



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Nika Divonina

## Circoviruksen osoittaminen immuno- histokemiallisella menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

7.11.2019

Tekijä(t) Otsikko	Nika Divonina Circoviruksen osoittaminen immunohistokemiallisella menetelmällä
Sivumäärä Aika	32 sivua + 2 liitettä 7.11.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	-
Ohjaajat	Erikoistutkija Gabriele Vidgren Laboratorionsinööri Riitta Villanen Tutkintovastaava, lehtori Jarmo Palm
<p>Suomessa ensimmäinen PMWS- postweaning myltisystemic wasting syndrome oireyhtymä havaittiin talvella vuonna 2007. Tämän sairauden ensisijainen aiheuttaja on Circovirus. On olemassa kaksi Circovirus-tyyppiä: PCV1 (Porcine circovirus type 1) ja PCV2 (Porcine circovirus type 2). PCV1 ei ole patogeeninen. Yleensä virus tarttuu vain 6–14 viikkoisiin porsaisiin ja 70–80 prosentissa se on tappava. Kuolema tapahtuu äkillisesti.</p> <p>Yleisimmät tavat PCV2-viruksen osoittamiseksi kudospäätteistä ovat PCR- menetelmä ja immunohistokemiallinen värjäys. Jättisolut, makrofagit ja imukudossolukon harventumat ovat diagnoosin keskeiset muutoskohdat.</p> <p>Koska kyseinen oireyhtymä saattaa olla tappava sioille ja sitä on todettu esiintyvän Suomessa, niin on tärkeää kehittää värjäysmenetelmä, jotta viruksen läsnäolo voidaan varmemmin todentaa ja näin saada tieto kasvattajille nopeasti.</p> <p>Tässä opinnäytetyössä testattiin uudet värjäyskomponentit ja vasta-aineet sekä verrattiin inkubaatioaikoja ja eri vasta-ainelaimennoksia. Projektissa käytettiin positiivista ja negatiivista kontrollia tuloksen varmistamiseksi.</p> <p>Työ suoritettiin Ruokaviraston tuotanto- ja seuraeläinpatologian laboratoriossa, erikoistutkija Gabriele Vidgrenin ja laboratorionsinööri Riitta Villasen ohjauksessa.</p> <p>Tuloksissa selvisi, että punainen kromogeeni AEC erottuu mikroskopoidessa ruskeasta DAB:ista paremmin. Uuden vasta-aineen ostamisen sijasta voidaan käyttää ns. Seinäjoen vasta-ainetta (tässä työssä vasta-aine B). Laimennos 1:200 on luotettavampi ja edullisempi kuin muut laimennokset, mutta tavoitteena on kuitenkin saada värjäys toimimaan yhden päivän aikana. Myöhemmin tarkasteltavaksi jäi laimennos 1:75.</p> <p>Saavutetulla lopputuloksella voidaan kehitystyötä jatkaa edelleen ja saada värjäysohjetta optimoitua.</p>	
Avainsanat	PMWS, PCV1, PCV2, Circovirus

Author(s) Title	Nika Divonina Detection of Circovirus by immunohistochemistry method
Number of Pages Date	32 pages + 2 appendices 7 November 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	-
Instructor(s)	Gabriele Vidgren, Senior Research Scientist Riitta Villanen, Laboratory Engineer Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>The first PMWS postweaning multisystemic wasting syndrome in Finland was detected in winter 2007. The primary cause of this disease is Circovirus. There are two types of <i>Circovirus</i>: PCV1 (Porcine circovirus type 1) and PCV2 (Porcine circovirus type 2). PCV1 is not pathogenic. Generally the virus infects only 6-14 weeks old piglets and in 70-80% cases suddenly.</p> <p>One of the most common methods of detecting PCV2 viruses in tissue samples is immunohistochemically staining. The most typical anatomical changes of PMWS syndrome require examination of dead pig. The fundamental findings in this diagnosis are: giant cells, macrophages and thinned out lymphocyte. The changes and results are examined with microscope.</p> <p>This syndrome occurs also in Finland. It can be fatal for pigs, that's why it is important to develop a staining method for detection virus thus pigs' owners could get information quicker. The aim of this project was to test old and new antibodies. It was important to compare incubation times, concentrations and temperature conditions.</p> <p>The project was performed in the production and companion animal pathology laboratory of the Finnish Food Authority under supervision of senior researcher Gabriele Vidgren and laboratory engineer Riitta Villanen.</p> <p>The study revealed that the red chromogen AEC is better than the brown DAB in microscopy. Instead of buying a new antibody it's more suitable to use antibody B. A 1:200 dilution is more reliable and less expensive than other dilutions, but the goal is to make the method working within one day. A 1:75 dilution stays for later examination.</p> <p>Based on the results of the experimental part of this research, laboratory assistants of the Finnish Food Authority will continue of developing the staining method.</p>	
Keywords	PMWS, PCV1, PCV2, Circovirus

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Immunohistokemia	2
2.1	Antigeeni	2
2.2	Epitoppi	2
2.3	Vasta-aine	2
2.3.1	Vasta-aine immunohistokemiassa	4
2.3.2	Polyklonaalisuus ja monoklonaalisuus	4
2.4	Suora ja epäsuora menetelmä	6
2.5	Proteinaasi	7
2.5.1	Proteinaasi K	7
2.5.2	Proteinaasi E	7
2.6	Immunoentsyymimenetelmät	7
2.6.1	Piparjuuriperoksidaasi	7
2.6.2	Kromogeeni AEC	8
2.6.3	Kromogeeni DAB	8
3	Histologisen näytteen käsittely	9
3.1	Kudoskäsittelyautomaatti	9
3.1.1	Fiksaatio	9
3.1.2	Dehydraatio	10
3.1.3	Kirkastus ja parafiinin imeyttäminen	10
3.2	Valaminen parafiiniin	10
3.3	Kudosblokkien leikkaaminen ja värjääminen	11
3.3.1	Mikrotomit ja leikkaaminen	11
3.3.2	Hyvän leikkeen kriteerit	12
3.3.3	Hematoksyliini-eosiini-värjäys	12
3.4	Peittäminen ja tarkastelu	13
3.5	Virhelähteet	13
3.6	Värjäysten kontrollointi	14
3.7	Värjäysten tulkinta	14
4	Circovirus-infektiot sialla	15
4.1	Oireet ja viruksen leviäminen	15
4.2	Patologinen tarkastus	16
5	Prosessi ja toteutus	18

5.1	Positiivisen kontrollin testaus	18
5.2	Koe 1	23
5.3	Koe 2	23
5.4	Koe 3	23
5.5	Koe 4	24
5.6	Koe 5 ja 6	25
5.7	Koe 7	25
5.8	Taustavärjäytyminen	26
6	Pohdinta ja yhteenveto	27
	Lähteet	30
	Liitteet	
	Liite 1. AEC-ohje	
	Liite 2. DAB-ohje	

## Lyhenteet

AEC	(3-amino-9-ethylcarbazole) 3-Amino-9-etyylikarbatsoli
BSA	(Bovine serum albumin) Bovine serum albumini
DAB	(3,3'-diaminobenzidine) 3,3'-Diaminobentsidiini
DNA	(Deoxyribonucleic acid) Nukleinihappo
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
HE	Hematoksyliini-eosiini
HRP	(Horseradish peroxidase) Piparjuuriperoksidaasi
Ig	Immunoglobuliini
o/n	(Overnight) Yön yli
PCV1	(Porcine Circovirus type 1) Sian sirkovirus tyyppi 1
PCV2	(Porcine Circovirus type 2) Sian sirkovirus tyyppi 2
PMWS	(Postweaning multisystemic wasting syndrome) Oireyhtymä, jonka oireaina nääntyminen, laihtuminen ja kasvun hidastuminen
RT	(Room Temperature) Huonelämpötila
Tris	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Ruokavirastossa. Ruokavirasto on iso valtion organisaatio, joka varmistaa sekä tutkii elintarviketurvallisuuksia, eläinten terveyttä ja hyvinvointia. Ruokavirasto koostuu valvonta- ja laboratorio-osastoista. Laboratorio-osastossa sijaitsee eläintautibakteriologian ja patologian yksikkö. Tuotanto- ja seuraeläinten patologian jaostossa tehdään tutkimuksia, joilla selvitetään tuotanto- ja seuraeläinten sairauksia tai kuolinsyitä, kuten mm. onko eläimellä jokin tietty virus, onko virus haitallinen ihmisille tai minkä takia eläin kuoli.

Immunohistokemialliset värjäykset ovat kehittyneet hyvin tärkeiksi työkaluiksi etenkin patologian alalla. Leimatun vasta-aineen avulla voidaan selvittää tietyn antigeenin tai proteiinin esiintyminen kudoksessa. Immunohistokemialliset värjäykset pohjautuvat vuorovaikutukseen vasta-aineen ja antigeenin välillä. Suorassa värjäysmenetelmässä vasta-aineeseen on konjugoitu väriaine, jota voidaan tarkastella mikroskooppisesti. Epäsuorassa värjäysmenetelmässä käytetään primaari- ja sekundaarivasta-aineita. Visualisointi tapahtuu merkkiaineen tai entsyymien avulla valo- tai elektronimikroskooppilla.

Tutkimuksen tarkoituksena oli testata uutta kaupallista kittiä, jota käytetään vasta-ainemolekyylien sitoutumiskohtien osoittamiseksi. Myös aiemmin käytettyä vasta-ainetta ei ole enää saatavilla, joten tehtävänä oli myös selvittää, toimii uusi kaupallinen Circoviruksen vasta-aine uudella kitillä sekä vertailla kromogeenejä AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) ja DAB (3,3'-diaminobenzidini) ja verrata kahta proteaasientsyymiä K ja E.

Opinnäytetyötä edeltävällä harjoittelujaksolla aikana päästiin harjoittelemaan immunohistokemiallisia värjäyksiä vanhalla kitillä, jotta saatiin parempi käsitys siitä, miten värjäys toimii ja mihin jokaista työvaihetta tarvitaan. Työn tavoitteena oli käyttää olemassa olevia työohjeita ja saada mainitut komponentit toimimaan ilman työohjeen muuttamista. Värjäys vasta-aineella tehdään yli-yön inkubaatiolla, lisätavoitteena oli saada koko menetelmä suoritettua yhden päivän aikana.

## 2 Immunohistokemia

Immunohistokemian avulla voidaan määrittää antigeenin sijainti kudossoluissa ja kudorakenteissa spesifisellä vasta-aineella. Termi ”immunohistokemia” koostuu kahdesta sanasta: ”immuno” viittaa vasta-aineiden käyttöön tässä menetelmässä ja ”histo” merkitsee kudosta. [1.] Immunohistokemia on arvokas tutkimusmenetelmä, jolla voidaan täydentää morfologisia tietoja. Se tarjoaa tärkeän diagnostisen tiedon sairaudesta ja sairauden biologiasta. Immunohistokemia tuo paljon hyötyä sellaisissa tapauksissa, joissa pelkästään kliinisillä ja morfologisilla tiedoilla ei pystytä tekemään tarkkaa diagnoosia sairaudesta. On olemassa useita eri tapoja visualisoida vasta-aine-antigeeni vuorovaikutus valo-, elektroni- tai fluoresenssimikroskoopilla. Vasta-aine-antigeenikompleksin muodostuminen havaitaan leiman avulla, joka voi olla entsyymi, esimerkiksi biotiini tai fluorokromi. [2, s. 35.]

### 2.1 Antigeeni

Antigeeni (engl. antigen) on molekyyli, joka aiheuttaa elimistössä vasta-aineiden muodostumista ja johon tietty vasta-aine kykenee sitoutumaan, eli se aiheuttaa immuunivasteen, kun se joutuu ihmisen tai eläimen elimistöön. Antigeenit ovat yleensä proteiineja tai polysakkarideja, mutta usein lipidit, nukleiinihapot ja muut aineet pystyvät myös toimimaan antigeeninä.

Antigeneilla on iso molekyylipaino. Mitä suurempi molekyylipaino on, sitä enemmän on epitooppeja, mikä johtaa immuunivasteen voimakkuuden lisääntymiseen. [3.]

### 2.2 Epitooppi

Epitooppi (engl. epitope) eli antigeeninen determinantti on osa antigeenin makromolekyylistä, jonka immuunijärjestelmä tunnistaa (mm. vasta-aineet, B-lymfosyytit ja T-lymfosyytit) ja johon se sitoutuu. Epitoopit stimuloivat vasta-aineiden tuotantoa. Yhdessä antigeenin molekyylissä voi olla useita epitooppeja. [4, s. 32.]

