



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Mikko Määttä

COVID-19-taudin molekyylibiologinen diagnostiikka

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

16.9.2020

Tekijä Otsikko	Mikko Määttä COVID-19-taudin molekyylibiologinen diagnostiikka
Sivumäärä Aika	38 sivua + 2 liitettä 16.9.2020
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	erikoistutkija Soile Blomqvist lehtori Tiina Soininen
<p>COVID-19 on uuden koronaviruksen, SARS-CoV-2:n aiheuttama hengitystieinfektio. Maailman terveysjärjestö (WHO) julisti keväällä 2020 COVID-19:n maailmanlaajuiseksi pandemiaksi. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL) aloitti maaliskuussa 2020 COVID-19 primäridiagnostiikkalaboratoriotoiminnan. Molekyylibiologinen COVID-19 diagnostiikka toteutetaan reaaliaikaisena RT-PCR-testinä, jota varten näytteestä on eristettävä viruksen RNA.</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää THL:n asiantuntijamikrobiologian laboratorioon hankittujen uusien nukleiinihappoeristys- ja diagnostiikkalaitteiden soveltuvuus COVID-19-diagnostiikkaan. Työssä käytettiin laboratorion käytössä ollutta RNeasy-eristyskitin menetelmää referenssimenetelmänä ja kyseisen menetelmän protokollaa sovellettiin testin laitteille. Vertailtavia laitteita oli Qiagen QIAcube Connect, PerkinElmer chemagic360, Qiagen QIASymphony SP/AS, NeuMoDx Molecular System ja QIAstat-Dx.</p> <p>Työ toteutettiin vertailemalla laitteiden herkkyyttä positiivisen näytteen laimennossarjalla, arvioimalla laboratorion kapasiteettia vertailemalla laitteilla työhön kulunutta aikaa ja vertailemalla laitteiden käyttökustannuksia. Työssä myös vertailtiin QIAstat-Dx:n suoriutumista COVID-19-testistä laboratorion referenssimenetelmään verrattuna.</p> <p>Työn tulosten perusteella chemagic360 suoriutui herkkyydestä, työaikavertailussa ja kustannusvertailussa muita laitteita paremmin. Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella laboratorio nosti testauskapasiteettia investoimalla uusiin PerkinElmer chemagic360 -eristysautomaatteihin. Tulosten perusteella QIAcube, NeuMoDx ja QIAstat-Dx soveltuvat myös COVID-19-testaukseen testin menetelmää hyödyntäen. QIASymphony eristysprotokollaa täytyy optimoida ennen kuin laitetta voidaan käyttää rutiinomaisessa diagnostiikassa.</p>	
Avainsanat	RT-PCR, COVID-19, RNA

Author Title	Mikko Määttä Molecular Biological Diagnostics of COVID-19
Number of Pages Date	38 pages + 2 appendices 16 September 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Soile Blomqvist, Senior Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>COVID-19 is a respiratory infection caused by a novel coronavirus, SARS-CoV-2. In the spring of 2020, the World Health Organization (WHO) declared COVID-19 a global pandemic. In March 2020, Finnish National Institute for Health and Welfare (THL) started COVID-19 primary diagnostic laboratory operations. Molecular biological diagnostics of COVID-19 are performed as a real-time RT-PCR test, for which viral RNA must be extracted from a sample.</p> <p>The aim of this thesis study was to find out the suitability of the new nucleic acid isolation and diagnostic instruments purchased for THL's expert microbiology laboratory for COVID-19 diagnostics. The RNeasy extraction kit used in the laboratory was used as a reference method and the protocol of that method was applied to the test instruments. Instruments to be compared were Qiagen QIAcube Connect, PerkinElmer chemagic360, Qiagen QIASymphony SP/AS, NeuMoDx Molecular System and QIAstat-Dx.</p> <p>The work was carried out by comparing the sensitivity of instruments with a dilution series of a positive sample, evaluating the capacity of the laboratory, comparing the hands-on-time spent working with the instruments and comparing the operating costs of the instruments. The work also compared the performance of QIAstat-Dx in the COVID-19 test with the laboratory reference method.</p> <p>Chemagic360 performed better than other instruments in the sensitivity test, working time comparison and cost comparison. Based on the results of this thesis, the laboratory increased its testing capacity by investing in new PerkinElmer chemagic360 nucleic acid extraction instruments. According to the results, QIAcube, NeuMoDx and QIAstat-Dx are also suitable for COVID-19 testing using the test method. The QIASymphony isolation protocol must be optimized before the instrument can be used in routine diagnostics.</p>	
Keywords	RT-PCR, COVID-19, RNA

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Koronavirukset	2
2.1	Yleistä koronaviruksista	2
2.2	Ihmisen koronavirukset	5
2.3	SARS-CoV	5
2.4	MERS-CoV	6
2.5	SARS-CoV-2	7
3	COVID-19-taudin laboratoriodiagnostiikka	7
3.1	Yhteenveto diagnostisista testeistä	7
3.2	Nukleiinihappojen osoitus	9
3.2.1	Nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen	9
3.2.2	RT-qPCR	10
4	Työn tavoitteet	12
5	Työssä käytetyt laitteet ja menetelmät	12
5.1	Bio- ja työturvallisuus	13
5.2	Laimennossarjan valmistaminen	14
5.3	PCR-reaktiosekset ja PCR-ohjelma	14
5.4	QIAGEN QIAcube Connect	16
5.5	PerkinElmer chemagic™360	17
5.6	QIAGEN QIAsymphony SP/AS	20
5.7	NeuMoDx™ 96 Molecular System	21
5.8	QIAGEN QIAstat-Dx Analyzer	24
6	Työn tulokset	26
6.1	Herkkyys	27
6.2	Työaika	28
6.3	Käyttökustannukset	29
6.4	QIAstat-Dx:n suorituskyvyn arviointi	30
7	Pohdinta ja yhteenveto	32

7.1	Luotettavuus	32
7.2	Laitteistojen vertailun havainnot	32
7.3	THL:n jatkotoimenpiteet	34
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. Laimennossarjan Cq-arvot	
	Liite 2. Työaikavertailu	

Lyhenteet

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2. Angiotensiinikonvertaasi 2. Solun pinnalla oleva reseptori, johon SARS-koronavirus tarttuu.
COVID-19	Coronavirus disease 2019. Koronavirustauti 2019. SARS-CoV-2-viruksen aiheuttama tauti.
IVD	In vitro –diagnostiikka. Potilaasta otetusta näytteestä tehtävä lääketieteellinen tutkimus.
LDT	Laboratory Developed Test. Laboratoriossa kehitetty testi. In vitro -diagnostiikkatesti, joka on kehitetty testiä käytettävässä laboratoriossa.
MERS	Middle East Respiratory Syndrome. Lähi-idän hengitystieoireyhtymä. MERS-koronaviruksen aiheuttama hengitystieinfektio.
PCR	Polymerase Chain Reaction. Polymeraasiketjureaktio.
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome. Äkillinen vakava hengitystieoireyhtymä. SARS-koronaviruksen aiheuttama hengitystieinfektio.

1 Johdanto

Koronavirukset ovat viruksia, jotka aiheuttavat ihmisissä tyypillisesti lievän hengitystieinfektion. Koronaviruksen aiheuttamia infektioita tavataan useimmiten syksyllä ja talvella, mutta virusta esiintyy ympäri vuoden. Koronavirukset tarttuvat hengitysteihin joko ilmassa leijuvien aerosolien välityksellä tai käsistä kosketeltujen pintojen kautta. [1.]

COVID-19 on betakoronaviruksiin kuuluvan SARS-CoV-2-viruksen aiheuttama hengitystieinfektio, jonka tyypillisimmät oireet ovat kuume, yskä, kurkkukipu, päänsärky ja nuha. Joskus koronavirusinfektio siirtyy alempiin hengitysteihin, jolloin se voi aiheuttaa keuhkoputkentulehdusta tai keuhkokuumetta. Vakavimmillaan tauti johtaa monielinvaurion kautta kuolemaan. Tautiin ei ole olemassa varsinaista hoitokeinoa [1]. COVID-19 levisi Wuhanista, Kiinasta 2019 vuoden lopulla. Virus levisi ympäri maailman ja Suomesta se löytyi ensimmäisen kerran tammikuun 2020 lopulla. WHO julisti taudin pandemiaksi 11. maaliskuuta 2020. [2.]

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) asiantuntijamikrobiologiayksikkö toimii Suomen SARS-CoV-2-viruksen diagnostiikan referenssilaboratoriona. Kaikki Suomessa toimivat COVID-19-diagnostiikkaa pystyttävät laboratoriot lähettävät THL:lle viisi ensimmäistä positiivista ja kymmenen ensimmäistä negatiivista näytettä varmistustestiin.

