julkaistu 12.12.2014. Luettu 08.08.2016. <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-014-0666-1>

Nummenmaa, L. 2009. Käyttäytymistieteiden tilastolliset menetelmät. 1. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Oka, T., Wang, Q., Katayama, K. & Saif, L. J. 2015. Comprehensive review of human sapoviruses. Verkkojulkaisu artikkelista Clinical Microbiology Reviews 28 (1), 32–53. Julkaistu 01.01.2015. Luettu 20.08.2016. <http://cmr.asm.org/content/28/1/32.full>

Pöntinen, S. 2004. Vertailtavuus ja mittaamisen ongelma. Teoksessa Alapuro, R. & Arminen, I. (toim.) Vertailevan tutkimuksen ulottuvuuksia. 1. Painos. Vantaa: WSOY, 41-52.

- R-Biopharm. 2014. RIDA®GENE Viral Stool Panel 1 -työmanuaali. Julkaistu 28.03.2014. Tulostettu 08.05.2015.
http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/24019/PG1315_RIDAGENE_VSPI_ENG_14_03_28_V1.pdf
- Roche Molecular Diagnostics. 2016. What is PCR? Päivitetty 30.06.2016. Luettu 27.09.2016.
<https://molecular.roche.com/innovation/pcr/what-is-pcr/>
- Seegene Inc. n.d.a. Allplex™ Gastrointestinal Full Panel Assay. Luettu 26.07.2016
http://www.seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/allplex_GI_fp.php
- Seegene Inc. n.d.b. MuDT™ Technology. One Channel, Multi-C, in Real-time PCR. Luettu 06.08.2016. http://www.seegene.com/neo/en/introduction/core_muDT.php
- Sidoti, F., Rittà, M., Costa, C. & Cavallo, R. 2015. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. Verkkojulkaisu artikkelista The Journal of Infection in Developing Countries 9 (6), 551-561. Julkaistu 09.07.2015. Tulostettu 26.07.2016. <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/26142663/1313>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. Verkkojulkaisu artikkelista Methods in Ecology and Evolution 3 (5), 898–905. Julkaistu lokakuussa 2012. Luettu 16.10.2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573865/>
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2015a. Rokottaminen. Rotavirusrokote. Päivitetty: 24.08.2015. Luettu 17.07.2016.
<https://www.thl.fi/fi/web/rokottaminen/rokotteet/rotavirusrokote>
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2015b. Rotavirus. Päivitetty: 18.09.2015. Luettu 19.09.2016. <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-jamikrobit/virustaudit/rotavirus>
- Terveyskirjasto. 2009. Suolistotulehdukset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Julkaistu 22.01.2009. Luettu 10.10.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skl00020
- Terveyskirjasto 2014. Clostridium difficile -bakteerin aiheuttama ripuli (antibioottiripuli). Lääkärikirja Duodecim. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Julkaistu 29.11.2014. Luettu 17.10.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00806
- Terveyskirjasto. 2015. Tuberkuloosi. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Julkaistu 11.08.2015. Luettu 03.10.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00611
- Terveyskirjasto. 2016a. Lääketieteen sanasto. Fekaalinen. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Luettu 07.09.2016.

http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00830&p_teos=ltt&p_osio=&p_selaus=

Terveyskirjasto. 2016b. Lääketieteen sanasto. Kolonisaatio. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Luettu 17.10.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01696

Terveyskirjasto. 2016c. Lääketieteen sanasto. Oraalinen. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Luettu 07.09.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02425&p_teos=ltt&p_osio=&p_selaus=

Terveyskirjasto. 2016d. Lääketieteen sanasto. Patogeneesi. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Luettu 11.10.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02521

Terveyskirjasto. 2016e. Lääketieteen sanasto. Punatauti. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Luettu 12.09.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02810

Thatcher, S.A. 2014. DNA/RNA Preparation for Molecular Detection. Verkkojulkaisu artikkelista Clinical Chemistry Jan 2015 61 (1), 89-99. Julkaistu joulukuussa 2014. Luettu 16.10.2016. <http://clinchem.aaccjnls.org/content/61/1/89.long>

U.S. Department of Health and Human Services. 2012. Principles of Epidemiology in Public Health Practice. An Introduction to Applied Epidemiology and Biostatistics. Lesson 3: Measures of Risk 3. painos. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) & Office of Workforce and Career Development. Julkaistu 18.05.2012. Luettu 19.08.2016. <http://www.cdc.gov/opphss/csels/dsepd/ss1978/ss1978.pdf>

Valli, R. 2015. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. 2. uudistettu painos. Juva: Bookwell Oy.

Vesikari, T. 2013. Virusrokotteet kansallisessa rokotusohjelmassa - lähitulevaisuuden näkymät. Verkkojulkaisu artikkelista Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 129 (22), 2427-2433.
http://rokotetutkimus.fi/index/Virusrokotteet%20kansallisessa%20rokotusohjelmassa%20-%20lahitulevaisuuden%20nakymat_Veiskari_marras2013.pdf

Vilkka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Helsinki: Tammi. Luettu 13.09.2016.
<http://hanna.vilkka.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>

Vinje, J. 2014. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. Verkkojulkaisu artikkelista Journal of Clinical Microbiology 2/2015 53 (2), 373-381. Julkaistu 02.07.2014. Luettu 05.07.2016.
<http://www-ncbi-nlm-nih-gov.elib.tamk.fi/pmc/articles/PMC4298492/>

VSSHP. 2016. Ohjepankki: Tietoa tutkimuksista - ulostenäyte kuivaan purkkiin. Julkaistu 26.04.2016. Luettu 25.07.2016. <http://ohjepankki.vsshp.fi/fi/2972/40132>

Vuento, M. 2016. Virukset. Näkymättömät viholliset. Helsinki: Gaudeamus Oy.

World Health Organization. 2013. Diarrhoeal disease. Julkaistu elokuussa 2015. Luettu 06.09.2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

World Health Organization. 2016a. Diarrhoea. Luettu 23.08.2016. <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>

World Health Organization. 2016b. Immunization, Vaccines and Biologicals. Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2013, 215 000. Luettu 06.09.2016. http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/

World Health Organization. 2016c. Rotavirus Infections. Luettu 19.09.2016. http://www.who.int/topics/rotavirus_infections/en/

Yoneda, M., Nakano, M., Sugimoto, D., Inada, M., Fujitani, M. & Kitahori, Y. 2016. Epidemiological Characteristics of Sapovirus and Human Astrovirus Detected among Children in the Nara Prefecture, Japan, during 2009/2010–2014/2015 Seasons. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. Julkaistu 18.03.2016. Luettu 22.08.2016. <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub/JJID.2015.529/pdf>

York, R. L., Yousefi, P. A., Bogdanoff, W., Haile, S., Tripathi, S., & DuBois, R. M. 2016. Structural, Mechanistic, and Antigenic Characterization of the Human Astrovirus Capsid. *Verkköjulkaisu artikkelista Journal of Virology* 90 (5), 2254–2263. Julkaistu 11.02.2016. Luettu 22.08.2016. <http://jvi.asm.org/content/90/5/2254.full>

Näyttenumero	Seegene Allplex Gastropanel					FastTrackDiagnostics Gastrovirus					Ridagene Viral Stool Panel I			Positiivisia tuloksia	
	Noro	Rota	Adeno	Astro	Sapo	Noro	Rota	Adeno	Astro	Sapo	Noro	Rota	Adeno		Astro
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	1
39	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
44	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
46	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
47	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	5
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
49	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	3
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
51	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	3
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
54	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
55	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	4
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
57	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
59	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
62	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3