### 2.3 Vasta-aine

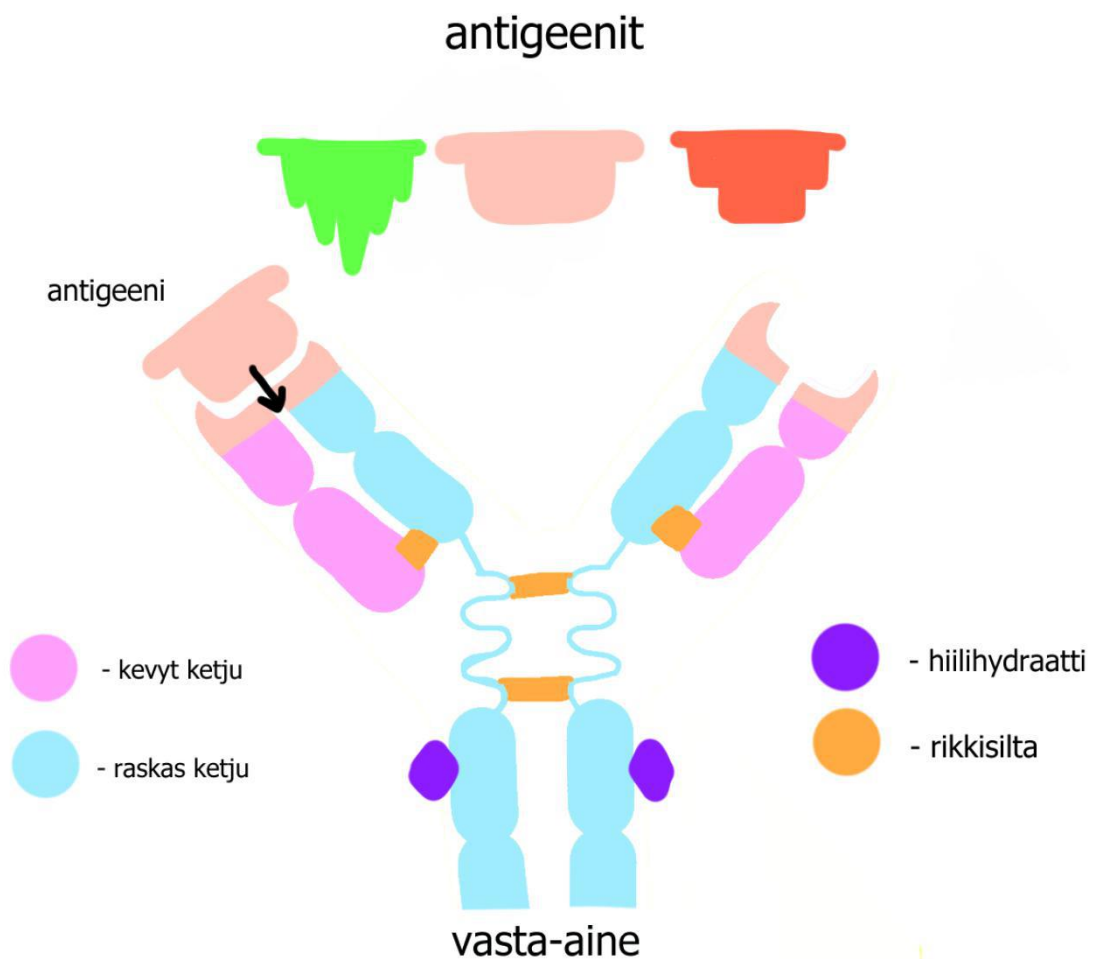
Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) ovat Y:n muotoisia glykoproteiineja, jotka kuuluvat immuunijärjestelmään [5]. Nämä proteiinit koostuvat neljästä polypeptidiketjusta, eli kahdesta kevyetketjusta (L-ketjuja) ja kahdesta raskasketjusta (H-ketjuja), jotka ovat



kiinnittyneet rikkisilloilla. Vasta-aineet sitoutuvat antigeeniin paratoopin avulla. [6.] Vasta-aineen rakenne on esitetty kuvassa 1.

Immunoglobuliinit jaetaan viiteen isotyyppeihin: IgG, IgE, IgD, IgM, IgA. Jako perustuu niiden raskasketjujen välisiin eroihin. Kaikkein yleisin veriseerumin vasta-aineluokka on IgG ja tämän takia se on käytetyin vasta-aineluokka immunohistokemialisissa värjäyksissä.

Jokainen elimistään saapuva bakteeri- tai virusinfektio kannustaa spesifisten vasta-aineiden tuotantoa antigeenien tuhoamiseksi tai inaktivoimiseksi. Elimistö tuottaa miljoonia vasta-aineita joka päivä. [5.]



Kuva 1. Vasta-aineen rakenne [7]. Vasta-aine kiinnittyy vain tietyn antigeeniin.

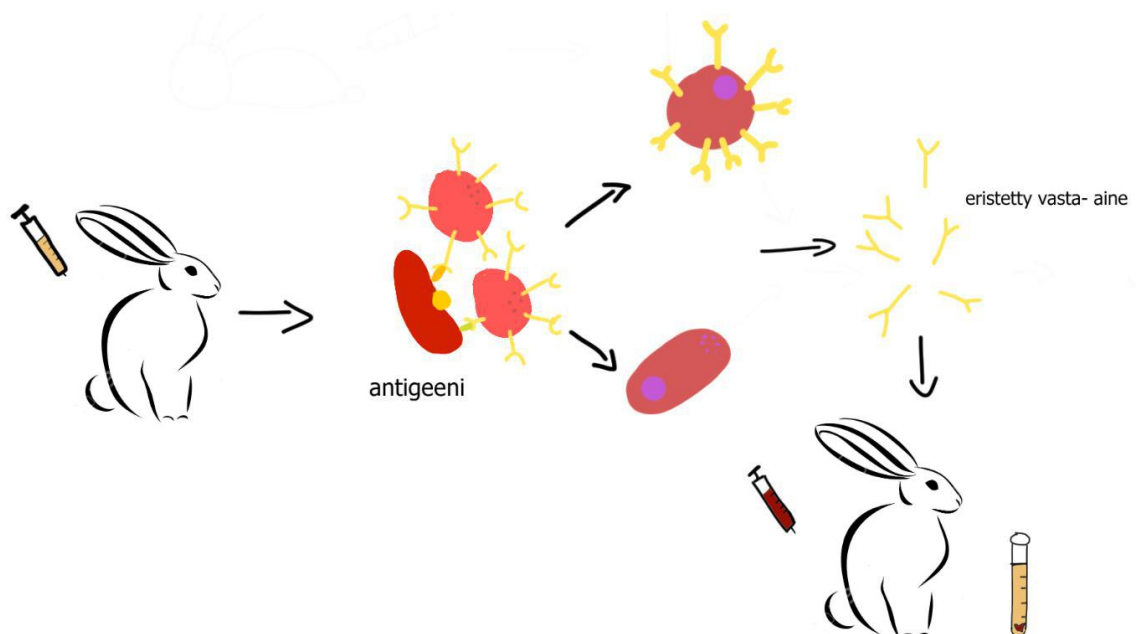
### 2.3.1 Vasta-aine immunohistokemiassa

Primaarivasta-aine on antigeenispesifinen vasta-aine. Se tunnistaa sekundaarivasta-aineen, johon merkkiaine eli leima on lisätty. Sekundaarivasta-aine yhdistyy primaarivasta-aineeseen, sen takia sen pitää olla kehitetty sen eläimen immunoglobuliinia vastaan, jossa primaarivasta-aine on valmistettu. [8, s. 435–436.]

### 2.3.2 Polyklonaalisuus ja monoklonaalisuus

Riippuen kyvystä reagoida yhden tai useamman antigeeniepitoopin kanssa vasta-aineet jaetaan monoklonaalisiin ja polyklonaalisiin.

Polyklonaalinen vasta-aine on heterogeeninen vasta-aineseos, joka on suunnattu tunnistamaan erilaisia epitooppeja samassa antigeenissa. Niitä tuotetaan immunisoimalla eläin spesifisellä immunogeenillä. Immunisointivaihe kestää noin 3-8 kuukautta, sen jälkeen eläin lopetetaan ja verestä eristetään immunoglobuliinirikas seerumi. Solut erotetaan verestä sentrifugoinnin avulla ja puhdistetaan ammoniumsulfaattisaostuksella tai ioninvaihtokromatografiolla. Polyklonaalisen vasta-aineen tuotto on esitetty kuvassa 2.

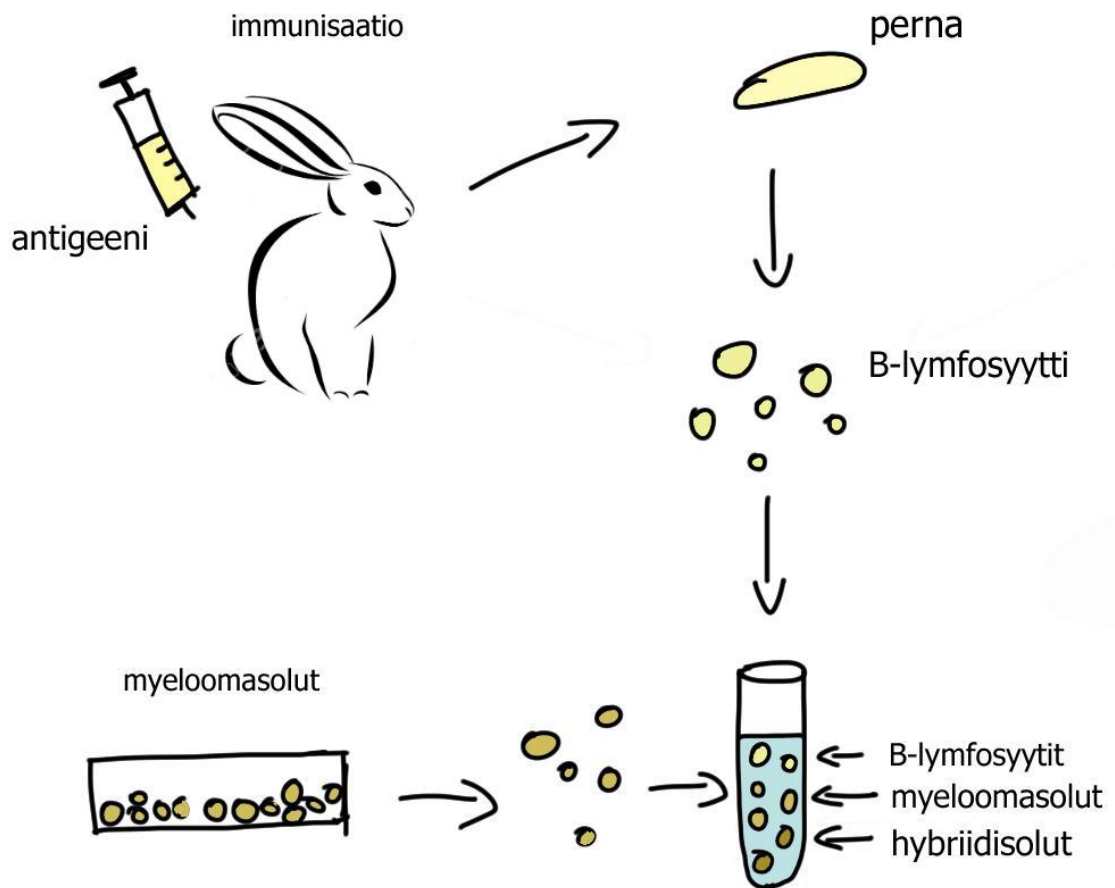


Kuva 2. Polyklonaalisen vasta-aineen tuotto [9].

Monoklonaalinen vasta-aine on homogeeninen vasta-aine, joka toimii vain antigeenin tietyn epitooppirakenteen kanssa. Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistuksessa

yhdistetään plasmatasoluja ja neoplastista myeloomasoluja. Eläin immunisoidaan kohdeantigeenillä, jonka jälkeen tapahtuu immunisaatiojakso, joka kestää 2-3 kuukautta. Kun haluttu immunivaste on saatu, eläin lopetetaan ja sen pernasta eristetään B-lymfosyytteja. B-lymfosyyttien ja kuolemattomien solujen avulla saadaan tuotettua haluttua vasta-ainetta. Monoklonaaliset vasta-aineet puhdistetaan kromatografimenetelmällä. [2, s. 3–4.] Kuvassa 3 on esitetty monoklonaalisen vasta-aineen tuottoprosessi.