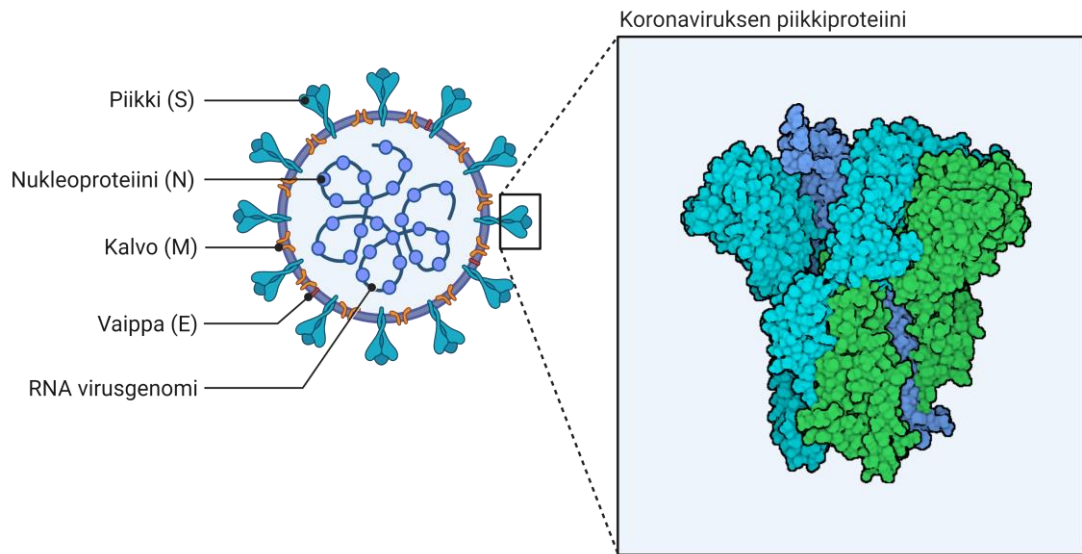
Opinnäytetyö toteutettiin THL:n asiantuntijamikrobiologiayksikössä. Yksikkö aloitti COVID-19-primääridiagnostiikan Suomessa otetuista näytteistä maaliskuussa 2020. Laboratoriodiagnostiikka toteutettiin RT-qPCR-menetelmällä. Primääridiagnostiikkaa varten yksikköön hankittiin uusia RNA-eristyslaitteita ja diagnostiikkaan tarkoitettuja laboratoriolaitteita. Työn tavoitteena oli arvioida uusien laitteiden soveltuvuutta COVID-19-diagnostiikkaan vertaamalla niiden analyttistä herkkyyttä, käyttökustannuksia ja käytettävyyttä suurilla näytemäärillä.

2 Koronavirukset

2.1 Yleistä koronaviruksista

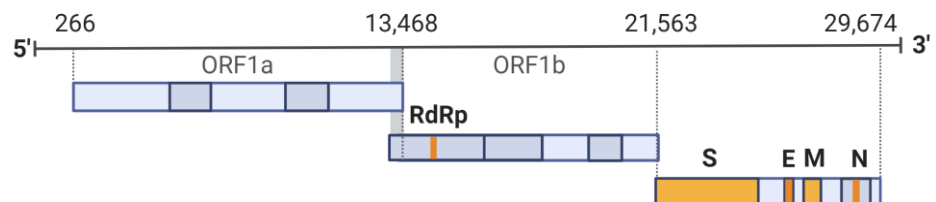
Koronavirukset ovat vaipallisia RNA-viruksia, jotka kuuluvat *Coronaviridae*-heimoon. Koronaviruksen viruspartikkeli eli virioni on pyöreä ja sen halkaisija on 80 – 150 nm. Koronavirus on saanut nimensä kruunumaisista ulokkeistaan [3, s. 213]. Koronavirukset aiheuttavat yleisiä sairauksia eläimissä ja ihmisissä [4, s. 541]. Koronaviruksen genomi on yksijuosteinen positiivissäikeinen RNA (+ sense RNA), joka on noin 27-30 kb pitkä. Positiivinen RNA toimii suoraan lähetti-RNA:na (mRNA) ja se voi tartuttaa alttiita isäntäsoluja jopa ilman virusproteiinien läsnäoloa [5, s. 82–83].

Koronavirus (kuva 1) koostuu proteiineista, jotka suojaavat sen RNA:ta ja mahdollistavat viruksen tunkeutumisen isäntäsoluun. Viruksen RNA-genomin ympärillä on nukleokapsidi fosfoproteiini N, joka on pitkä, helikaalinen ja joustava RNA:ta suojaava proteiini. Virionin pinnalla on kolme glykoproteiinia: S-piikkiproteiini, E-vaippaproteiini ja M-membraaniproteiini. S-glykoproteiini muodostaa virionin pinnalle terälehtimäisiä piikkejä, joilla virus kiinnittyy isäntäsolun spesifisen glykoproteiinin reseptoriin [4, s. 542–544]. E-glykoproteiinin tehtäviä ovat virionin lipidikaksoiskalvon muodostaminen ja vapauttaminen isäntäsolusta. E-proteiinin on myös arveltu vaikuttavan SARS-viruksen patogeenisyyteen [6, 2019]. Glykoproteiini M on tärkeä osa virionin kuoren muodostamisessa [4, s. 544].



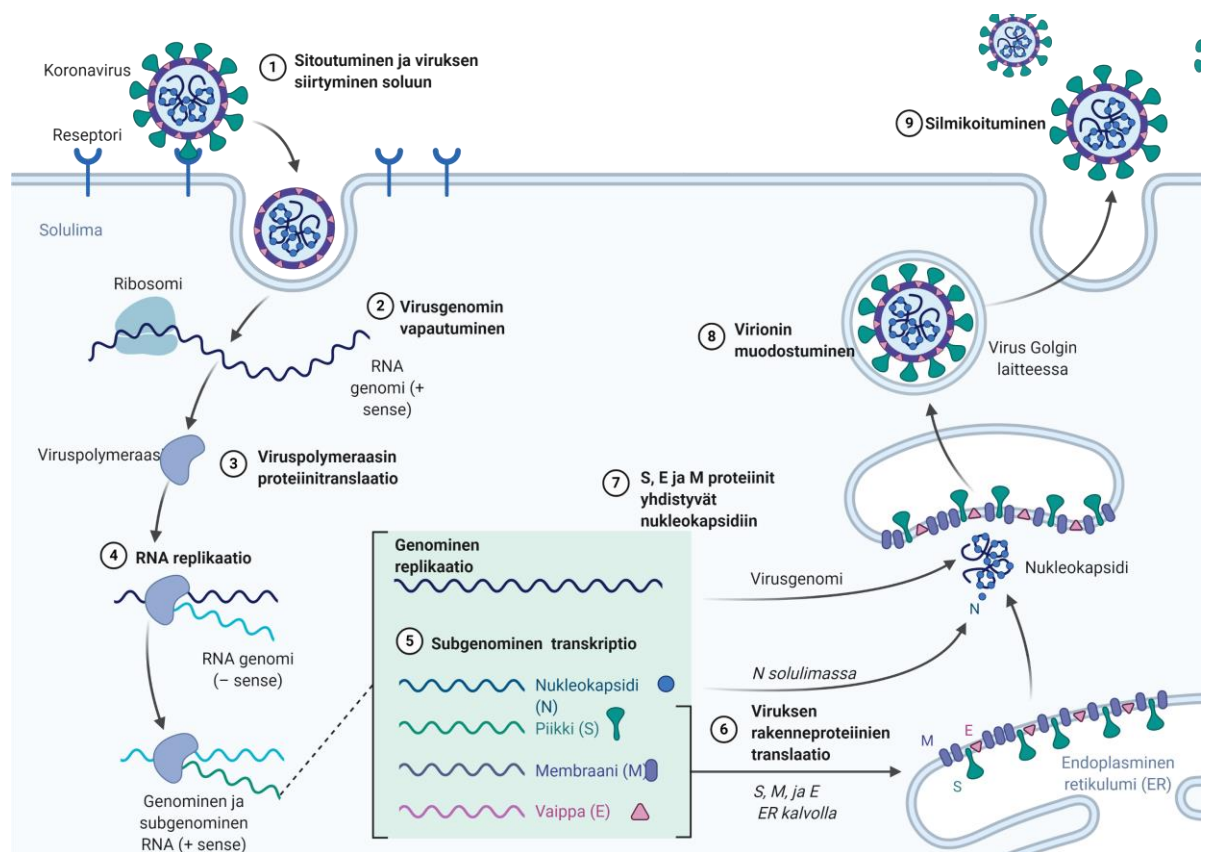
Kuva 1. Koronaviruksen rakenne koostuu S-, N-, M- ja E-proteiineista. Kuva tehty BioRenderillä. [4, s. 544].

Viruksen genomi (kuva 2) koodaa nukleoproteiinin ja glykoproteiinien lisäksi replikaatioon tarvittavia komponentteja, kuten replikaatiota katalysoivan RNA-replikaasin (RdRp). Viruksen genomi sisältää kaksi päällekkäistä avointa lukukehystä (ORF), ORF1a ja ORF1b. [4, s. 548.]



Kuva 2. SARS-CoV-2 genomi on noin 30 000 emäsparia pitkä. Genomi sisältää muun muassa RdRp-, S-, E-, M- ja N-geenialueet. Kuva tehty BioRenderillä. [4, s. 548.]

Virusen replikaatio tapahtuu isäntäsolun sisällä kuvan 3 mukaisesti. Replikaation ensimmäinen vaihe on virionin kiinnittyminen piikkiproteiinin avulla alttiin isäntäsolun spesifisen glykoproteiinin reseptoriin. Virioni tunkeutuu soluun endosytoosin avulla, jolloin virionin ja solun kalvot sekoittuvat ja mahdollistavat virusen genomien vapautumisen solulimaan. Virusgenomin replikaatio alkaa genomien translaationa, jonka tuloksena genomien eri osat prosessoidaan erillisiksi entsyymeiksi ja proteiinirakenteiksi subgenomina transkriptiona. Virus käyttää isäntäsolun toimintoja entsyymien ja proteiinien valmistamisessa. Virusgenomin positiivissäikeinen RNA transkriptoidaan negatiivissäikeiseksi RNA templaatiksi, josta syntetisoidaan positiivissäikeinen virus mRNA ja genomien RNA. [4, s. 546–549.]



Kuva 3. Koronaviruksen replikaatio tapahtuu alttiin isäntäsolun sisällä. Kuva tehty BioRenderillä. [4, s. 546-552.]

Tarvittavien proteiinien tuottamisen jälkeen alkaa virionin kokoaminen. Glykoproteiinit S, E ja M siirtyvät endoplasmakalvostoon. Endoplasmakalvostossa proteiinit siirtyvät eritysureittia pitkin Golgin laitteeseen, jossa ne kapseloituvat virusgenomin sisältävän N-

proteiinin ympärille. Valmis virioni siirtyy solukalvolle ja vapautuu solusta silmikoitumalla solukalvon läpi, jolloin virioni saa päälleen lipidivaipan. [4, s. 550–552.]