Yleisesti ottaen monoklonaalisilla vasta-aineilla värjätyt valmisteet ovat spesifisempiä kuin polyklonaalisilla. Huono puoli on se, että antigeenin epitopin täytyy olla ainutlaatuinen. Toinen huono puoli on värjäystuloksen heikkous, koska se sitoutuu vain yhteen antigeenin epitoopeista. [8, s. 435–436.]



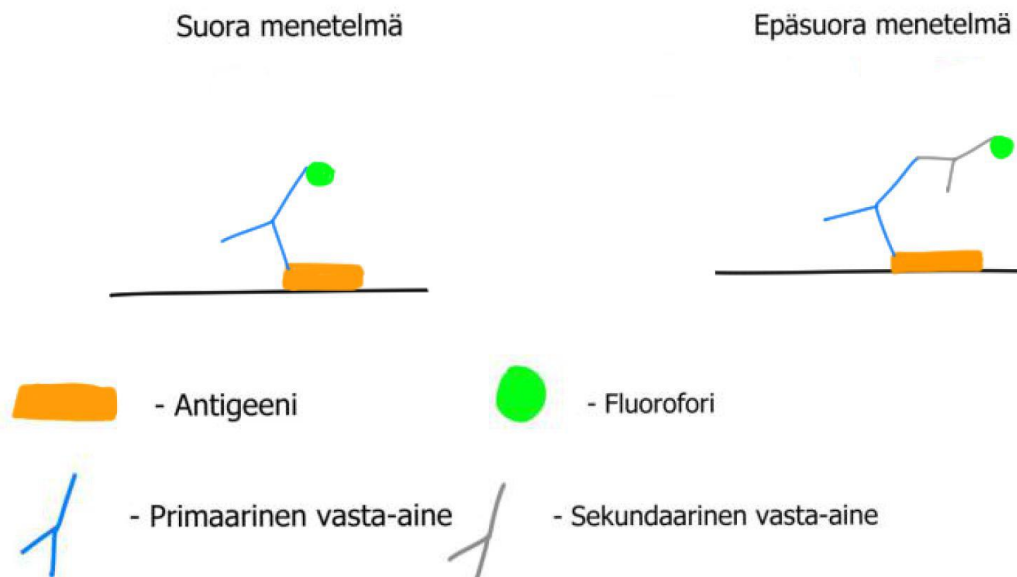
Kuva 3. Monoklonaalisen vasta-aineen tuotto [9].

## 2.4 Suora ja epäsuora menetelmä

Antigeenin määrittämiseen voidaan käyttää suoraa tai epäsuoraa immunohistokemiallista menetelmää. Kuvassa 4 on esitetty niiden ero.

Suora menetelmä sisältää leimattujen primaarivasta-aineiden suoran reaktion kudosan-tigeenin kanssa [1]. Tämä on nopea ja helppo menetelmä, mutta värjäysherkyys ei ole yhtä vahva kuin epäsuorassa menetelmässä. Suora värjäysmenetelmä tunnistaa tietyt antigeenin epitootit mutta näitä sitoutumispaikkoja on vähemmän. Reaktio epäsuoras-sa menetelmässä on vahvempi. Suora värjäys toimii erittäin hyvin jääleikkeiden immu-nofluorisenssitutkimuksissa. [8, s. 438–439.]

Epäsuora menetelmä pohjautuu siihen, että useita vasta-ainemolekyyliä voi sitoutua primaarivasta-aineiden eri epitoppeihin [1]. Silloin ensimmäisessä vaiheessa kudos-leike inkuboidaan primaarivasta-aineessa. Sekundaarivasta-aine, johon on liitetty ent-syymi, lisätään toisessa vaiheessa. Viimeisessä vaiheessa substraattisäyksen jälkeen entsyymireaktion lopputuote osoittaa antigeenin. Epäsuorassa menetelmässä sama sekundaarivasta-aine voi osoittaa useita primaarivasta-aineita. [8, s. 438–439.]



Kuva 4. Suora ja epäsuora menetelmä [10].

## 2.5 Proteaasit

Proteinaasit (tai proteaasit) ovat entsyymejä, jota käytetään proteiinien pilkkomiseen. Se hydrolysoi peptidisidoksia aminohappojen välillä. [11.]

### 2.5.1 Proteinaasi K

Proteinaasi K on hyvin tyypillinen ja laajakäyttöalueellinen entsyymi, joka kuuluu peptidaasiryhmään. Proteinaasi K:ta eristetään sienistä *Engyodontium album*. [12.] Se hydrolysoi erilaisia peptidisidoksia. Usein sitä käytetään entsyymaattisten tai solulysaattisten reaktioiden puhdistamiseen tai kontaminaation poistamiseen. [13.] Immunohistokemiassa se vaikuttaa antigeenisitoutumiskohtiin vasta-aineiden leimaamiseksi. Proteinaasi K toimii monissa lämpötiloissa ja puskureissa, optimaalinen aktiivisuus tapahtuu lämpötilassa 20–60°C ja pH:ssa 7,5–12,0. [14.]

### 2.5.2 Proteinaasi E

Proteinaasi E:tä eristetään bakteerista *Streptomyces friseus*. Tämä entsyymi on erittäin kätevä liukenemattomien proteiinien proteolyysissa sekä proteiinien rakenteen tutkimisessa. Se suosii hydrolysoimaan peptidisidoksia glutamiinihapon tai asparagiinihapon karboksyylipuolella. Immunohistokemiassa se vaikuttaa antigeenisitoutumiskohtiin vasta-aineiden leimaamiseksi. Proteinaasi E:n optimaalinen aktiivisuus tapahtuu pH alueella 5,0–8,8. Lämpötilan on oltava 20–60°C välillä. [11.]

## 2.6 Immunoentsyymimenetelmät

Erilaisten leimojen avulla voidaan osoittaa soluista tai kudoksista vasta-aine, joka on sitoutunut tiettyyn antigeeniin. Yleensä leimaamiseen käytetään fluorokromeja tai entsyymejä. Silloin, kun halutaan osoittaa vasta-ainemolekyylien sitoutumiskohdat, kudosten leikkeestä käytetään entsyymisubstraatti-väriainereaktiota, eli kromogeenia. Tällainen värillinen sakka tulee näkyviin tavallisella valomikroskoopilla. [8, s. 435–436.]

### 2.6.1 Piparjuuriperoksidaasi

Piparjuuriperoksidaasi (eli HRP) on yleisin entsyymi, jota käytetään immunohistokemiassa. Värjäyksen ensimmäisessä vaiheessa HRP hajottaa vetyperoksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vedeksi ja happiatomiksi. Toisessa vaiheessa DAB-kromogeeni hapettuu värilliseksi lopputuotteeksi, jota voidaan tarkastella mikroskooppisesti. [8, s. 482.]

### 2.6.2 Kromogeeni AEC

AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) on alkoholiliukoinen kromogeeni, joka muodostaa punertavan saostuman reaktiokohdassa kudosis- tai soluvalmisteilla [15]. Se on käytetyin kromogeeni käyttäessä piparjuuriperoksidaasia immunohistokemiassa. Sitä on helppo käyttää ja lopputulosta voi seurata valomikroskoopilla. AEC:ta voi käyttää muiden kromogeenien kanssa, esimerkiksi haluttaessa merkitä useita markkereita yhtäaikaan. [16.]

### 2.6.3 Kromogeeni DAB

DAB (3,3'-diaminobenzidine) on vesiliukoinen kromogeeni, joka muodostaa ruskean värin reaktiokohdassa kudosis- tai soluvalmisteilla. Lämpökestävyyden takia se on tehokas sekä yhden että useiden antigeenien osoittamisessa. [17.] Yleensä DAB:ta käytetään nukleiinihappojen ja proteiinien värjäyksessä. [18.] Värjättyjä tuloksia voi seurata valo- ja elektronimikroskoopilla. [19.]

### 3 Histologisen näytteen käsittely

Koko prosessi alkaa obduktiosalissa. Siellä vastaanotetaan kuolleita eläimiä. Ensimmäiseksi tarkistetaan ja kirjataan eläimen tiedot tietojärjestelmään. Samalla tutkijat tarkistavat eläimen sairaushistorian ja suorittavat ruumiinavauksen ja näytteenoton. Sairaudensyy varmistuu vasta ruumiinavauksen jälkeen. Ulkonäön, oireiden, vertailun ja elimistön kunnan perusteella tutkijat tekevät yhteenvedon tutkimustodistukseen ja määrittävät diagnoosin joka perustuu yllä olevaan kokonaisuuteen. Näytteet makroleikataan histologiaa varten. Tarpeen vaatiessa otetaan näytteet jatkotutkimuksia (virologia, bakteriologia) varten.

#### 3.1 Kudoskäsittelyautomaatti

Kudosprosessointi tehdään laitteella. Kudostenkäsittelyautomaatti sisältää lämmitetyn reaktiokammion, vaha-astiat ja reagenssipullot. Näytekorin avulla siirretään kudokset kasetteja laitteeseen ja sieltä pois. Jotta liukset pystyisivät virtaamaan kasettien ympärillä, korit täytetään mahdollisimman tasaisesti. Laitteeseen voi tallentaa valmiiksi useampia ohjelmia käytön nopeuttamiseksi ja helpottamiseksi. Laitteessa tapahtuu neljä vaihetta: fiksaatio, dehydraatio, kirkastus ja parafiinivahan imeyttäminen.

##### 3.1.1 Fiksaatio

Ennen kuin näytteet viedään patologian laboratorioon, ne leikataan 4–5 mm:n paksuiksi paloiksi ja laitetaan 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (jossa formaldehydin pitoisuus on 4 %) fiksoitumaan. Formaliinia täytyy olla noin kymmenkertainen määrä näytteen tilavuuteen verrattuna. Kudoksen perusteella näytteet pidetään formaliinissa 1–14 päivää. Fiksaation tarkoitus on kudusrakenteen säilyttäminen, entsyymien inaktivaatio ja mikro-organismien toiminnan estäminen. [20.] Näyte tulee fiksoida mahdollisimman pian, jotta kudos säilyisi samankaltaisena kuin elimistössä ollessaan. Sen jälkeen, kun näytteet saapuivat laboratorioon, ne laitetaan kudoskäsittelyautomaattiin, jossa tapahtuu dehydraatio ja parafiiniin imeyttäminen. 10-prosenttisen formaliniin optimaalinen fiksaatioaika on vähintään 24 tuntia. Fiksaatioaika on riippuvainen lämpötilasta, fiksaatiivin nopeudesta ja kudoksen tunkeutumisenopeudesta.

Formaliinifiksaatioissa tapahtuu verkkopolymerisaatio, eli kudoksen proteiinien aminoryhmät toimivat formaliniin aldehydiryhmien kanssa ja niiden välillä muodostuu verkko-

rakenne. Metyleenisillat, jotka muodostavat polypeptidiketjut pääteryhmien välillä, säilyttävät kudoksen morfologian. [8, s. 53–55, 62–63.]

Fiksaatiota tarvitaan siihen, että kudoksesta pysyy mikrotomileikkaamisen jälkeen objektilla, sekä värjäyksen toiminnan parantamiseksi. Jos kudoksesta on formaliinissa yli 14 päivää, sen solut kutistuvat ja kovettuvat.

### 3.1.2 Dehydraatio

Fiksaatiovaiheen jälkeen kudokskäsittelyautomaatti siirtää kudokset vesihuuhteluun pesemällä pois formaliinista ja aloittaa nousevan alkoholisarjan. Yleensä sarja alkaa 50-prosenttisestä etanolista ja etenee 100-prosenttiseen etanoliin. Tämän vaiheen kutsutaan dehydraatioksi, eli veden poisto näytteestä. Liuoksia on aina sarja, jotta näyte pystyy sopeutumaan paremmin. Vesi on poistettava kudoksesta sen vuoksi, että parafiini (yleisin tukiaine) ei ole vesiliukoinen.

### 3.1.3 Kirkastus ja parafiinin imeyttäminen

Dehydraation jälkeen tapahtuu kirkastus, eli imeytetään tukiaineen liuotin (korvataan alkoholi), koska parafiini ei myöskään liukene alkoholiin. Yleensä siirtymäliuottimena käytetään ksyleeniä tai ksyleenin substraattia UltraClear (tässä menetelmässä käytetään ultraclear). Ultraclear liukenee sekä parafiinin että alkoholin kanssa. Kun alkoholi poistetaan kudoksesta, imeytetään siihen tukiaine eli parafiini.

Viimeisessä vaiheessa sulatettu parafiini imeytetään kudokseen. Sen jälkeen tapahtuu valaminen parafiiniin.