2.2 Ihmisen koronavirukset

Neljä endeemistä ihmisen koronavirusta HCoV-229E, -NL63, -OC43 ja -HKU1 aiheuttavat noin 20 % ihmisten hengitystieinfektioista. Alphakoronavirusten HCoV-229E ja -NL63 epäillään siirtyneen ihmiseen lepakoista. Betakoronavirukset HCoV-OC43 ja -HKU1 ovat todennäköisesti lajiutuneet jyrsijöihin liittyvistä viruksista. Ihmisen koronavirukset aiheuttavat tyypillisesti lievän infektion ylemmissä hengitysteissä, mutta virus voi levitä myös alempiin hengitysteihin, jolloin virus voi aiheuttaa keuhkoputkentulehduksen tai keuhkokuumeen. Yleisimmin vakavamman sairauden sairastava on pieni lapsi tai henkilö, jolla on heikentynyt immuunijärjestelmä. Edellä mainittujen neljän yleensä lievän hengitystieinfektion aiheuttavan koronaviruksen lisäksi esiintyy myös vakavan, jopa kuolemaan johtavan taudin aiheuttavia ihmisen koronaviruksia SARS-CoV, MERS-CoV, ja SARS-CoV-2. [7.]

2.3 SARS-CoV

SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) on zoonoottisen koronaviruksen aiheuttama tauti, joka levisi epidemiaksi vuosina 2002 – 2003 [8, s. 4]. Tauti lähti liikkeelle Kiinasta Guangdongin alueelta 2002 vuoden lopulla ja levisi kevään kuukausien aikana Kaakkois-Aasian alueella ja Kanadan kiinalaisyhteisön sisällä. Taudin epäillään tarttuneen ihmiseen Kiinassa ruoaksi käytetyistä sivettikissoista, joissa on todettu leviävän samantyyppistä koronavirusta. SARS sairastutti maailmanlaajuisesti noin 8 500 ihmistä, joista noin 9,5 % kuoli, yli 60-vuotiailla potilailla kuolleisuus oli yli 50 %. [9.]

SARS tarttuu pisaratartuntana nenän, suun tai silmien limakalvojen kautta. Taudin itämisaika on tyypillisesti 4 – 5 vuorokautta, mutta joissain tapauksissa itämisaikan on havaittu olevan vain yksi päivä (7 tapausta) ja pisin itämisaika on ollut 14 päivää [8, s. 7]. Taudin tyypilliset alkuroinit ovat korkea kuume, päänsärky ja lihaskivut, ja pitkään jatkueksaan tauti aiheuttaa keuhkokuumeen, jonka seurauksena osa potilaista vaatii hengityskonehoitoa. Taudin leviämistä ehkäistään potilaiden ja heidän kanssaan lähikontaktissa olleiden eristämällä muista ihmisistä. Taudin levinneisyysluvun on arvioitu

olleen noin 3 pahimman epidemian aikaan ($R_0 = 3$). Tauti osoitetaan reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä potilaan nenänielusta tai ulosteesta otetusta näytteestä [8, s. 1, 9; 9.]

2.4 MERS-CoV

MERS (Middle East respiratory syndrome) on Lähi-idästä lähtöisin oleva zoonoottisen koronaviruksen aiheuttama hengitystieinfektio. Laboratoriovarmistettuja tautitapauksia on havaittu 2 449 vuodesta 2012 alkaen kesäkuuhun 2019 asti, joista 21 % on ollut oireettomia. 84 % tautitapauksista on todettu Saudi-Arabiassa, mutta tauti on todettu yhteensä 27 eri maassa. Tautiin on kuollut 34,5 % sairastuneista. MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-coronavirus) tarttuu ihmiseen tautia sairastavasta kamelistä. Virus pystyy tarttumaan ihmisestä toiseen rajoitetusti. Suurin osa ihmisten välisistä tartunnoista on tapahtunut Saudi Arabiassa sairaanhoidossa henkilöillä, jotka ovat olleet läheisessä kontaktissa MERS-potilaiden kanssa. Tauti ei ole kuitenkaan aiheuttanut varsinaista epidemiaa, ja sen leviämiskertoimen arvellaan olevan alle 1 ($R_0 = 0,50$). [10, s. 1; 9.]

MERS-taudinkuva on hyvin samankaltainen SARS-taudin kanssa. Taudin itämisaika on 3 – 14 päivää, jonka jälkeen hengitystieinfektion oireet alkavat. Osa potilaista sairastaa taudin oireettomana, mutta osalla tauti aiheuttaa vakavia oireita, kuten keuhkopöhön tai hengitysvaikeuksia ja osalla tapauksista tauti johtaa kuolemaan maksan ja munuaisten lopettaessa toimintansa. Taudin vakavuuteen vaikuttavat potilaan korkean iän lisäksi perussairaudet, kuten diabetes, korkea verenpaine tai sydänsairaudet, nostavat kuolleisuutta huomattavasti. [9.]

Akuutin MERS-tautitapauksen laboratoriodiagnostiikka tehdään WHO:n suosituksen mukaan nukleinihapon osoitustestillä. Näytteestä monistetaan MERS-viruksen E- tai N-geenialuetta RT-PCR:llä. Positiivisista näytteistä voidaan tehdä varmistustesti RdRp- tai N-geenialueella RT-PCR:llä. Viruksen on havaittu käyttävän keuhkoputken ja keuhkorakkuloiden epiteelisoluissa olevaa dipeptidyylipeptidaasi 4:ää solureseptorina. MERS-CoV lisääntyy ihmisen alahengitysteissä, joten näytteet tulisi ottaa alahengitysteistä tai nenänielusta. MERS-tartunnalle on kehitetty useita serologisia vasta-ainetestejä. Vasta-ainetestit eivät kuitenkaan sovellu diagnostiikkakäyttöön vaan ovat enemmän tutkimuskäytössä. [11, s. 1–5.]

2.5 SARS-CoV-2

COVID-19 on SARS-CoV-2-viruksen aiheuttama hengitystieinfektio, joka levisi pandemiaksi vuoden 2020 keväällä. Joulukuun 2019 lopulla Wuhanissa Kiinassa raportoitiin tuntemattoman etiologian keuhkokuumeetapauksia. Tammikuun alussa Kiinan tautienhäikäisy- ja valvontakeskus CDC tunnisti taudinaiheuttajaksi uuden koronaviruksen ja tauti sai nimekseen COVID-19, Corona virus disease 2019. SARS-CoV-2 on läheistä sukua betakoronavirukselle SARS-CoV. [12.]

SARS-CoV-2-virus voi siirtyä ihmiseen aerosolin tai kontaminoituneen esineen välityksellä. Virus tunkeutuu hengitysteiden tai ruoansulatuskanavan epiteelisoluihin piikkiproteiininsa avulla angiotensiini(II)-reseptorin (ACE2) kautta. COVID-19-taudin itämisaika vaihtelee yhdestä päivästä neljääntoista mediaanin ollessa 5-6 päivää [13]. Taudinkantajan arvioidaan levittävän tautia noin kaksi päivää ennen oireiden alkua [14]. Potilaiden oireet kestävät tyypillisesti lievässä taudissa kahdeksan päivää. Vakavissa tapauksissa oireet kestävät pidempään ja ovat voimakkaimmillaan kaksi viikkoa tartunnan jälkeen. Osa tartunnan saaneista sairastaa taudin oireettomana. Oireettomien sairastajien on epäilty olevan suuri syy taudin leviämässä [15]. Taudin leviämiskertoimen arveltiin olevan Euroopassa ennen eristystoimia alueesta riippuen $R_0 = 2-4$ [12].

COVID-19-taudin oireita ovat kuume, yskä, kurkkukipu, yleinen heikkous, hengenahdistus, nuha ja ripuli. Noin 10 – 30 % varmistetuista tapauksista vaatii sairaalahoitoa, joista osa vaatii tehohoitoa. Vakavat tautitapaukset voivat johtaa vakavien hengitystieoireiden, kuten keuhkoputkentulehduksen lisäksi verisuonitauteihin, sydänlihaksen vaurioitumiseen, rytmihäiriöihin, sydämen laajentumiseen ja sydämen vajaatoimintaan [12]. COVID-19-taudin vakavuuteen liittyy olennaisesti potilaalla olevat aikaisemmat perussairaudet [9].

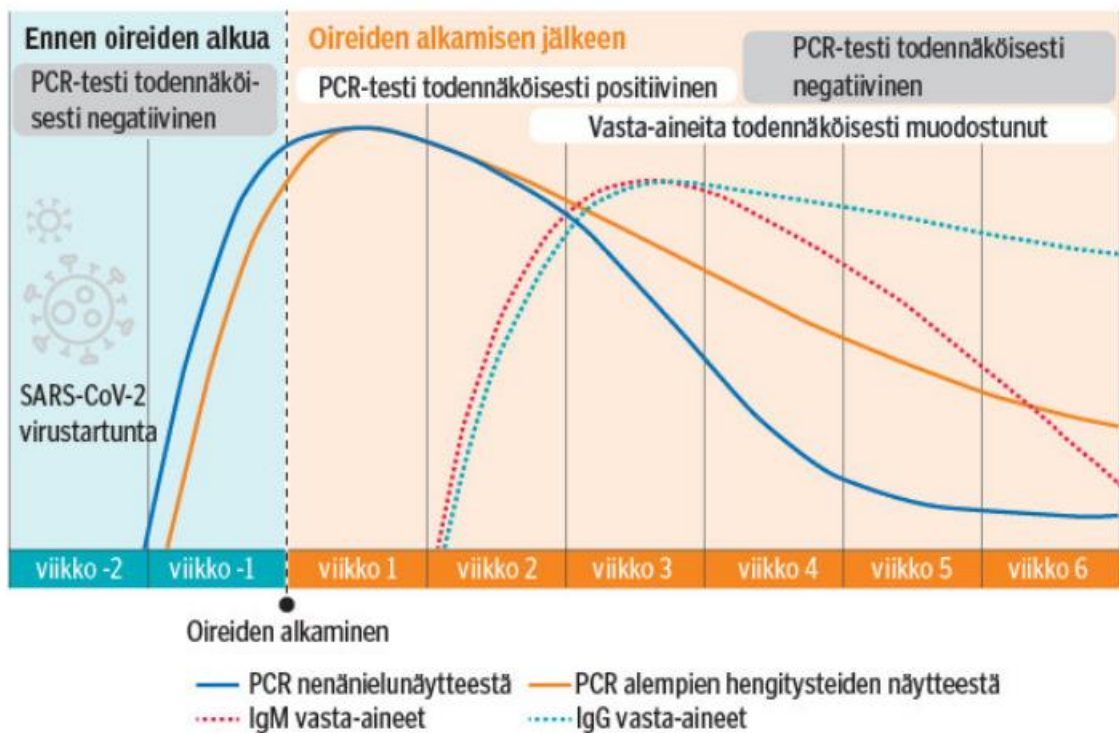
3 COVID-19-taudin laboriodiagnostiikka

3.1 Yhteenveto diagnostisista testeistä

Laboriodiagnostiikan tarkoituksena on varmistaa mahdolliset tartunnat, jolloin tartunnan saaneet voidaan eristää muista ja katkaista tartuntaketjut. Diagnostiikkaan käy-

tetään taudin aiheuttaman viruksen nukleiinihappojen osoittamiseen perustuvia PCR-testejä. Suomessa käytettävä PCR-testi on WHO:n suosittelema ja kansainvälisesti vakiintunut testi, jonka herkkyys on 95 %, eikä ristireaktiota tyypillisten kausikoronavirusten kanssa ole havaittu. Diagnostisia testejä tehdään toimiluvallisissa klinisen mikrobiologian laboratorioissa omavalmisteisena in-house-testinä tai käyttöön hyväksytyillä kaupallisilla PCR-testeillä. [16.]

Testauksen tulokseen vaikuttaa olennaisesti näytteenoton oikea-aikaisuus ja oikea tekniikka. Näyte otetaan näytteenottotikulla nenänielun takaosan limakalvon pinnalta, jotta epiteelisoluja saadaan näytteeseen. Näyte voidaan ottaa myös sylkinäytteenä. Näyte voi olla positiivinen vain, jos se on otettu oikeaan aikaan. Viruksen itämisaikana otettu näyte on negatiivinen, joten testin negatiivinen tulos ei takaa ettei potilas ole saanut tartuntaa. Näyte tulisi ottaa oireiden alkamisen jälkeen, jolloin virusta voi löytyä näytteestä (kuva 4).



Kuva 4. Koronaviruksen osoittaminen PCR-testillä voidaan tehdä viruksen itämisaikan jälkeen viikkojen ajan. [16.]

Potilaasta otetusta verinäytteestä voidaan tehdä vasta-ainetesti, jolla osoitetaan SARS-CoV-2-viruksen vasta-aineita. Testin perusteella arvioidaan, onko potilas saanut COVID-19-tartunnan aiemmin. Vasta-ainetesti on positiivinen infektion jatkuessa pidempään tai vasta parantumisen jälkeen, joten vasta-ainetesti ei sovellu akuutin taudin toteamiseen. [16.]

3.2 Nukleiinihappojen osoitus

Nukleiinihappojen osoitustestillä voidaan monistaa ja tunnistaa kohdeorganismien geenejä. RNA-virusten nukleiinihappojen osoitus tehdään reaaliaikaisella RT-PCR:llä, joka on herkkä ja toistettava diagnostiikkamenetelmä. Nukleiinihappojen osoitustesti koostuu nukleiinihappojen eristämisestä ja kohdegeenien eksponentiaalisesta monistamisesta. [17, s. 1.]

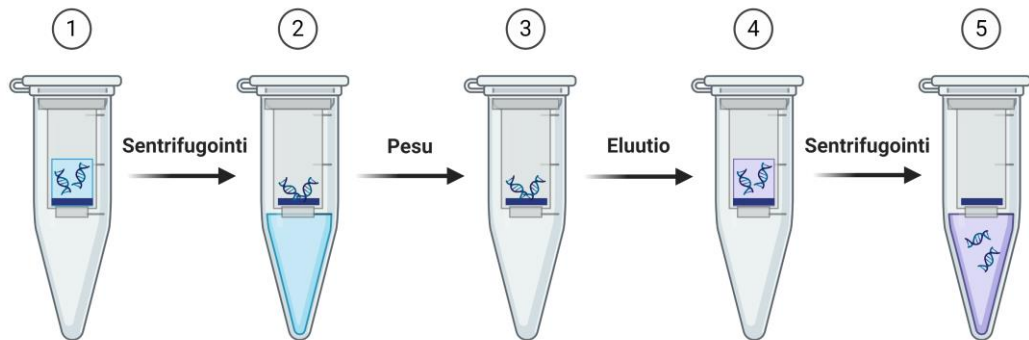
3.2.1 Nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen

Nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen on viruksen geenien monistamisen ensimmäinen vaihe. Nukleiinihappoja voidaan eristää kohdeorganismia sisältävästä biologisesta materiaalista. Ennen eristämistä lähtömateriaalin proteiinit pilkotaan, ”lyysataan”, jolloin nukleiinihapot vapautuvat lyysipuskuriin. Nukleiinihappojen eristämisen tavoitteena on saada talteen mahdollisimman paljon kohde RNA:ta ilman RNA:n pilkkoutumista, samalla poistaen monistumista häiritsevät tai estävät komponentit näytteestä. [17, s. 80; 18.]

Solujen ja kudosten hajottaminen voidaan tehdä mekaanisilla tai kemiallisilla menetelmillä. Kemiallinen solun hajottaminen tehdään lyttisillä entsyymeillä, kaotrooppisilla aineilla ja erilaisilla pesuaineilla. Kaotrooppisten aineiden tärkeä tehtävä on suojata nukleiinihappoa inaktivoimalla nukleaaseja. Mekaaninen hajottaminen voidaan tehdä ultraäänen avulla, puristamalla tai hajottamalla solut pienien metalli- tai lasikuulien avulla. Käytettävä menetelmä valitaan näytetyypin perusteella ja toisinaan paras tulos voidaan saada yhdistelemällä kemiallisia ja mekaanisia menetelmiä. [19.]

Nukleiinihappojen eristämiseen on valmistettu useita kaupallisia laitteistoja ja kittejä. Eristäminen voidaan tehdä spin pylvällä kuvan 4 mukaisesti, jolloin RNA sitoutuu pyl-

väässä olevaan silikakalvoon. RNA pestään kolonnissa, jonka jälkeen RNA eluoidaan pylväästä putkeen. [17. s 80–81.]

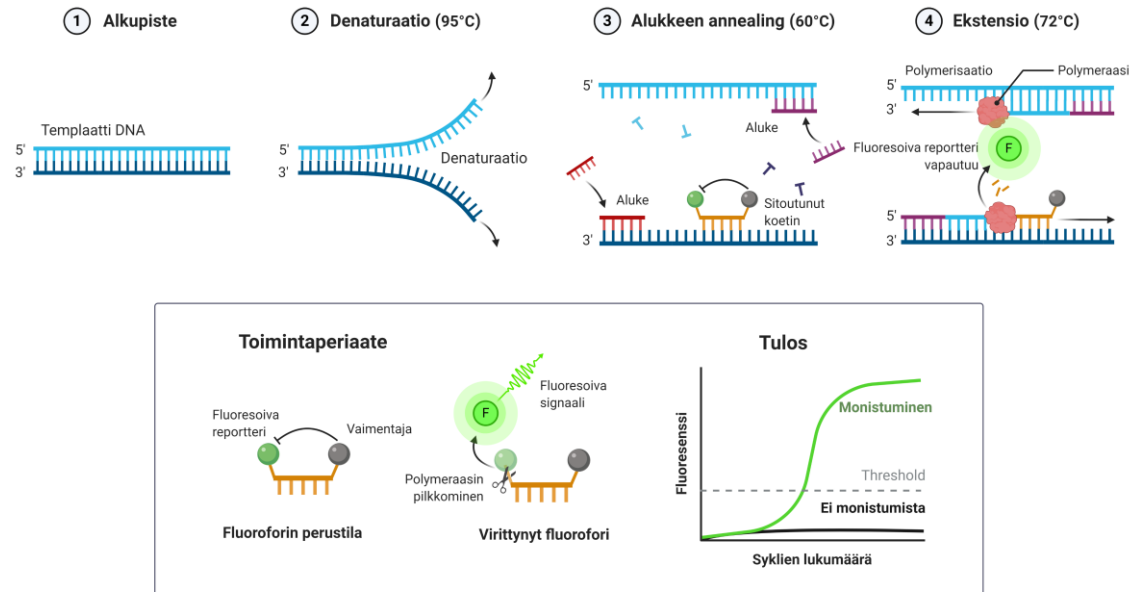


Kuva 5. Silikapylväsmenetelmässä nukleinihappo sidotaan silikapylvääseen, pestään ja eluoidaan. Kuva tehty BioRenderillä. [18.]

Nukleinihappojen puhdistaminen magneettisesti perustuu nukleinihappojen sitoutumiseen mikrokokoisiin magneettipartikkeleihin. Magneettipartikkelit ovat yleensä paramagneettisia, eli ne ovat magneettisia vain ulkoisen magneettikentän vaikutuksen alaisena. Magneettipartikkelit on yleensä päällystetty laajan pinta-alan omaavalla nukleinihappoja sitovilla materiaalilla, kuten siloksaaneilla. Näytteessä olevat nukleinihapot sitoutuvat magneettipartikkelin pintamateriaaliin, jolloin nukleinihappoja voidaan puhdistaa ja eluoida hellävaraisesti ilman sentrifugointia. [20].

3.2.2 RT-qPCR

RT-qPCR:n (reverse transcription polymerase chain reaction) tarkoitus on monistaa kohdegeeniä (templaattia) ja havaita sen monistuminen reaaliaikaisesti ja kvantitatiivisesti. Monistettava templaatti on yksijuosteinen RNA, josta tuotetaan komplementaarinen DNA (cDNA) käänteiskopioinnin (RT) avulla. Käänteiskopioinnin jälkeen cDNA monistetaan entsyymaattisesti polymeerasiketjureaktiolla (PCR). RT-qPCR voidaan toteuttaa yksivaiheisella One-Step- tai kaksivaiheisella Two-Step-menetelmällä. Kohteen monistuminen tunnistetaan reaaliaikaisesti spesifisen alukkeiden ja koettimien avulla kuvan 6 mukaisesti. [17, s. 156.]