## 3.2 Valaminen parafiiniin

Kudosprosessin jälkeen näyte valetaan parafiinin metallisen muotin avulla. Valamisessa käytetään valukeskuslaitetta, johon kuuluu kudosten ja metallisten muottien säiliö, lämpölevy, kylmälevy ja vahan annostelija. Laitteella saadaan aikaiseksi näyteblokkeja, joista leikataan ohuita leikkeitä mikrotomilla.

Kudospalalle valitaan sopivan kokoinen metallinen muotti, johon valutetaan sulaa parafiinia. Asetetaan siihen kudospala oikeaan asentoon (leikkauspinta alaspäin). On tärkeää kiinnittää kudospala pohjalle (painetaan pohjaa vasten), jotta kaikki kudospalat



olisivat samassa tasossa. Muotin päälle asetetaan kasetti, jossa löytyvät tunnistetiedot, täytetään parafiinilla ja annetaan jähmettyä kylmälevyllä. Näyteblockki on valmis leikatavaksi, kun metallinen muotti irtaana.

### 3.3 Kudosblokkien leikkaaminen ja värjääminen

Parafiiniblokki leikataan kertakäyttöisillä terillä mikrotomilla. Sen lisäksi blokki leikattaessa tarvitaan vesihaude sekä kylmä- ja lämpölevy. Muita tarpeellisia tarvikkeita ovat objektilasit (johon leike tulee) ja siveltimet (niiden avulla on helpompaa siirtää leike objektilasille).

Ennen näyteblokkien leikkaamista, poistetaan ylimääräinen parafiini, eli trimmataan, jotta koko kudos tulee paremmin näkyviin. Trimmauksen jälkeen näyteblokkit laitetaan kylmälevylle (näin parafiini viilenee ja se helpottaa leikkaamista mikrotomilla). Kuvassa 5 on esitetty valmiita parafiiniblokkeja, joista leikataan ohuita leikkeitä.



Kuva 5. Valmiita parafiiniblokkeja.

#### 3.3.1 Mikrotomit ja leikkaaminen

Näytteiden leikkaamiseen käytetään liuku- ja rotaatiomikrotomeja. Laitteiden toimintaperiaate poikkeaa jonkin verran toisistaan, näyte liikkuu joko horisontaalisesti tai verti-

kaalisesti mutta molemmilla saadaan sama leikkaustulos. Rotaatiomikrotomeja on saatavilla sekä vesihauteella että ilman sitä. [21.]

Näytteet jäädytetään ennen leikkaamista noin  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jotta niiden leikkaaminen on mahdollista. Näytteestä leikataan neljän mikron paksuisia leikkeitä. Näyte kiinnittyy objektilasille elektrolyyttisesti. Leikkaamisen jälkeen objektilasit kerätään kelkkaan ja laitetaan  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen lämpökaappiin yön yli. Lämpö kiinnittää leikkeen pysyvästi lasille, jotta se kestäisi värjäyksissä käytettävät kemikaalit.

### 3.3.2 Hyvän leikkeen kriteerit

Leikkeet asetetaan tietyille lasille, johon on merkitty tarpeelliset tiedot näytteen identifiointia varten. Leikkeen kriteerit:

- Ei saa olla kuplia.
- Ei saa puuttua osia, rypytön, naarmuton.
- Pitää olla ehjä.
- Ei saa sisältää muiden leikkeiden osia.
- Ei saa olla liian paksu tai ohut.

### 3.3.3 Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Hematoksyliiniä saadaan joko orgaanisesti tai synteettisesti. Orgaanisessa tavassa sitä saadaan Haematoxylon campechianum-puusta, joka kasvaa Keski-Amerikassa, Meksikossa ja Intiassa. Hematoksyliini on itsestään väritön, mutta ilmalle altistuessaan se muuttuu tummanpunaiseksi. Oksidaation tuloksena muodostuu hemateiini. Oksidaatio tapahtuu joko kemiallisesti tai luonnollisesti. Luonnollinen oksidaatio kestää noin kolme-neljä kuukautta, mutta tuloksena erittäin pysyvä väri. Kemiallisesti hapetetun hematoksyliinin etuna on välitön käyttövalmius, haittana on lyhyt käyttöaika.

Eosiini on saanut nimensä kreikkalaiselta aamuruskon jumalalta, jonka nimi oli *Eos*, intensiivisen ruusunpunertavan värin takia. Se on vesi- ja alkoholiliukoinen väri, jota käytetään paljon histologiassa, solubiologiassa ja analyttisessä kemiassa. Eosiini värjää sidekudoksen punaisen eri sävyin.

Hematoksyliini-eosiini (HE)-värjäys on yleisin värjäys histologiassa. Se näyttää kudoksen morfologian. Hematoksyliinia käytetään tumavärinä, koska se on emäksinen väriaine, se värjää parhaiten happamia kudososia. [8, s. 121–126.]

Värjäys tapahtuu värjäysautomaatissa ja lopuksi lasit menevät nousevan alkoholisarjan kautta UltraCleariin. Onnistuneessa värjäyksessä tumat värjäytyvät punertavan siniseksi tai siniseksi, kalkki punavioletiksi, lima-aineet vaaleansiniseksi. Punasolut, sytoplasma, kollageenisäikeet värjäytyvät punaisen sävyillä.

### 3.4 Peittäminen ja tarkastelu

Lasit otetaan pois UltraClearista, kuivataan paperilla ja peitetään peitinlasilla. UltraClear kirkastaa kudoksen ja toimii väliaineen liuottimena, sekä pidentää säilymisaikaa. Se ei muuta näytteen ominaisuuksia, eikä aiheuta näytteessä fysikaalisia tai kemiallisia muutoksia. Histologiassa näytteitä säilytetään vuosia. [22.]

Näytettä katsotaan valomikroskoopilla. Ensin katsotaan pienellä suurennoksella (esimerkiksi 100-kertainen), jolloin tulee näkyviin näytteen yleisrakenne. 200-kertaisella ja 400-kertaisella suurennoksella yleensä katsotaan tarkemmat yksityiskohdat. Sen jälkeen lasit siirtyvät tutkijoille tarkastukseen sekä diagnosointia varten.

### 3.5 Virhelähteet

Yleisimpiä virheitä immunohistokemiallisessa värjäyksessä, jolloin suoritus voi epäonnistua, ovat huono kudoksen morfologia, heikko spesifi värjäytyminen, taustavärjäytyminen ja värjäytymisen puuttuminen kokonaan. Jos primaarivasta-aineen pitoisuus on liian alhainen tai se puuttuu kokonaan värjäyksestä, reaktiota primaarivasta-aineen ja antigeenin välillä ei tapahdu ja seurauksena on värjäytymisen puuttuminen. Samaan ongelmaan voivat johtaa myös virheellinen esikäsitely, tai sen sopimattomuus epitopille sekä vanhentuneet reagenssit.

Taustavärjäytyminen on yksi yleisimmistä ongelmista immunohistokemiallisessa värjäyksessä. Se vaikeuttaa näytteiden tulkintaa, koska se saattaa värjätä sellaisia kohtia, jotka eivät ole positiivisia. Jos ylivärjäytyminen on lievää, sitä voidaan ajatella kauneusvirheenä. Taustaa voivat aiheuttaa esimerkiksi kudoksen kuivuminen, huono fiksaatio, vasta-aineen epäpuhtaus tai sen liian suuri pitoisuus.

Heikko spesifi värjäytyminen voi tapahtua silloin, kun antigeeni värjäytyy sekä positiivisessa kontrollissa, että näytteessä, mutta värjäytyminen on liian vaalea, heikko. Syynä voivat olla esikäsitteilyn sopimattomuus antigeenille, primaarivasta-aineen alhainen pitoisuus tai esimerkiksi lyhyt inkubaatioaika. Jos värjäystuloksen syytä ei löydy, tulee tarkastaa jokainen värjäyksen vaihe.

Morfologian huonontumista voivat aiheuttaa leikkeiden laatu, heikko näytteen fiksaatio, sekä huonosti käsitelty immunohistokemiallinen värjäys.

### 3.6 Värjäysten kontrollointi

Kontrollointi on suoritettava joka värjäyserän yhteydessä, koska sen avulla varmistetaan immunohistokemiallisen värjäyksen spesifisyys. Sillä voidaan varmistaa, että lopputulos on varmasti oikea. Kontrollien avulla on mahdollista myös tunnistaa virhelähteet, joita on voinut tapahtua värjäyksen aikana. Kudoskontrollit voivat olla positiivisia ja negatiivisia.

Positiivinen kontrolli sisältää tutkittavan antigeenin. Sen avulla voidaan varmistaa, että näyte on valmistettu oikein, värjäyksessä käytettiin oikeita inkubaatiolämpötiloja ja inkubaatioaikoja, sekä kaikki tarvittavat reagenssit on lisätty.

Negatiivinen kontrolli ei sisällä tutkittavaa antigeeniä. Jos negatiivisessa kontrollissa ilmestyy positiivinen värjäystulos, siihen voi olla monia eri syitä, kuten väärä vasta-aine tai leimausmenetelmä tai epäspesifinen taustavärjäytyminen.

### 3.7 Värjäysten tulkinta

Ennen näytteiden tarkistusta on ensin tutkittava kontrollileikkeet. Negatiivisesta kontrollista puuttuu epäspesifinen värjäytyminen. Positiivisesta kontrollista nähdään värjäyksen tekninen onnistuminen. Sillä myös arvioidaan värjäyksen herkkyys.

Värjäysten tulkinnassa on oltava kriittinen. Onnistuneessa värjäyksessä on riittävä värin intensiivisyys ja väri on selkeästi paikantunut soluissa, esimerkiksi sytoplasmassa ja tyvikalvolla. Jos lopputulokseen ilmestyi taustavärjäys, sen on oltava minimaalinen eikä häiritä tulosten tulkintaa. Luotettavia tietoja voidaan saada vain hyvin säilyneistä kudosista ja laadukkaista leikkeistä.

## 4 Circovirusinfektiot sialla

Vuonna 1996 kuvattiin ensimmäistä kertaa uusi sioissa esiintyvä sairaus, joka nimettiin PMWS-oireyhtymäksi (engl. Postweaning multisystemic wasting syndrome). Se esiintyy melkein kaikilla maailman alueilla, joissa kasvatetaan sikoja. [23.] Suomessa ensimmäinen PMWS-oireyhtymä havaittiin talvella vuonna 2007. Tämän sairauden ensisijainen aiheuttaja on Circovirus. On olemassa kaksi Circovirus-lajia: PCV1 ja PCV2. PCV1 ei ole patogeeninen. [24.]

PCV2 on pieni, patogeeninen, yksijuosteinen virus, joka kasvaa ja lisääntyy sian soluissa, esimerkiksi sian suolessa, hengitysteissä, pääasiassa imusolmukkeissa ja valkosoluissa [25]. Sen pinta on melko sileä ja kooltaan virus on noin 17–20 nm. Virus replikoituu mitoottisesti aktiivisten solujen tumissa, koska se on erittäin riippuvainen isäntäsolun proteiineista, jotta se pystyisi replikoimaan oman DNA-genominsa. [26.] Virus selviää hyvin monissa ympäristöolosuhteissa, säilyy pakkasessa ja pystyy säilyttämään infektiokykynsä 30 minuuttia +60 asteessa.

Yleensä virus tarttuu vain 6–14 viikkosiin porsaisiin ja 70–80 prosentissa se on tappava. Kuolema tapahtuu äkillisesti. Ihmisille virus ei ole vaarallinen. [27.]

PCV2:n vaikutuksia sikojen immunijärjestelmään ei ole tutkittu riittävästi. Tiedetään, että tärkeimmät kohdesolut, joissa Circovirus lisääntyy, ovat monosyytit, makrofaagit, sekä esimerkiksi follikulaariset dendriittisolut. [28.]