Kuva 6. Fluoresoivaan reportteriin perustuvan qPCR:n toimintaperiaate. Vaimennin estää fluoresenssin syntymisen. Koettimen kiinnittyttyä templaattiin DNA-polymeraasi pilkkoo koettimen ekstensiassa ja fluorofori vapautuu, jolloin syntyy detektoitavaa fluoresenssiä. Kuva tehty BioRenderillä. [17, s. 16.]

RT-qPCR:n monistumista mitataan templaattiin sitoutuvalla koettimella. Koetin on kohdegeenille spesifinen, eli se kiinnittyy sekvenssiin vain, jos näytteessä on tavoiteltua tuotetta. Koettimena käytetään yleensä hydrolyysiin hajoavaa oligonukleotidia, jossa on toisessa päässä fluorofori ja toisessa päässä vaimennin. Menetelmä perustuu fluoresenssi resonanssi energiansiirtoon (FRET), jossa fluoroforin emittoima fotoni detektoitavan fluoresenssin sijaan siirtyy vaimenninmolekyylisiin. Kun koettimena toimiva oligonukleotidi hybridisoituu templaattiinsa, DNA-polymeraasin nukleasiaktiivisuus hajottaa koettimen, jolloin fluorofori irtoaa vaimentimesta. Fluoresenssin intensiteetti voidaan mitata, kun vaimennin ei enää estä fluoroforin lähettämää fluoresenssia. [17, s. 16.]

Reaaliaikaisen RT-PCR:n edistymistä seurataan fluoresenssin muutoksen avulla. Fluoresenssin muutos esitetään syklien määrän funktiona. Monistumiselle määritetään C_q-arvo (Quantification cycle), jossa fluoresenssikäyrä ylittää kynnyksarvon (threshold). Kynnyksarvoksi määritetään sellainen arvo, joka ylittää aina taustakohinan fluoresenssin. Näytteet, joiden fluoresenssiarvo nousee logaritmisesti kynnyksarvon yli, sisältävät kohdegeeniä, eli ovat positiivisia. Näytteet joiden arvo jää kynnyksarvon alapuolelle, tulkitaan negatiivisiksi. [17, s. 9.]

4 Työn tavoitteet

THL:n asiantuntijamikrobiologiayksikkö osallistui Suomen COVID-19-diagnostiikan kapasiteetin nostoon hankkimalla ja ottamalla käyttöön uusia laboratoriolaitteita.

Työn tavoitteena oli varmistaa uusien eristys- ja diagnostiikkalaitteiden soveltuvuus COVID-19-epäilynäytteiden testaukseen. Erityisesti tavoitteena oli selvittää kolmen uuden eristyslaitteen kyky eristää viruksen RNA käyttämällä laboratorion referenssimenetelmän reagensseja, jotta näytteen esikäsittely voitaisiin tehdä samalla protokollalla kaikille COVID-19-epäilynäytteille. Laitteiden herkkyyttä arvioitiin laimennossarjan avulla. Lisäksi yksi uusista laitteista oli täysin automaattinen pikatestauslaite, ja sen suorituskykyä arvioitiin tutkimalla diagnostiikkaan saapuvia näytteitä rinnakkain sekä uudella laitteella että referenssimenetelmällä.

Työn tavoitteena oli myös määrittää laboratorion kapasiteetti uusien laitteiden käyttöönoton jälkeen. Kapasiteetin arviointia varten vertailtiin eri menetelmien materiaalikustannuksia ja laitteilla tehtävään rutiininomaiseen työhön kulunutta aikaa.

5 Työssä käytetyt laitteet ja menetelmät

Työssä vertailtiin viittä eri laitetta ja menetelmää COVID-19-epäilynäytteiden analysointiin. Työssä vertailtavat laitteet on esitetty taulukossa 1. Kolme laitteista oli nukleiinihappojen eristysautomaatteja. Laitteilla eristetyistä RNA:sta tehtiin RT-qPCR-analyysi in-house-menetelmällä BioRadin CFX96-qPCR-laitteella. Kaksi laitteista, NeuMoDx ja QIAstat-Dx olivat täysin diagnostiikkaan kehitettyjä, ja ne kykenivät eristämään RNA:n ja tekemään RT-qPCR-analyysin itsenäisesti. Laitteilla käytettiin valmistajan suosittelemia viruksen RNA:n eristämiseen tarkoitettuja kittejä, ja kaikilla laitteilla käytettiin eri kittiä.

Taulukko 1. Työssä käytettiin viittä eri laitetta, joille kaikille käytettiin eri kittiä RNA:n eristykseen. Osa laitteista teki näytteille pelkän RNA-eristuksen ja osa teki näytteille myös qPCR analyysin.

Laite	Kitti	Tuotekoodi	Eristää RNA:n	qPCR	RNA talteen
Qiagen QIAcube Connect	RNeasy® Mini Kit	74104	Kyllä	ei	Kyllä
Perkin Elmer chemagic360	chemagic Viral DNA/RNA Kit special H96	CMG-1033-S	Kyllä	ei	Kyllä
Qiagen QIASymphonySP/AS	QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit	937055	Kyllä	ei	Kyllä
NeuMoDx™ 96 Molecular Systems	LDT Primer/Probe Strip, LDT Master Mix, RNA	100400, 310100	Kyllä	Kyllä	ei
Qiagen QIAstat-Dx	QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel	691214	Kyllä	Kyllä	ei

Menetelmiä vertailtiin viruksen tunnistusherkkyyden, työskentelyajan ja menetelmän kustannusten perusteella. Viruksen tunnistamista varten valmistettiin laimennossarja SARS-CoV-2-positiivisesta näytteestä.

Kittien protokollat muutettiin laboratorion referenssimenetelmän mukaisiksi. Kittien lyysispuskurina käytettiin RNeasy Mini Kitissä tulevaa RLT-lyysispuskuria kittien mukana tulevan lyysispuskurin sijaan. Myös näytteen ja lyysispuskurin määrä muutettiin RNeasy Mini Kitin mukaiseksi. QIAstat-Dx:n ja QIAcuben testit tehtiin täysin kitin protokollan mukaisesti.

5.1 Bio- ja työturvallisuus

Näytteet, joiden epäiltiin sisältävän SARS-CoV-2-virusta käsiteltiin aina vähintään BSL-2:n eli bioturvaluokka kahden laboratoriossa. SARS-CoV-2 voi säilyä infektiivisenä pahvi- ja kuparipinnoilla useita tunteja. Virus voi säilyä infektiivisenä pinnoilla, jotka ovat valmistettu muovista tai ruostumattomasta teräksestä jopa useita päiviä [21]. Näytteet käsiteltiin aina bioturvakaapissa, jota pestiin säännöllisesti virusproteiinit denaturoivalla 2 til-%:n klorillilla ja 70 til-%:n etanolilla, joka inaktivoi lipidivaipalliset virukset [22]. Bioturvakaapissa työskenneltäessä pidettiin kaksinkertaisia suojakäsineitä ja hihansuojuksia [23]. Viruksen inaktivointi tehtiin guanidiiniisotiosyanaattia sisältävällä RLT-lyysispuskurilla, jonka on osoitettu inaktivoivan koronaviruksia [24].

RNeasy Mini Kitissä (QIAGEN, 74104) käytettiin β -merkaptotoetanolia (Sigma, CAS 60-24-2) proteiinien denaturoimiseen ja erityisesti RNA:ta hajottavien RNAaasien inakti-

voimiseen. β -merkaptopetanoli on myrkyllistä hengitettynä ja joutuessaan iholle. Yhdiste on syövyttävää ja haitallista nieltynä [25]. β -merkaptopetanoli sekoitettiin RLT-puskuriin ilmastoidussa vetokaapissa nitrilihanskoilla suojautuneena. Lyysatut näytteet eristettiin automatisoiduissa laitteissa, jotka eivät olleet vetokaapin sisällä. Eristystä varten putket täytyi avata, jolloin β -merkaptopetanolin voimakas haju levisi huoneeseen, vaikka laboratoriotilojen ilmastointi on säädetty tehokkaaksi.

5.2 Laimennossarjan valmistaminen

Laitteiden suorituskyvyn vertailu toteutettiin analysoimalla huhtikuussa 2020 tullutta SARS-CoV-2-positiivisesta näytteestä tehtyä laimennossarjaa kaikilla vertailussa olevilla laitteilla. Positiivisen näytteen alkuperäinen C_q-arvo oli 15,66 ja siitä valmistettiin kymmenkertainen laimennossarja 10^{-1} – 10^{-9} . Laimennokset valmistettiin fosfaattipuskuroituun keittosuolaliuokseen (PBS, Gibco PBS, pH 7,2, Ref 20012027, erä 2066547). Analyysien yhdenmukaisuuden varmistamiseksi jokainen laimennos jaettiin 30 näytteen erään ja erät pakastettiin säilytyslämpötilassa -70 °C:ssa ennen RNA-eristystä.

Laimennossarjasta otettiin kahdesta vahvimmassa laimennoksesta 10^{-1} ja 10^{-2} yhden näytteet ja kolme rinnakkaista näytettä 10^{-3} – 10^{-9} laimennetuista näytteistä eristettäväksi jokaiselle laitteista. Eristyksessä käytettiin jokaisella menetelmällä näytteiden inaktivointiin ja lyysaukseen RLT-lyysipuskuria (QIAGEN, RLT Lysis Buffer, Ref 79216, erä 166011063), johon oli lisätty 1 til-% β -merkaptopetanolia (Sigma, 2-merkaptopetanoli, CAS 60-24-2, erä BCCB9882) tehostamaan lyysausta. 350 μ l:aan RLT-puskuria lisättiin 100 μ l näytelaimennosta. RNA-eristykset ja PCR-analyysit toteutettiin välittömästi näytteen lyysaamisen jälkeen.