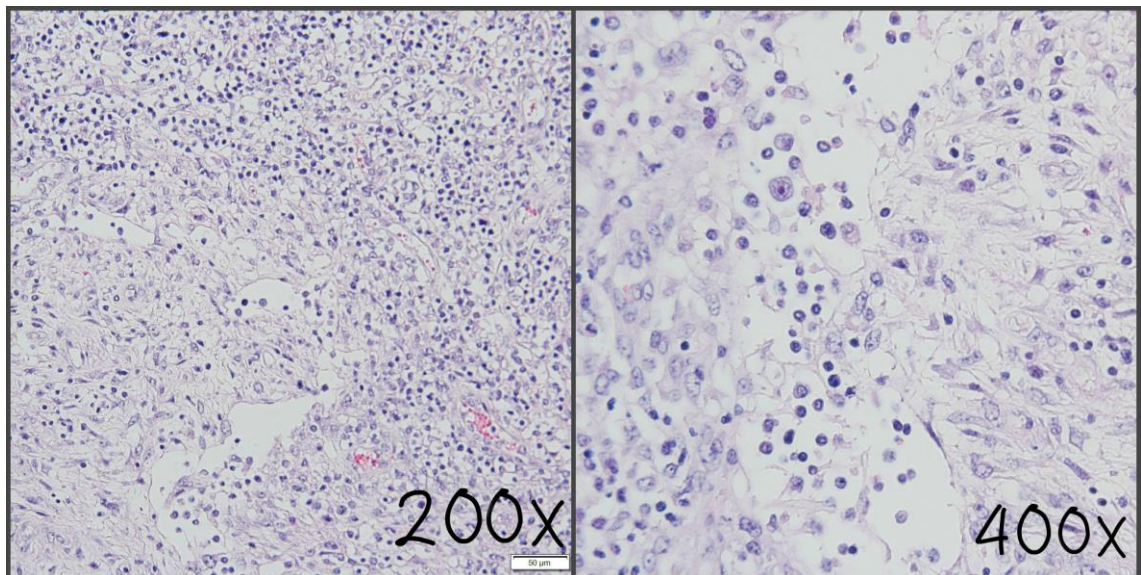
### 4.1 Oireet ja viruksen leviäminen

Tyypillisimmät PMWS-oireyhtymän oireet ovat painon putoaminen, nääntyminen, ripuli, kellertävä iho ja hengitysvaikeudet [24]. Rokotukset ja paremmat elinolot vähentävät riskiä sairastua. Tutkimuksien mukaan Circovirus leviää siasta toiseen pääasiassa lähi-kontaktissa sairastuneiden yksilöiden kanssa ja juomaveden välityksellä. Useimmiten, jos sikalassa siivotaan huolimattomasti, virus voi levitä virtsan ja ulosteen välityksellä. [27.] Jos omistaja epäilee, että sialla on PMWS-oireyhtymä, tai sikoja on kuollut yli 5 % enemmän aikaisemmasta, eläinlääkäriin tulee tarkastaa siat. Nääntyminen saattaa myös osoittaa, että sika on infektoitunut. [24.] Infektoituneilla vastasyntyneillä porsailta saattaa olla vaikeuksia maidon imemisessä, sekä hidastunut kasvu ja kehittyminen [27].

## 4.2 Patologinen tutkimus

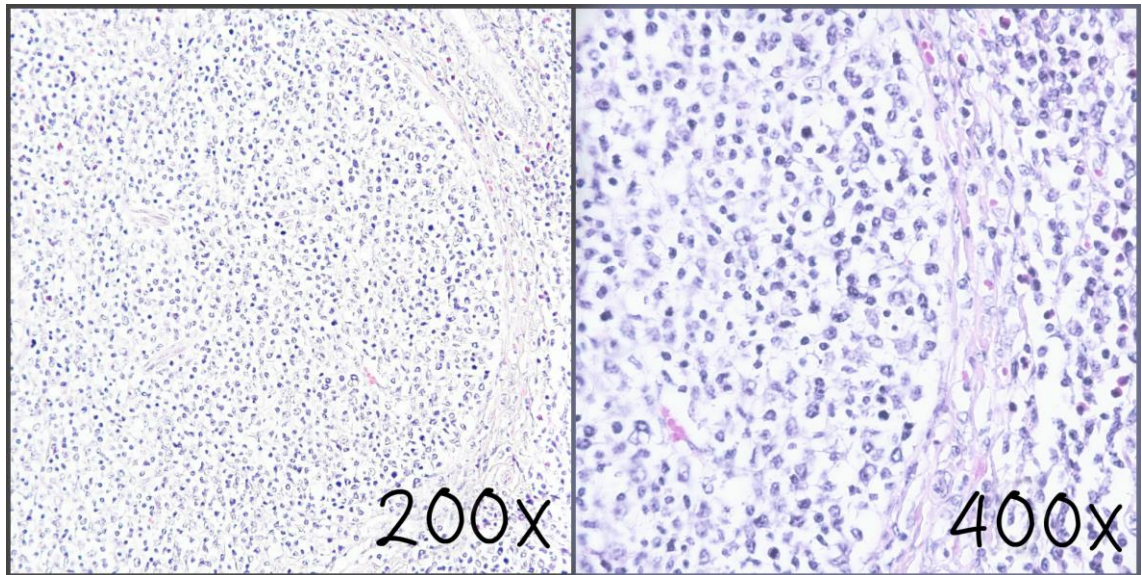
Lopetetuilla porsailla voidaan havaita imusolmukkeiden kasvua, sekä PMWS-taudin yhteydessä jopa kudosuutoksia maksassa ja keuhkoissa. Yleisimmät tavat osoittaa PCV2-virus kudostenäytteistä ovat PCR-menetelmä ja immunohistokemiallinen värjäys. Jättisolut, makrofagit ja imukudossolukon harventuma ovat diagnoosin keskeiset muutokset. [24.] Kuvassa 6 esiintyy infektoidun sian kudoksen eri suurennoksella. Terveen sian kudoksen on esitetty kuvassa 7.

Vähentämällä sikojen stressiä, hygienian ylläpidolla ja ajoissa rokottamisella omistajat voivat ehkäistä sairautta. Hyvään ilmanvaihtoon, pieneen ryhmäkokoön, sopivaan lämpötilaan ja hoitoon täytyy kiinnittää erityistä huomiota. [29.]



Kuva 6. Infektoidun sian kudoksen. 200-kertaisella suurennoksella huomataan imukudossolukon harventuma. 400-kertaisella suurennoksella voidaan havaita jättisolut ja makrofagit. Käsittely hematoksyliini-eosiini-värjäyksellä.





Kuva 7. Terveen sian kudoksesta 400- ja 200-kertaisella suurennoksella. Käsittely hematoksyliini-eosiini-värjäyksellä.

## 5 Prosessi ja toteutus

Työ suoritettiin Ruokaviraston patologian laboratoriossa, erikoistutkija Gabriele Vidgrenin ja laboratorioinsinööri Riitta Villasen ohjauksessa. Tarkoituksena oli testata kolme eri vasta-ainetta, verrata kahta kromogeenia ja kahta entsyymiä, sekä sovittaa menetelmä päivän aikana tehtäväksi.

Tässä työssä käytettiin lyhenteitä (taulukko 1) ja seuraavia vasta-aineita: monoklonaalinen hiiren anti-human mab F217 (A) ja 2C3-B12-C2 (B) sekä polyklonaalinen anti-human bs-10057R (C). Värjäys perustuu siihen, että osoitetaan antigeenin entsyymaattinen värireaktio käyttämällä epäsuoraa immunohistokemiallista menetelmää. Työssä käytettiin negatiivista kontrollia (III), jonka avulla on mahdollista havaita epäspesifinen värjäytyminen. Leikkeiden tulee olla 4 µm paksuja ja kuivatettuja +37 °C:n lämpökäpissa yön yli. Värjäys suoritettiin UltraVision LP (TL-015-HA) ja UltraVision (TL-015-HDJ)-kitillä. Kaikki inkubaatiot tapahtuivat kosteassa kammiossa, jotta näytelasit eivät kuivuisi.

Taulukko 1. Lyhenteet ja selitykset.

	Lyhenne	Selitys
<b>Blokki (lasit)</b>	I	Vanha positiivinen näyte
	II	Uusi positiivinen näyte
	III	Negatiivinen näyte
<b>Vasta-aine</b>	A	Helsingin vanha v-a (mab F217)
	B	Seinäjoen v-a (2C3-B12-C2)
	C	Uusi tilattu v-a (bs-10057R)
<b>Kitti</b>	AEC	aminoethyl carbazole
	DAB	3,3'-diaminobenzidine
<b>Proteaasi</b>	K	prot.K
	E	prot.E

### 5.1 Positiivisen kontrollin testaus

Ensimmäisenä haasteena oli löytää sopiva positiivinen kontrolli, koska vanha oli loppumassa. Vanha positiivinen blokki (I) oli leikattu sian munuaisista. Lähin mahdollinen positiivinen blokki (II) koostui yhdestä imusolmuke- ja kolmesta keuhkopalasta. En-



simmäisenä tarkistettiin uuden kontrollin toimivuus vanhalla värjäysmenetelmällä (taulukko 2).

Taulukko 2. Projektin aloitus.

Blokki	Kitti	v-a	Esikäsittely
I	AEC	A	Prot.K +4oC o/n
		ilman v-a	
II	AEC	A	Prot.K +4oC o/n
		ilman v-a	

Blokista I ja II leikattiin kaksi 4 $\mu$  paksuista leikettä kummastakin, kiinnitettiin ne objektilasille ja laitettiin kuivumaan +37 °C:seen lämpökaappiin yön yli. Seuraavana päivänä laitettiin ne muoviseen värjäysmaljaan ja siirrettiin +65 °C:seen lämpöhauteeseen puoleksi tunniksi. Siinä vaiheessa kun näytteet ovat lämmössä, valmisteltiin esikäsittelyä varten liuos, joka sisälsi proteinaasi K-kantaliuosta ja Tris-EDTA-puskuria. Kun parafiini on sulanut, lasille tehdään rehydraatio, eli ne menevät UltraClearin ja laskevan alkoholi sarjan kautta tislattuun veteen. Värjäysohje kokonaisuudessaan löytyy työn lopussa liitteenä (liite 1)

Antigeenin paljastamiseksi näytteille tehtiin esikäsittely proteinaasi K:lla. Lasilta pyyhittiin ylimääräinen neste pois ja ne asetettiin kosteaan kammioon. Lasit eivät saa missään prosessin vaiheessa kuivua. Sen jälkeen, kun proteinaasi K on pipetoitu näytteiden päälle, kostea kammio laitetaan +38 °C:seen lämpökaappiin 10 minuutiksi, tämän jälkeen tapahtuu ensimmäinen pesu puskurissa.

Värjäys on hyvin monivaiheinen ja sisältää useita puskuripesuja. Pesuilla pysäytetään reaktiota ja estetään sakkautumista, joka saattaa aiheuttaa ongelmia värjäyksen tulkinassa. Jokainen pesu kestää noin kuusi minuuttia liuosta välillä vaihtaen. Tässä työssä käytettiin 0,05 M IHC -puskuria (Tris, jossa 0,1% Tween), pH 7,5.

Monet solut, varsinkin punasolut sisältävät peroksidaasientsyymiä. Vetyperoksidikäsittelyn avulla voidaan inaktivoida kudoksen endogeenisen peroksidaasin, jotta se ei reagoisi reaktiossa toimivan kromogeenin kanssa. Ennen primaarivasta-aineen lisäystä täytyy myös blokata mahdolliset epäspesifiset kohdat pois. Seerumi, jonka avulla tehdään blokkaukset, on valmistettu samasta lajista kuin vasta-aine. Näistä syistä pesun jälkeen lasille tehtiin endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden poisto ja seerumiblokkaukset.

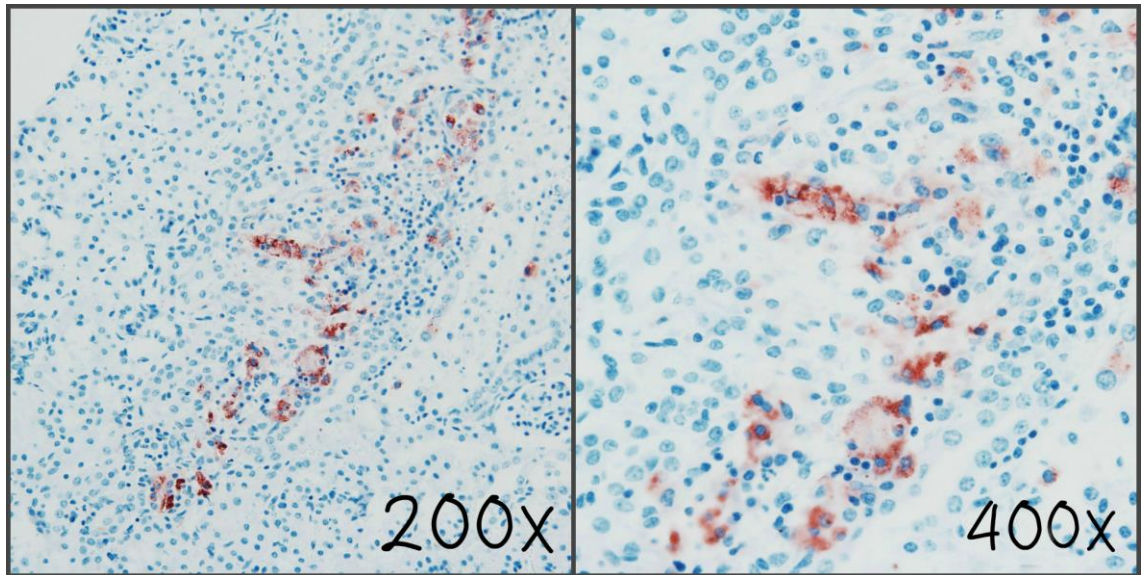
Seuraavassa vaiheessa näytteiden päälle pipetoitiin primaarivasta-aineliuos, joka koostui primaarivasta-aineesta, 1 % BSA:sta (bovine serum albumini) ja Tris-HCl:sta, pH 7,5. Inkubaatio tapahtui +4 °C:ssä yön yli. Jotta lasit eivät kuivuisi, lasien päälle laitettiin muovisia kalvoja.

Seuraavana päivänä näytelasit ensin pestiin puskurissa ja sitten inkuboitiin 20 minuuttia primaarivasta-aineen tehostajan (enchancer) kanssa kosteassa kammiossa huoneenlämmössä. Sen jälkeen näytteiden päälle tiputettiin kolme-neljä pisaraa sekundaarivasta-ainetta (se koostuu sekundaarivasta-aineesta ja ONE HRP Polymerista), jonka annettiin inkuboitua 30 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin kitin AEC-substraattiliuos, jonka inkubointiaika on 10 minuuttia.

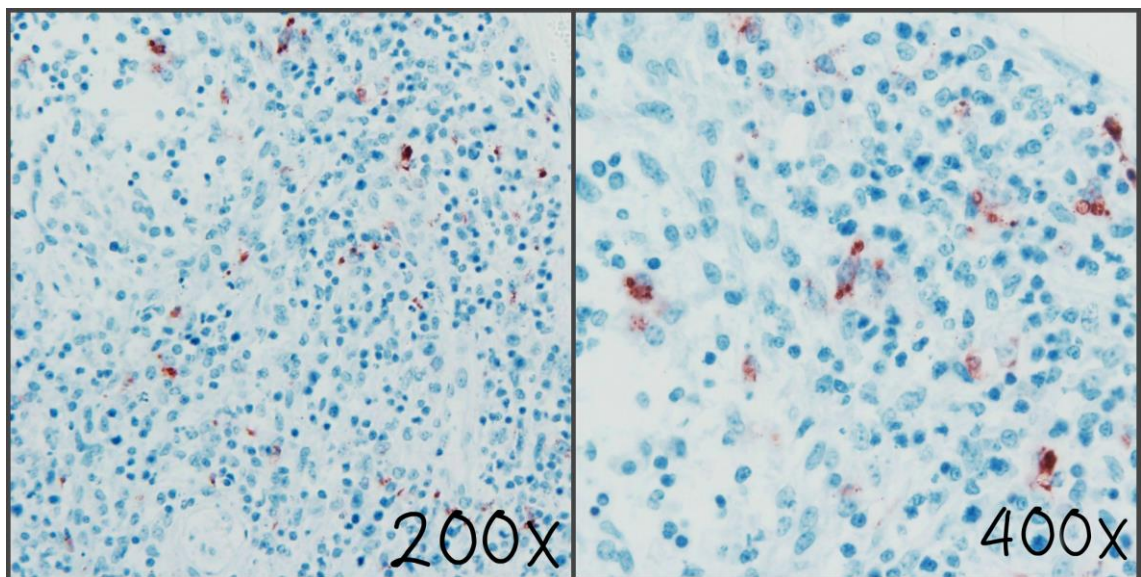
Lopuksi tumat värjättiin hematoksyliinillä. Tumien sinistämiseen käytettiin laimeaa 0,1-prosentista ammoniakkiliuosta. Leikkeet päällystettiin Aquamountilla mikroskooppisen tarkastelun parantamiseksi ja säilyttämiseksi. Koska AEC kitti on alkoholiliukoinen, alkoholisarjaa ei voitu käyttää.

Mikroskopoitiin näytteitä Riitta Villasen ja Gabriele Vidgrenin kanssa heti suorituspäivänä. Totesimme värjäysten onnistuneen, mikä tarkoittaa sitä, että blokki II on positiivinen ja kelpasi projektissa käytettäväksi.

Vanhan ja uuden positiivisen kontrollin tulokset näkyvät kuvassa 8 ja 9.



Kuva 8. Vanha positiivinen kontrolli 400- ja 200-suurennoksella. (käytetty kromogeeni AEC, vasta-aine B, prot.E)



Kuva 9. Uusi positiivinen kontrolli 400- ja 200-suurennoksella. (käytetty kromogeeni AEC, vasta-aine B, prot.E)

Tämän tarkistuksen perusteella suunniteltiin projektille aikataulu (taulukko 3).

Taulukko 3. Projektin aikataulu.

	<b>Blokki</b>	<b>ilman v-a</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Koe 1.</b>	AEC, prot.K, 1:200, +4 °C o/n				
	II	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
	III	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
<b>Koe 2.</b>	AEC, prot.K, 1:200, +4 °C o/n				
	I	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
<b>Koe 3.</b>	DAB, prot.K, 1:200, +4 °C o/n				
	II	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
	III	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
<b>Koe 4.</b>	AEC, prot.K, 1:50, +20 °C 1h				
	II	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
	III	ilman v-a	v-a A	v-a B	v-a C
<b>Koe 5.</b>	AEC ja DAB, prot.E, 1:200, +4 °C o/n				
	II	ilman v-a AEC		v-a B AEC ja DAB	
	III	ilman v-a DAB		v-a B AEC ja DAB	
<b>Koe 6.</b>	AEC ja DAB, prot.E, 1:200, +4 °C o/n				
	II	ilman v-a AEC	v-a A AEC ja DAB		v-a C AEC ja DAB
	III	ilman v-a DAB	v-a A AEC ja DAB		v-a C AEC ja DAB
<b>Koe 7.</b>	AEC, prot.E ja prot.K, 1:100, +20 °C o/n				
	II	ilman v-a		v-a B prot.K ja E	v-a C prot.K ja E
	III	ilman v-a		v-a B prot.K ja E	v-a C prot.K ja E

## 5.2 Koe 1

Taulukon mukaan ensimmäisenä päivänä testattiin kaikki kolme vasta-ainetta samalla menetelmällä, jota käytettiin positiivisen kontrollin tarkistuksessa. Analyysissa käytettiin kahdeksan lasia: kaksi (II ja III) ilman vasta-ainetta, sekä II ja III vasta-aineella A, B ja C. Lopputuloksessa negatiiviset kontrollit pysyivät negatiivisena. Positiivisien näytteiden solut olivat vaaleampia kuin niiden olisi pitänyt olla, minkä takia päätettiin, että täytyy tarkistaa vasta-aineiden toimivuus vanhalla positiivisella kontrollilla (I.) ennen kuin tarkistetaan DAB-kit.

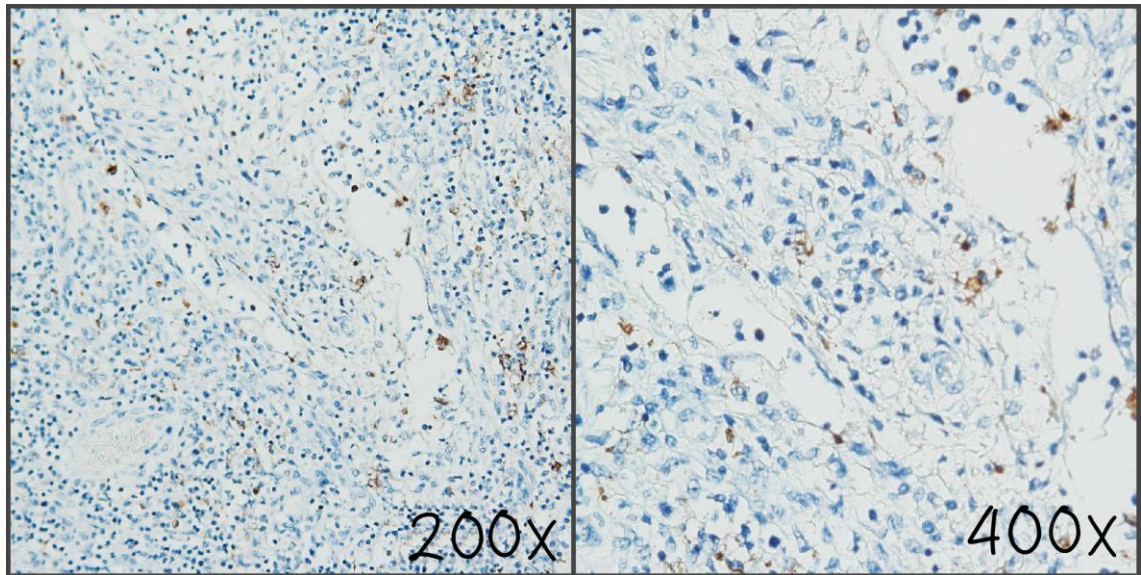
## 5.3 Koe 2

Tarkistukseen valittiin neljä kontrollia: yksi lasi, johon ei tullut vasta-ainetta ja kolme muuta, joihin pipetoitiin A, B ja C vasta-aineet. Värjäys sujui hyvin, paitsi heti hematoksyliinin jälkeen lasilla, johon pipetoitiin A-vasta-aine, ilmestyi tausta. Mikroskopoinnissa todettiin, että kaikki kolme vasta-ainetta ovat positiivisia, A:n tausta ei häiritse. Päätettiin, että uusi kontrolli on yhtä hyvä kuin vanha. Sen vaaleampi väri perustuu kudokseen. Aiemmin oli munuainen ja uusi on imusolmuke. Mitä tiheämmin solut ovat kudoksessa, sitä kirkkaampi on näytelasin väri.

## 5.4 Koe 3

Huomattiin, että AEC- ja DAB-kitin prosessiliuokset ovat identtisiä, ainut ero on kromogeenissa. Tämän perusteella voitiin olettaa, että värjäys onnistui ja ainut ero on infektoitujen solujen väri. DAB on vesiliukoinen kromogeeni, joten lopussa käytettiin nousevaa alkoholisarjaa ja peiteltiin UltraKitillä. DAB-kromogeeni on paljon vahvempi kuin AEC ja sen inkubointiaika on kaksi kertaa lyhyempi, eli viisi minuuttia. Tuloksena olivat erittäin hyvin värjäytyt näytelasit joiden positiiviset kohdat olivat värjäytyneet tummanruskealla värillä (kuva 10). Laseille, joille pipetoitiin A- ja C-vasta-aineita oli tullut hyvin vähän taustaa, joka ei vaikuta tuloksiin. DAB-kitin värjäysohje löytyy liitteessä 2.

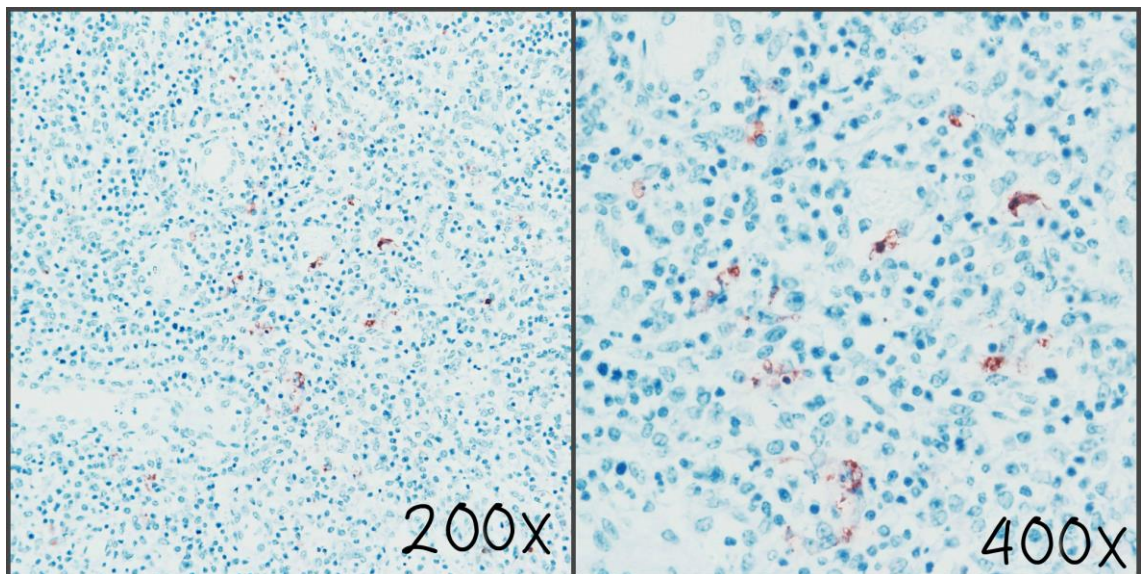




Kuva 10. Kromogeeni DAB, vasta-aine B, prot.E.