5.3 PCR-reaktiosekset ja PCR-ohjelma

Työssä käytettiin Cormanin artikkelin mukaisia [26] alukkeita ja koetinta SARS-CoV-2 E-geenin monistamiseen ja detektoimiseen (taulukko 2). Koetin on FAM-leimattu hydrolyysikoetin, jossa on 5'-päässä FAM-leimattu fluorofori ja 3'-päässä vaimennin.

Taulukko 2. Työssä käytettävät SARS-CoV-2 E-geenin alukkeet ja koetin olivat Cormanin artikkelin mukaiset [26].

Oligonukleotidi	Sekvenssi	Pituus (emästä)	PCR tuotteen koko
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	18	125 bp
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG [5']Fam [3']BHQ-1	20	
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	20	

PCR-työssä etenemissuunta oli aina puhtaimmasta työstä likaisempaan kontaminaatio-riskin vähentämiseksi. Ensimmäiseksi valmistettiin alukkeista, koettimesta ja nukleasivapaasta vedestä koostuva E-geenin oligoseos taulukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3. E-geenin oligoseos valmistettiin nukleasivapaasta vedestä sekä koettimesta ja alukkeista.

Komponentti	Tilavuus (µl)	Pitoisuus (µM)
Nukleasivapaa vesi	965	
E_sarbeco_P1 100 µM	7	0,7
E_sarbeco_F1 100 µM	14	1,4
E_sarbeco_R2 100 µM	14	1,4
yhteensä	1000	

Työn RT-qPCR toteutettiin yksivaiheisena. Menetelmän mastermix-reagenssina käytettiin CDC:n testaamaa ja suosittelemaa Quantabio qScript® XLT One-Step RT-qPCR ToughMix® -mastermixiä [27]. Taulukossa 4 on esitetty työssä käytetty reaktioseos. Kokonaistilavuudeltaan 25 µl:n reaktioseos sisälsi 12,5 µl Quantabio 2x qScript® XLT One-Step RT-qPCR ToughMix® -mastermixiä, 7,5 µl E-geenin oligoseosta ja 5 µl eristettyä RNA:ta.

Taulukko 4. RT-qPCR-reaktioseos.

Komponentti	Tilavuus (µl)
Quantabio 2x qScript® XLT One-Step RT-qPCR ToughMix®	12,5
E-geenin oligoseos	7,5
Eristetty RNA	5
yhteensä	25

RT-qPCR-laitteena käytettiin BioRad CFX96 Touch -laitetta. Työssä käytettiin taulukon 5 mukaista yksivaiheista RT-PCR-menetelmää.

Taulukko 5. Työssä käytetty PCR-ohjelma BioRadin CFX96 –laitteella.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
RT (käänteiskopiointi)	55	20 min
Aktivaatio	95	3 min
Denaturaatio x 45	95	15 s
Annealing/Ekstensio x 45	58	1 min

RT-qPCR:n positiivisena kontrollina käytettiin laimennettua SARS-CoV-kontrollia ja negatiivisena kontrollina käytettiin nukleasivapaata vettä.

5.4 QIAGEN QIAcube Connect

Qiagen QIAcube Connect (kuva 7) on nukleiinihappojen eristykseen ja puhdistukseen tarkoitettu eristysautomaatti. Laite sisältää robottikäden, sentrifugin, lämmitettävän ravistelijan ja automaattisen pipetointijärjestelmän. QIAcuben eristyskitit perustuvat spin-kolonneihin ja menetelmä on sama kuin manuaalisesti tehtävässä spin-kolonnieristyksessä. Näytteet lysataan sekoittajassa, jonka jälkeen lysaatit siirretään sentrifugissa olevaan spin-kolonneihin. Nukleiinihapot sitoutuvat kolonnissa olevaan silikageelikalvoon, jossa ne pestään epäpuhtauksista. Robottikäsi siirtää spin-kolonnin sentrifugissa olevaan eluutioputkeen, johon nukleiinihapot eluoidaan RNAasi-vapaalla vedellä. [28.]



Kuva 7. Uuden sukupolven QIAcube Connectissa on suuri kosketusnäyttö, jolla laitetta käytetään.

Laboratorion referenssimenetelmä oli QIAcube valmistettu kaupallinen RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74104), jonka tehtävänä oli puhdistaa ja eristää totaali-RNA eläinsoluista ja -kudoksista. Biologiset näytteet lyysattiin ja homogenisoitiin kitin mukana tulevalla RLT-puskurilla, joka sisälsi RNAaasi inaktivoivaa guanidiinitiosyanaattia. Laitteen protokolla lisäsi näytteisiin etanolia sitoutumisolosuhteiden parantamiseksi, jonka jälkeen näyte siirrettiin spin kolonniin. RNA sitoutuu spin kolonnin silikageelikalvoon RLT-puskurissa olevien guanidiinin kaatrooppisten suojojen vaikutuksesta. Kolonnissa epäpuhtaudet pestiin pois ja RNA elutoitiin kitin mukana tulevalla RNAaasi vapaalla vedellä. [29, s. 9.]

RNeasy Mini Kitin menetelmää käytettiin pohjana kaikkiin muihin menetelmiin työturvallisuuden ja näytteiden esikäsittelyn sujuvuuden takia. Uusien laitteiden menetelmät muokattiin siten, että näytteet pystyttiin valmistamaan jokaiselle laitteelle samalla esikäsittelymenetelmällä. RNeasy Mini Kitissä näytteen esikäsittelyvaiheessa 100 µl näytettä pipetoitiin 350 µl RLT-puskuria sisältävään putkeen, koska määrän oli tutkittu inaktivoivan SARS-koronavirus [24].

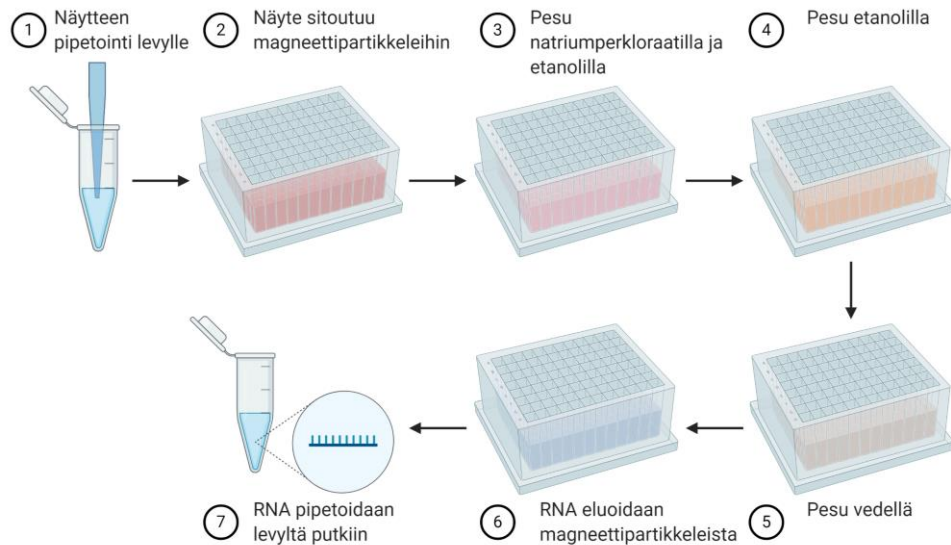
5.5 PerkinElmer chemagic™360

PerkinElmer chemagic™360 (kuva 8) on magneettipartikkeleihin perustuva nukleiinihappoja eristävä laite. Chemagic 360 -yksikössä on magneettisauvapää, elektromagneetti, pyörivä taso reaktioastioille, integroitu näyttö ja hallintayksikkö. Laitteella käytettävät puskuriliuokset säilytetään laitteen ulkopuolella, josta ne imetään laitteeseen pumppuihin yhdistettyjen letkujen avulla. [30.]



Kuva 8. PerkinElmer chemagic™360 on puoliautomaattinen nukleiinihappojen eristyslaite.

Reaktioastioina käytettiin Ritter Riplate®SW 2ml 96-kuoppaisia syväkuoppalevyjä. Näytteiden eristäminen tapahtui kuvan 9 mukaisesti. Lyysipuskurissa olevat näytteet pipetoitiin käsin syväkuoppalevyille. Eristysohjelman käynnistyksen jälkeen laite siirsi magneettipartikkelit näytteen sisältävälle syväkuoppalevyille. Näytteen nukleiinihapot sitoutuivat magneettipartikkeleiden pinnalla olevaan materiaaliin, ja magneetit kiinnittyivät magneettisauvoihin elektromagneetin vaikutuksesta. Magneettisauvat siirsivät magneettipartikkelit eristyksen jokaisessa vaiheessa uuteen reaktioastiaan, eivätkä magneettipartikkeleihin sitoutumattomat epäpuhtaudet siirtyneet partikkeleiden mukana. Magneettipartikkelit kävivät läpi kolme pesuvaihetta: ensimmäinen pesu tehtiin natriumperklooraattilla ja etanolilla, toinen pesu tehtiin etanolilla ja kolmas pesu tehtiin vedellä. Lopuksi viimeisessä astiassa magneettipartikkeleihin sitoutunut RNA irrotettiin partikkeleista eluutioliuksella. RNA pipetoitiin reaktioastiasta putkeen käsin. [30.]



Kuva 9. Näytteen RNA:n eristäminen chemagic360-laitteella tehdään magneettisauvojen avulla. Näyte siirtyy magneettipartikkeleihin sitoutuneena levyltä toiselle automaattisesti käyden läpi kolme pesuvaihetta ja eluutiovaiheen. Lopuksi puhdistettu ja eristetty RNA-eluuaatti pipetoidaan putkeen manuaalisesti. Kuva tehty BioRenderillä. [30.]