#### 5.5 Koe 4

Seuraavaksi testattiin, toimiiko värjäys, jos se tehtäisiin yhden päivän aikana. Laimennos muutettiin väkevämmäksi (1:50) ja inkubointi tapahtui yhdessä tunnissa huoneen lämmössä. Tulokset saatiin samana päivänä. Vaikka käytössä oli vahvempi laimennos, näytelasien väri oli paljon heikempi (kuva 11). Lasille A ilmestyi voimakas tausta. Suunnitteluun tehtiin pieniä muutoksia – lisättiin laimennoksen 1:100 molemmilla proteiinaaseilla, inkubointiaika kuitenkin pysyy samana.



Kuva 11. Laimennos 1:50, v-a B, kromogeeni AEC, prot.E.

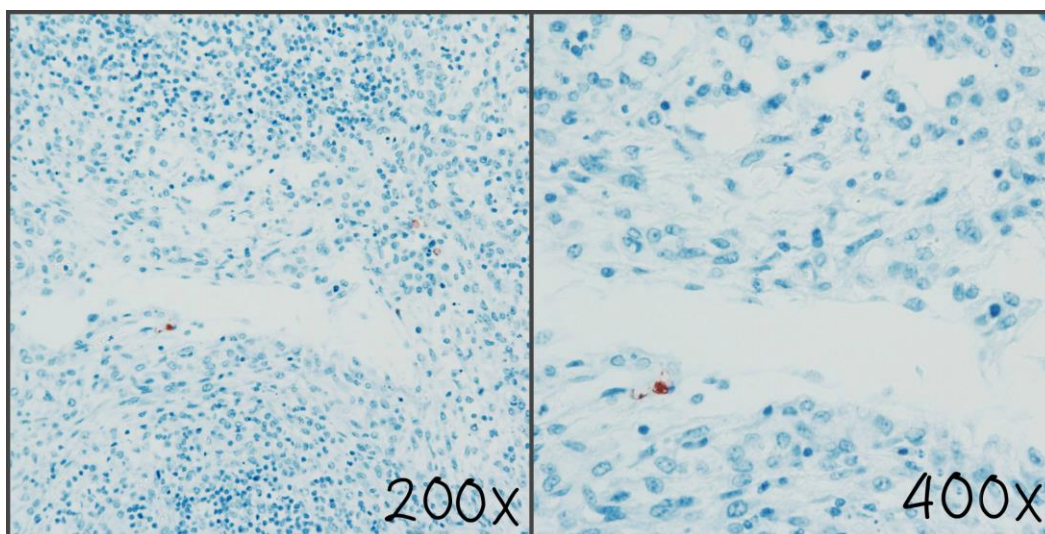
Näiden testien perusteella tultiin päätökseen, että B-vasta-aine on paras toistaiseksi, sillä ei ilmesty taustaa, eikä ole epäspesifisyyttä. Tämän takia päätettiin testejä jatkaa vain B-vasta-aineella.

#### 5.6 Koe 5 ja 6

Kokeissa 5 ja 6 testattiin uutta proteaasientsyymia. AEC-kitin mukaan laitettiin myös yhtä aikaa DAB-kitin laseja. Laimennos ja inkubointiolosuhteet pysyivät alkuperäisenä (1:200, +4 °C o/n). Proteaasi E laimennettiin tislattuun (2-luokan puhtaaseen) veteen 0,05 %:ksi. Jokaiselle lasille pipetoitiin 400 µl proteaasi E:a, siirrettiin kosteaan kammi-oon ja laitettiin +38 °C:n lämpökaappiin 15 minuutiksi. Todettiin molemmilla kromogee-neilla olevan eri inkubointiaika, AEC menee loppuvaiheessa veteen ja DAB alkoholisar-jan kautta UltraCleariin. Entsyymien vertailussa todettiin, että proteaasi E on vahvempi kuin proteaasi K. Se näyttää isomman määrän infektoituja soluja ja solut ovat kirk-kaammin värjäytyneet. Kromogeenit ovat identtisiä ja yhtä hyviä.

#### 5.7 Koe 7

Viimeisenä päivänä päätettiin kuitenkin testata laimennos 1:100 uudella entsyymillä. Mikroskopoinnilla todettiin, että tämä laimennos oli liian laimea, koska väri muuttui vain joissakin infektoiduissa soluissa (kuva 12).



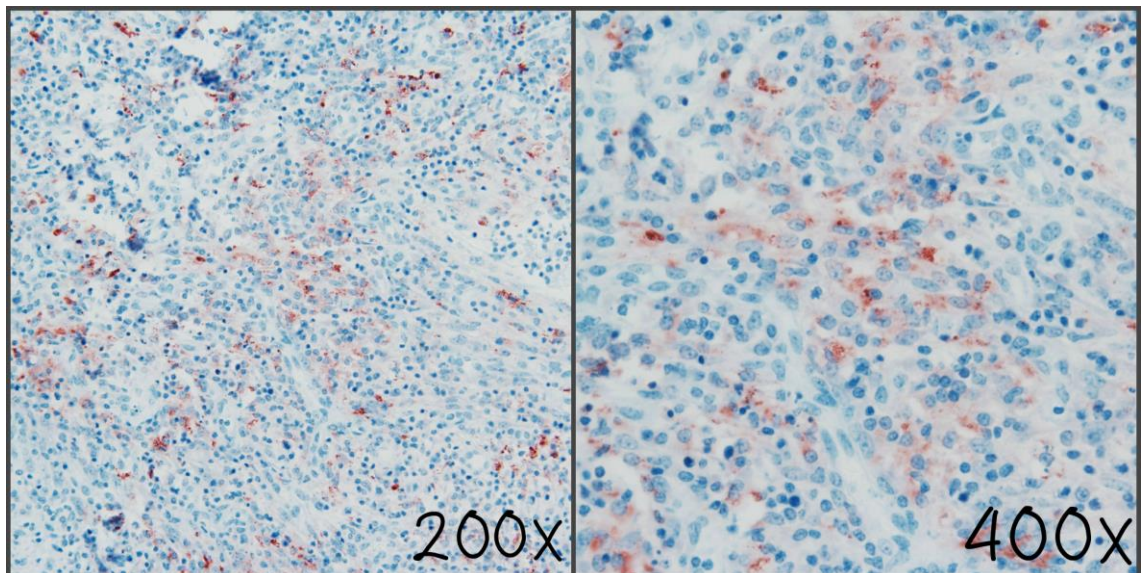
Kuva 12. Laimennos 1:100, vasta-aine B, kromogeeni AEC



Erikoistutkijan Taina Laineen kanssa varmistettiin, että positiivisuus on oikeanlainen ja oikeassa kohdassa.

### 5.8 Taustavärjäytyminen

Negatiivisessa kontrollissa ilmeni punaiseksi värjäytyneitä soluja. Erikoistutkija Taina Laine selitti tämän siten, että kudoksessa voi olla rakenteita, joihin väri kiinnittyy, mutta ne ovat kuitenkin erotettavissa morfologian perusteella. Jos kysymyksessä olisi merkittävä huomio, pitää näkyä muutoksia kudoksessa sekä muun tutkimukseen liittyvän asian/oireiden tulee tukea löydöstä. Jos löytyy vain yksi positiivinen solu, siitä ei välttämättä ole vaikutusta sialle, mikäli siltä puuttuvat oireet. Circovirus voi elää siassa, mutta se ei välttämättä sairastuta eläintä.



Kuva 13. Tausta. Vasta-aine A, kromogeeni AEC

Taustavärjäytyminen eli ylivärjäytyminen vaikeuttaa näytteiden tulkintaa, koska se saattaa värjätä sellaisia kohtia, jotka eivät ole positiivisia (kuva 13). Jos ylivärjäytyminen on lievää, sitä voidaan ajatella kauneusvirheenä. Taustaa voivat aiheuttaa esimerkiksi kudoksen kuivuminen, huono fiksaatio, vasta-aineen epäpuhtaus tai sen liian suuri pitoisuus.



## 6 Pohdinta ja yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata kolme eri vasta-ainetta, verrata kahta kromogeenia ja kahta proteaasia, sekä mahdollisesti saada yön yli-värjäys suoritettua yhden päivän aikana.

Testattavaksi jäi vasta-aineen laimennos 1:75. Opinnäytetyön tekemiseen annettu aika oli lyhyt, jotta pystyisin tarkistamaan kaikki mahdolliset vaihtoehdot, mm. testata vasta-aineen 1:75 laimennosta, sekä inkubaatioaikaa yön yli värjäyksestä päivän aikana tehtäväksi. Tärkeimmät tutkimukset on kuitenkin tehty.

Vasta-aineen korkean hinnan perusteella kaikkein järkevintä olisi tehdä värjäys kahdessa päivässä, kuten meneteltiin aiemmin. Toisaalta Circovirusta esiintyy vuosi vuodelta yhä harvemmin, joten olisi paljon tehokkaampi saada tuloksia samana päivänä (myös asiakkaiden kannalta).

Yhteenvetona voidaan sanoa, että punainen kromogeeni AEC erottuu mikroskopoitaessa ruskeasta DAB:ista paljon paremmin, eikä se myöskään ole niin haitallinen ympäristölle – muuten ne ovat yhtä hyviä. Tulokset ovat esitetty kuvissa 14 ja 15.

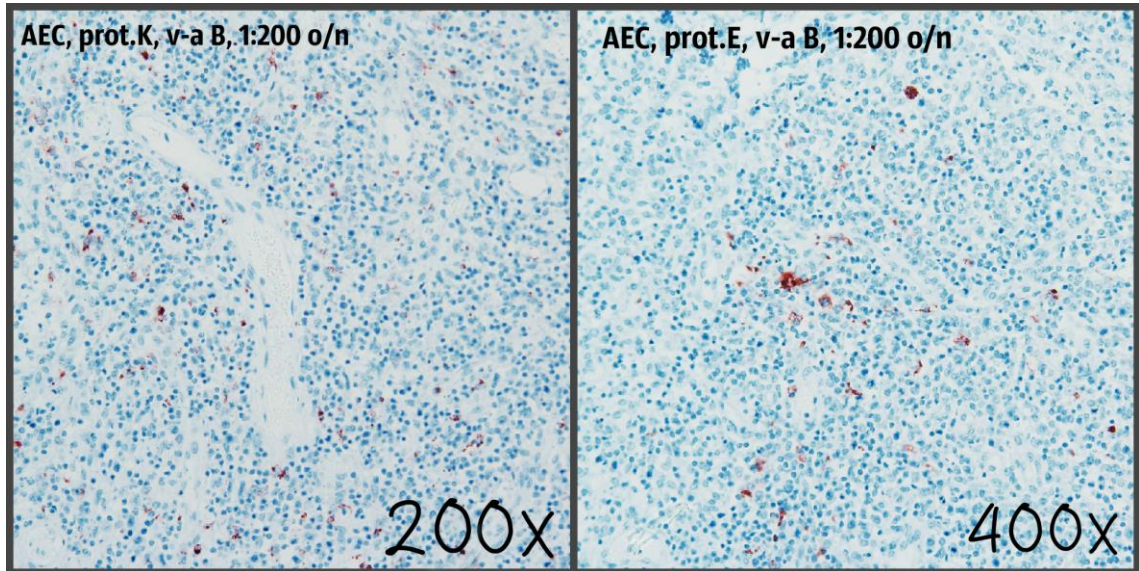
Proteaasi E on herkempi, vahvempi ja kirkkaampi kuin proteaasi K. Vasta-aineen laimennos 1:200 on luotettavampi ja edullisempi kuin muut laimennokset, joten jatkossa käytetään vanhaa laimennosta toistaiseksi kunnes testataan laimennosta 1:75. Tavoitteena on kuitenkin saada värjäys toimimaan yhden päivän aikana.

Vasta-aine B sopii Circo-värjäykseen kaikkein parhaiten, koska jokainen lasi näytti erinomaiselta, luotettavalta, ilman epäspesifisyyttä ja ilman taustaa molemmilla kitillä.

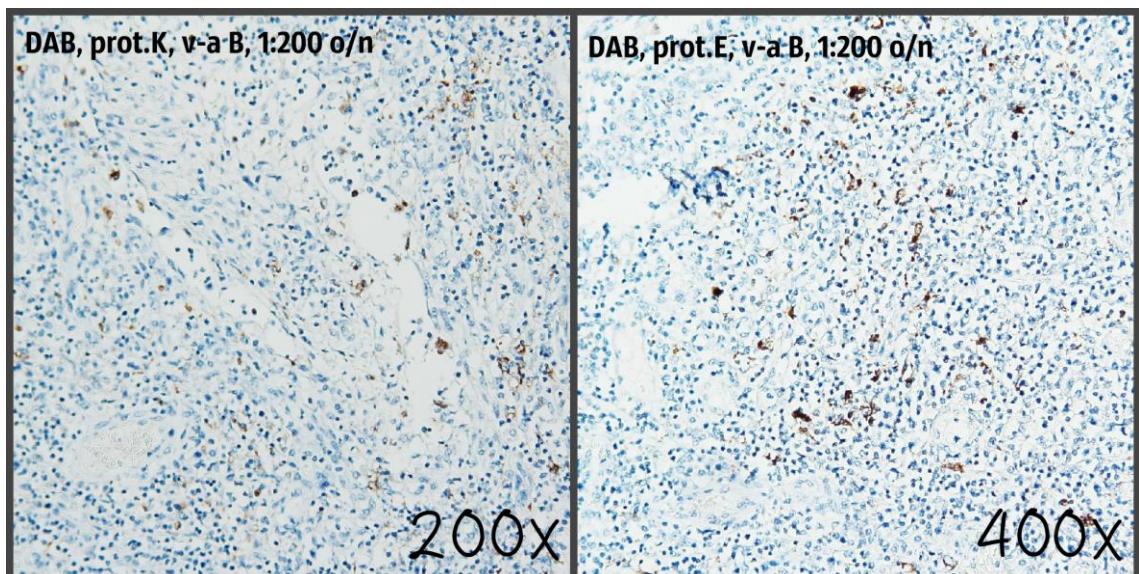
Vasta-aine C oli myös riittävän hyvä. Uuden vasta-aineen ostamisen sijasta voidaan käyttää Seinäjoen vasta-ainetta ja säästää rahaa. Vasta-aine B oli kuitenkin parempi kuin kaupallinen vasta-aine C.

Vasta-aine A loppui kokonaan ja tuloksien perusteella se ei ollut enää riittävän hyvä circo-värjäykselle, luultavasti sen epäpuhtauden takia. Jokaisella lasilla oli epäspesifinen taustavärjäys.

Eli tämän immunohistokemiallisen värjäyksen optimaaliset olosuhteet ovat seuraavat: prot.E esikäsitellyssä, laimennos 1:200, inkubaatio +4 °C:ssa yön yli, vasta-aine 2C3-B12-C2 ja AEC-kromogeeni.



Kuva 14. AEC prot. K vs prot. E.



Kuva 15. DAB prot. K vs prot. E.

Tärkeimpänä tämän projektin tavoitteena oli saada testattuna vasta-aineet ja kahta kromogeenia, koska vanha vasta-aine oli lähiaikoina loppumassa. Samalla selvitettiin, että AEC-kitin reagenssit ovat samanlaiset kuin DAB-kitissä, joten ei ole enää kiirettä

etsiä uutta kromogeenia, vaan pystytään tilamaan erikseen AEC:tä. Jokainen tulos, joka saatiin tässä työssä, toi paljon lisätietoa mahdollista menetelmän jatkokehittämistä varten.

Haluan kiittää ohjaajiani Riitta Villasta ja Gabriele Vidgreniä perusteellisesta ja kärsivällisestä ohjauksesta prosessin aikana.

## Lähteet

- 1 Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии респотребнадзора. Verkkoaineisto. Иммуногистохимия. <<http://hniiem.rosпотребнадzor.ru/press/release/73753/>>. Luettu 1.9.2019.
- 2 Immunohistochemical staining methods. Verkkoaineisto. Daco. Education guide. <[http://www.kanidis.gr/common/files/ANOSOISTOCHIMIA/DETECTION/ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.kanidis.gr/common/files/ANOSOISTOCHIMIA/DETECTION/ihc_staining_methods_5ed.pdf)>. Luettu 1.9.2019.
- 3 Уральский федеральный университет. Verkkoaineisto. Свойства антигенов. <[https://media.ls.ufu.ru/imunohimiya/immunohimiya/antigeny/svoistva\\_antigenov/](https://media.ls.ufu.ru/imunohimiya/immunohimiya/antigeny/svoistva_antigenov/)>. Luettu 2.9.2019.
- 4 Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова. Verkkoaineisto. Антигены, антитела. <<https://rzgmu.ru/images/files/e/8095.pdf>>. Luettu 2.9.2019.
- 5 Voronin, Evgeni; Kislenko, Viktor; Kolichev, Nikolai and Pleshakova, Valentina. Verkkoaineisto. Антитела: строение и функции иммуноглобулинов. <<https://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/immun/at.htm>>. Luettu 2.9.2019.
- 6 Voronin, Evgeni; Kislenko, Viktor; Kolichev, Nikolai and Pleshakova, Valentina. Verkkoaineisto. Антитела. <[https://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/immun/at\\_res.htm](https://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/immun/at_res.htm)>. Luettu 3.9.2019.
- 7 Encyclopedia Britannica. Kuva. Antibody. <<https://www.britannica.com/science/antibody>>. Luettu 2.9.2019.
- 8 Bancroft, D. John and Gamble, Marilyn. 2008. Theory and practice of histological techniques. United Kingdom: Churchill livingstone elsevier. 6<sup>th</sup> ed. Luettu 15.9.2019.
- 9 Creative diagnostics. Kuva. Polyclonal vs. monoclonal antibodies. <<https://www.creative-diagnostics.com/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies.htm>>. Luettu 7.9.2019.
- 10 Abcam. Kuva. Direct vs indirect immunofluorescence. <<https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>>. Luettu 6.9.2019.
- 11 Merck. Verkkoaineisto. Protease from *Streptomyces griseus*. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5147>>. Luettu 9.9.2019.
- 12 ThermoFisher scientific. Verkkoaineisto. Proteinase K solution. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM2548#/AM2548>>. Luettu 9.9.2019.
- 13 Evrogen. Verkkoaineisto. Протеиназа K. <<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/EK001.pdf>>. Luettu 9.9.2019.



- 14 Merck. Verkkoaineisto. Proteinase K. <<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>>. Luettu 9.9.2019.
- 15 AEC solution (IHC). Verkkoaineisto. ThermoFisher. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/001122#/001122>>. Luettu 1.9.2019.
- 16 Neo Biotech. Verkkoaineisto. HRP chromogen for IHC-AEC. <<https://www.neobiotech.com/buy/cat-hrp-chromogen-for-ihc-aec-3861.html>>. Luettu 1.9.2019.
- 17 Vector Laboratories. Verkkoaineisto. DAB peroxidase (HRP) substrate kit (with Nickel), 3,3'-diaminobenzidine. <<https://vectorlabs.com/dab-peroxidase-hrp-substrate.html>>. Luettu 10.9.2019.
- 18 Академик. Verkkoaineisto. 3,3'-diaminobenzidine. <<https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1416439>>. Luettu 10.9.2019.
- 19 3,3'-diaminobenzidine. Verkkoaineisto. Merck. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d12384?lang=fi&region=FI>>. Luettu 10.9.2019.
- 20 Riitta Villasen suullinen tiedonanto.
- 21 Docplayer. Verkkoaineisto. Основные типы современных микротомов. <<https://docplayer.ru/37304410-Osnovnye-tipy-sovremennyh-mikrotomov.html>>. Luettu 20.8.2019.
- 22 Ruokaviraston värjäysohje LAB 8201/1.
- 23 Yang, Yifei; Shi, Ruihan; She, Ruiping; Mao, Jingjing; Zhao, Yue; Du, Fang; Liu, Can; Liu, Jianchai; Cheng, Minheng; Zhu, Rining; Li, Wei; Wang, Xiaoyang and Hussain, Majid Soomro. 2015. Verkkoaineisto. Fatal disease associated with *Swine Hepatitis E virus* and Porcine circovirus 2 co-infection in four weaned pigs in China <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4379595/>>. Luettu 1.9.2019.
- 24 PMWS –oireyhtymä. Verkkoaineisto. <<https://www.ruokavirasto.fi/viljelijat/elaintenpito/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/siat/pmws-pcvad/>>. Luettu 1.9.2019.
- 25 Misset Uitgeverij B.V. Verkkoaineisto. Porcine Circovirus Infection, Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS). <<https://www.pigprogress.net/Health/Health-Tool/diseases/Porcine-Circovirus-Infection-Post-weaning-Multisystemic-Wasting-Syndrome-PMWS-and-Porcine-Dermatitis-and-Nephropathy-Syndrome-PDNS/>>. Luettu 1.9.2019.
- 26 Payne, Susan. 2017. Other small DNA viruses. Verkkoaineisto. Viruses. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128031094000301>>. Luettu 4.9.2019.

- 27 Sian circovirus-infektio: taudin syyt, oireet ja rokotteet. 2019. Verkkoaineisto. Maatalous. <<https://fin.mentorbizlist.com/4087910-swine-circovirus-infection-causes-of-disease-symptoms-and-vaccines>>. Luettu 10.9.2019.
- 28 Sian circovirus-infektio: taudin syyt, oireet ja rokotteet. 2019. Verkkoaineisto. Maatalous. <<https://fin.mentorbizlist.com/4087910-swine-circovirus-infection-causes-of-disease-symptoms-and-vaccines>>. Luettu 12.9.2019.
- 29 Kiksmeller, Marion; Elbers, Knut and Fachinger, Vikki. 2004. Снижение сопутствующих инфекций у свиней с помощью антигена pcv2. Verkkoaineisto. Edrid. <<https://edrid.ru/rid/216.012.636f.html>>. Luettu 1.9.2019.

**AEC-ohje**

<b>Vaihe</b>	<b>Aine/laite</b>	<b>Kesto</b>	<b>Lämpötila</b>
parafiinin sulatus	MicroPobelämpöhaude	30 min	+65 °C
deparaffinointi	UltraClear, 100% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH, d.H <sub>2</sub> O	30 min	RT
Esikäsittely	prot. K / prot. E	10/15 min	+37 °C
pesu	IHC-puskuri	2x2min	RT
PO Blokkkaus	1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + MeOH	10 min	RT
pesu	IHC-puskuri	2x2 min	RT
Seerumi blokkkaus	ULTRA-V	5 min	RT
1. ab inkubaatio	Primaarivasta-aine	o/n	+4 °C
pesu	IHC-puskuri	2x2min	RT
Enhancer	Enhancer	20 min	RT
pesu	IHC-puskuri	2x2 min	RT
2. ab inkubaatio	ONE HRP Polymer	30 min	RT
pesu	IHC-puskuri	2x2min	RT
Kromogeenivärjäys	AEC Single solution	10 min	RT
pesu	d.H <sub>2</sub> O	dipp.	RT
Tumavärjäys	hematoksyliini	3 min	RT
pesu	Juokseva vesijohtovesi	2 min	RT
sinistäminen	ammoniakki 0.1%	2 sek	RT
huuhtelu	d.H <sub>2</sub> O	2 sek	RT
Peittely	Aquamount		

**DAB-ohje**

<b>Vaihe</b>	<b>Aine/laite</b>	<b>Kesto</b>	<b>Lämpötila</b>
parafiinin sulatus	MicroPobelämpöhaude	30 min	+65 °C
deparaffinointi	UltraClear, 100% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH, d.H2O	30 min	RT
Esikäsittely	prot. K / prot. E	10/15 min	+37 °C
pesu	IHC-puskuri	2x2min	RT
PO Blokkauk	1% H2O2 + MeOH	10 min	RT
pesu	IHC-puskuri	2x2 min	RT
Seerumi blokkauk	ULTRA-V	5 min	RT
1. ab inkubaatio	Primaarivasta-aine	o/n	+4 oC
pesu	IHC-puskuri	2x2min	RT
Enhancer	Enhancer	20 min	RT
pesu	IHC-puskuri	2x2 min	RT
2. ab inkubaatio	ONE HRP Polymer	30 min	RT
pesu	IHC-puskuri	2x2min	RT
Kromogeenivärjäys	DAB Single solution	10 min	RT
pesu	d.H2O	dipp.	RT
Tumavärjäys	hematoksyliini	3 min	RT
pesu	Juokseva vesijohtovesi	2 min	RT
sinistäminen	ammoniakki 0.1%	2 sek	RT
huuhtelu	Juokseva vesijohtovesi	2 min	RT
Dehydraatio	70% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH, UltraClear	10-15 sek	RT
Peittely	UltraKit		