RNA-eristystä varten käytettiin chemagic Viral 300 DNA/RNA -kittiä (PerkinElmer, CMG-1033-S). Kitin menetelmää muokattiin alkuperäisestä referenssimenetelmän mukaiseksi. Kitin menetelmän mukaan syväkuoppalevyllä pipetoitiin

- 300 µl näytettä
- 4 µl chemagic kitin poly(A) RNA:ta
- 10 µl chemagic kitin proteinaasi K:ta
- 300 µl chemagic kitin Lysis Buffer 1:tä.

Referenssimenetelmää mukailen työssä pipetoitiin syväkuoppalevyille:

- 100 µl näytettä
- 150 µl PBS-liuosta
- 350 µl RLT-puskuria (QIAGEN, 79216).

Kuoppalevyille pipetoitiin 150 µl PBS-liuosta, jotta alkuperäinen 600 µl:n näytemäärä saavutettaisiin. Poly(A) RNA ja proteinaasi K jätettiin näytteestä pois, koska niiden ei aikaisempien testien perusteella havaittu aiheuttavan merkittävää vaikutusta eristykseen tulokseen.

5.6 QIAGEN QIASymphony SP/AS

QIAGEN QIASymphony SP eristää ja puhdistaa nukleiinihapot automaattisesti silika-päälystettyjen magneettipartikkelien avulla. QIASymphony AS pipetoi eristetyn nukleiinihapon PCR-reaktioseokseen. Laitteita voidaan käyttää integroituna kokonaisuutena, jolloin SP eristää nukleiinihapon ja siirtää sen AS-moduuliin PCR-pipetointia varten. Laitteita voidaan myös käyttää itsenäisinä yksiköinä. Laitteisto koostuu kahdesta toisiinsa yhteydessä olevasta kaapista (kuva 10). QIASymphony SP:ssä on lyysausase- ma, robotittarrain, 4-kanavainen pipetointijärjestelmä ja magneettisauvat. Laitteessa voidaan eristää kerrallaan 96 näytettä 24 näytteen erissä. Eristys tapahtuu täysin automaattisesti pipetointijärjestelmän avulla. QIASymphony SP:n näytteen valmisteluun kuuluu 4 päävaihetta: näytteen lyysaus, nukleiinihappojen sitoutuminen magneettipartikkeleiden pintaan, nukleiinihappojen pesu ja eluointi. Qiagen valmistaa laitteelle RNA:n genomisen DNA:n sekä virusten ja bakteerien nukleiinihappojen eristämistä varten kyttejä. [31, s. 50, 97.]



Kuva 10. QIASymphonySP/AS koostuu eristys- ja PCR-pipetointi-moduuleista.

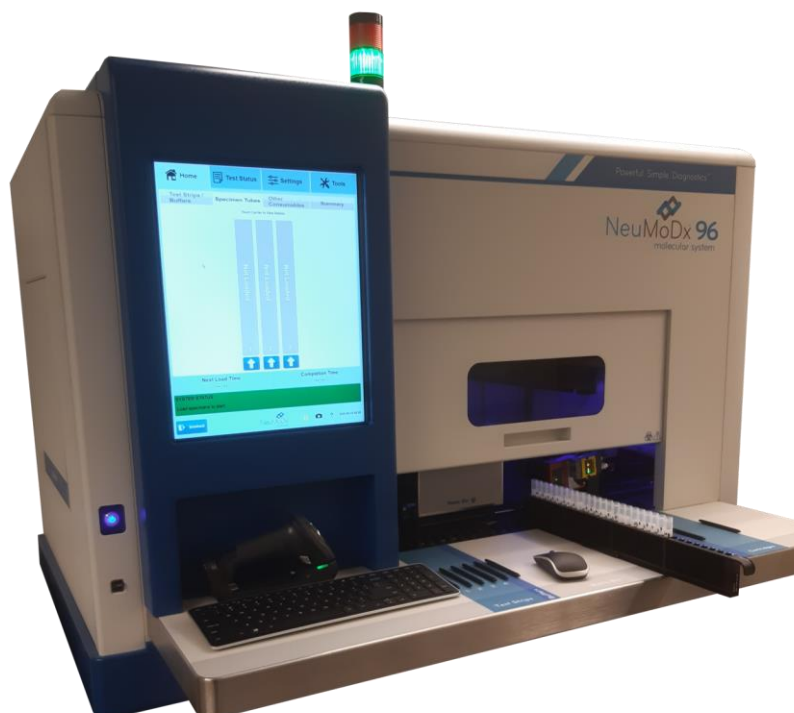
Työn menetelmässä käytettiin QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi -kittiä (QIAGEN, 937055). Kitti on tarkoitettu DNA ja RNA virusten sekä bakteerien virusten nukleiinihappojen eristämiseen ja puhdistukseen. Kitiin protokollassa eristettävä näyte pipe-

toidaan näyteputkesta esikäsitteilyampulliin, jossa näyte lyysataan. Lyysatun näytteen sekaan pipetoidaan magneettipartikkelit, joihin nukleiinihapot sitoutuvat. Magneettisauva kerää magneettipartikkelit sylinteriampullista ja siirtää ne toiseen sylinteriampulliin, joka sisältää pesupuskuria. Lopuksi puhdistetut nukleiinihapot eluoiitiin magneettipartikkeleista. [31, s. 50, 97.]

Työssä käytetyssä menetelmässä näytemateriaalina käytettiin samaa, kuin referenssimenetelmässä, eli 100 µl näytettä ja 350 µl RLT-puskuria. Menetelmänä käytettiin QIA-symphony SP/AS integroitua ajoa, joten laite teki nukleiinihappojen eristämisen jälkeen PCR-pipetoinnin samoilla tilavuuksilla kuin referenssimenetelmässä tehdään käsin.

5.7 NeuMoDx™ 96 Molecular System

NeuMoDx™ 96 Molecular System (kuva 11) on in vitro -diagnostiikkaan (IVD) tai laboratorion kehittämien nukleiinihappotestien (LDT) tekemiseen tarkoitettu laitteisto. Laitteisto pystyy uuttamaan ja eristämään nukleiinihapot automaattisesti erilaisista näytematriiseista. Laite monistaa ja tunnistaa kohdenukleiinihapposekvenssit reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Testeissä käytetään laitteen valmistajan toimittamia tarvikkeita ja reagensseja, sekä LDT-testeissä käyttäjän omia alukkeita ja koettimia. Laitteelle voidaan määrittää kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia testejä. [32, s. 21.]



Kuva 11. NeuMoDx™ 96 Molecular System pystyy eristämään ja analysoimaan 96 näytettä kerrallaan.

NeuMoDx käyttää lämmön, lyyttisten entsyymien ja eristysreagenssien yhdistelmää solujen hajottamiseen, RNA-eristykseen ja inhibiittoreiden poistamiseen. Solujen hajoituksessa vapautuvat nukleiinihapot kiinnittyvät magneettisiin mikropartikkeleihin, jotka siirretään NeuMoDx™ Cartridge -kasettiin. Mikropartikkelien mukana tulleet kiinnittymättömät ja epäspesifisesti kiinnittyneet komponentit pestään pesuliuksella, jonka jälkeen mikropartikkeleihin kiinnittynyt RNA eluoidaan eluutioliuksella ja sekoitetaan käyttäjän valmistelemiin alukkeisiin ja koettiin. RNA, aluke ja koetinseos siirretään lyofilisoidun MasterMixin sisältävälle NeuMoDx LDT MasterMix –testiliuskalle, jossa seos rehydroi MasterMixin. MasterMix-testiliuska sisältää one-step qRT-PCR:ään tarvittavat reagenssit ja sisäisen kontrollin. Kohde RNA-sekvenssin ja sisäisen kontrollin monistuminen tapahtuu kasetin PCR-kammiossa. Sisäinen kontrolli on leimattu hydrolyysiin perustuvalla TaqMan®-koettimella. [33, s. 1–2.]

Työssä luotiin NeuMoDx testiprotokolla SARS-CoV-2-viruksen E-geenin monistumisen havaitsemiseksi. Protokollassa määritettiin koettimen fluoresointikanava, huipun vähimmäiskorkeus, eli raja-arvo, syklien minimi ja maksimimäärä sekä päättymispisteen vähimmäisfluoresenssi. Samat arvot määritettiin myös sisäiselle kontrollille. Taulukossa

6 on esitetty SARS-CoV-2 E-geenin tunnistamista varten luodun protokollan määrytykset.

Taulukko 6. NeuMoDx:n PCR-ohjelman E-geenin koetin havaittiin vihreällä FAM-kanavalla ja sisäinen kontrolli keltaisella HEX-kanavalla. Laitteen PCR-ohjelmalle asetettiin taulukossa kuvatut arvot E-geenille ja sisäiselle kontrollille monistumisen tunnistamiseksi.

Alue	E-geeni	Sisäinen kontrolli
Raportointi (nm)	Vihreä (470/510)	Keltainen (530/555)
Huipun vähimmäiskorkeus	1250	1000
Huipun vähimmäisjakso	10	25
Huipun enimmäisjakso	40	40
Kynnysarvo	1250	1000

NeuMoDx:n PCR-ohjelma oli mikrofluidiikan ansiosta huomattavasti tavanomaista PCR:ää nopeampi, yhden denaturaatio ja annealing-syklin kesto oli alle 30 sekuntia. Työssä käytetty PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. NeuMoDx:n PCR-ohjelman lämpötilaohjelma oli CFX96-laitteen ohjelmaa lyhyempi.

PCR-ohjelman vaihe	Lämpötila	Aika
RT	50	15 min
Inaktivaatio	95	4 min
Denaturaatio x 45	95	6 s
Annealing x 45	60	19 s

Testiä varten valmistettiin taulukon 6 mukaan Primer/Probe-testiliuskat SARS-CoV-2 E-geenille. Testiliuskalle tehtiin koettimesta, alukkeista ja vedestä oligoseos, joka pipetoiitiin Primer/Probe-testiliuskan jokaiseen kuoppaan.

Taulukko 8. E-geenin oligoseos valmistettiin nukleasivapaasta vedestä sekä E-geenin alukkeista ja koettimesta.

Komponentti	Tilavuus (µl)	Pitoisuus (µM)
Nukleasivapaa vesi	4,5	
E_sarbeco probe 10 µM	0,5	0,71
E_sarbeco fwd primer 10 µM	1	1,43
E_sarbeco rev primer 10 µM	1	1,43
yhteensä	7	

Laitteella testattiin laimennossarjan näytteet muista laitteista poiketen käyttämällä Nun-cin 4,5 ml:n CryoTubes -putkia laitteen näytetelineestä johtuen.

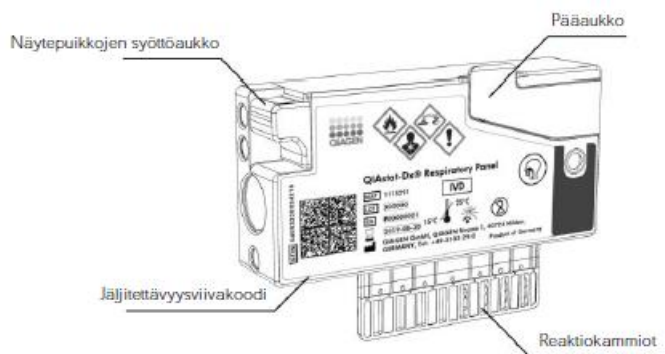
5.8 QIAGEN QIAstat-Dx Analyzer

QIAGEN QIAstat-Dx Analyzer -analysaattori (kuva 12) perustuu reaaliaikaiseen PCR-tunnistukseen molekyyliagnostisten näytekasettien avulla. Laite koostuu yhdestä käyttömoduulista, johon voidaan liittää yhdestä neljään analyysimoduulia. Analyysimoduulit ovat itsenäisiä yksiköitä, joiden toimintaa ohjataan käyttömoduulilta. Jokainen analyysimoduuli voi analysoida yhtä näytekasettia kerrallaan. Käyttömoduulissa on laitteen käyttämistä varten kosketusnäyttö ja näytteiden viivakoodeja sekä kasettien tunnistusta varten viivakoodinlukija. [34, s. 15.]



Kuva 12. QIAstat-Dx-laitteistoa ohjataan kosketusnäytön avulla. Kuvan laitteessa on kaksi analyysimoduulia.

Analyysi toteutetaan syöttämällä näyte QIAstat-Dx-kasettiin (kuva 13) ja asettamalla kasetti laitteen analyysimoduuliin. Näytematriisi voi olla kuiva nenänielutikkunäyte tai Universal Transport Mediumiin (COPAN, 333C) liuotettu näyte. Yhdessä kasetissa voidaan analysoida yhtä näytettä kerrallaan. Näytekasetti sisältää sisäisen kontrolliin ja multiplex-PCR-testiin tarvittavat reagenssit reaktiokammioissa lyofilisoituneena.



Kuva 13. QIAstat-Dx-näytekasetissa tapahtuu nukleiinihappojen eristys ja amplifikaatioreaktio. [35, s. 18]

Sisäisenä kontrollina QIAstat-Dx SARS-CoV-2 Panel käyttää titrattua bakteriofaagi MS2:ta, joka on positiivisäikeinen yksijuosteinen RNA-virus. Sisäinen kontrolli on kasetissa kuivatussa muodossa ja se rehydroituu näytteen asettamisen yhteydessä. Sisäinen kontrolli käy läpi kaikki samat vaiheet, kuin näyte. Testin jälkeen laite kertoo sisäisen kontrollin onnistumisen ja Cq-arvon tuloksen analyysin jälkeen. [35, s. 19.]

Analyysimoduuli tekee testikasetissa nukleiinihappojen-eristuksen ja reaaliaikaisen multiplex-RT-PCR-testin automaattisesti testikasetin suljetussa järjestelmässä. QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel tunnistaa SARS-CoV-2-viruksen lisäksi 22 muuta hengitystietaudinaiheuttajaa (taulukko 9). [35, s. 15–17.]

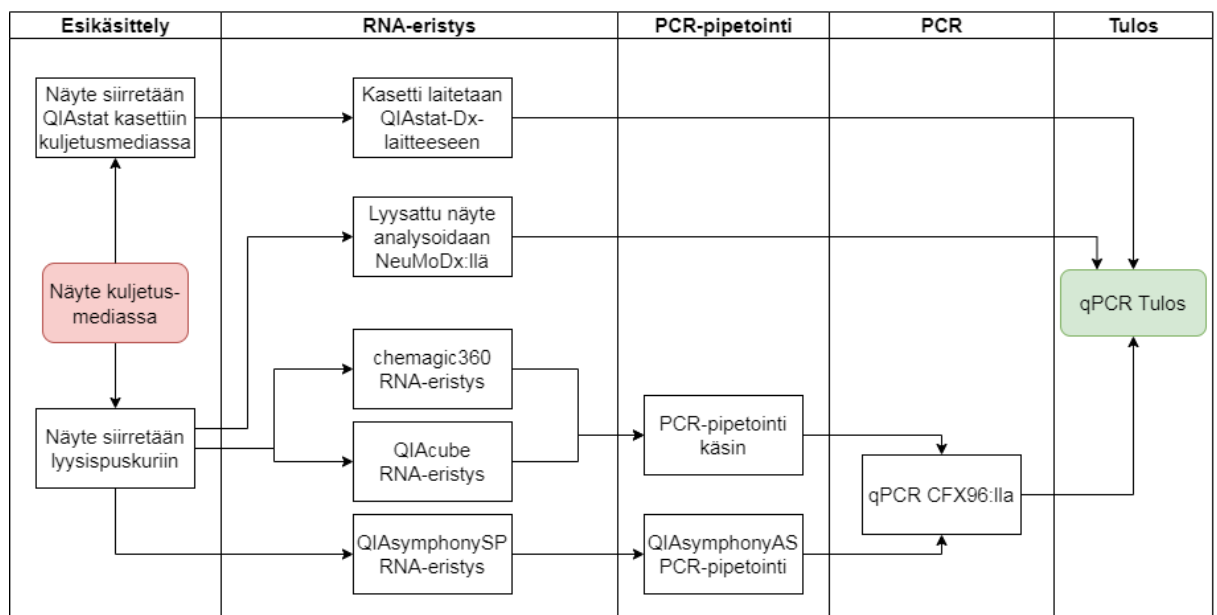
Taulukko 9. QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel pystyy tunnistamaan 23 patogeenia. Enterovirus ja rhinovirus detektoidaan, mutta tulos ei ole selektiivinen. [35, s. 7]

Respiratory SARS-CoV-2 Panelin tunnistamat patogeenit	
Influenssa A	Parainfluenssavirus 1
Influenssa A, alityyppi H1N1/2009	Parainfluenssavirus 2
Influenssa A, alityyppi H1	Parainfluenssavirus 3
Influenssa A, alityyppi H3	Parainfluenssavirus 4
Influenssa B	Respiratorinen synsytiaalivirus A/B
Koronavirus 229E	Ihmisen metapneumovirus A/B
Koronavirus HKU1	Adenovirus
Koronavirus NL63	Bokavirus
Koronavirus OC43	Mycoplasma pneumoniae
SARS-CoV-2 (2019-nCoV)	Legionella pneumophila
Rhinovirus/Enterovirus	Bordetella pertussis

Näytteen solut lyysataan mekaanisesti ja kemiallisesti guanidiinitiosyanaatilla, jonka jälkeen nukleiinihapot puhdistetaan kalvomenetelmällä. Puhdistettu nukleiinihappo sekoituu lyofilisoituun Master Mixiin ja liuottaa sen. Nukleiinihappo ja Master Mix seos siirretään ennaltamääritellyin alikvottein eri reaktiokammioihin, joissa tapahtuu reaaliaikainen multiplex-RT-PCR. Kohdeanalyyttien läsnäoloa ja monistumista seurataan fluoresenssin lisääntymisellä kussakin reaktiokammiossa. Analyysin jälkeen käyttömoduuli ilmoittaa jokaisen patogeenin testin tuloksen ja ilmoittaa mahdollisen positiivisten tulosten ja sisäisen kontrollin Cq-arvon. [35, s. 17.]

6 Työn tulokset

QIAcube Connectia, chemagic™360:tä, QIASymphonySP/AS:ää, NeuMoDx:ää ja QIAstat-Dx:ää vertailtiin toisiinsa. Eri laitteiden menetelmien työnkulku on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14. NeuMoDx:llä ja QIAstat-Dx:llä näytteille tehtiin RNA-eristys ja qPCR itsenäisesti. QIASymphonySP/AS:llä tehtiin RNA-eristys ja PCR-pipetointi 96-kuoppaformaatin PCR-stripeille. QIAcube Connectilla ja chemagic™360:lla näytteille tehtiin RNA-eristys, jonka jälkeen eristetty RNA pipetoitiin PCR-reaktioseokseen käsin. QIAcubella, chemagic360:llä ja QIASymphonyllä eristetyt RNA:t monistettiin CFX96 qPCR-laitteella.

QIAstat-Dx erosi muista laitteista siten, että kuljetusmediassa olevaa näytettä ei siirretty lyysispuskuriin vaan näyte syötettiin näytekasettiin kuljetusmediassa. Laite eristi näytteen nukleiinihapot ja suoritti reaaliaikaisen PCR:n automaattisesti. Kaikkien mui-

den vertailtavien laitteiden menetelmissä näyte siirrettiin RLT-lyysispuskuriin ennen seuraavaa vaihetta. NeuMoDx teki lyysatusta näytteestä RNA-eristuksen ja reaaliaikaisen PCR:n automaattisesti. Muut vertailtavat laitteet erikoistuivat nukleiinihappojen eristämiseen ja puhdistamiseen. Chemagic360:n ja QIAcuben eristämä RNA pipetoitiin reaaliaikaisen PCR:n reaktioseokseen käsin, kun taas QIASymphonyn eristämä RNA pipetoitiin laitteen PCR-pipetointiin erikoistuneella moduulilla. Kaikkien eristyslaitteiden eristetyt RNA:n monistettiin BioRadin CFX96 qPCR -laitteella.

6.1 Herkkyys

Laitteiden suorituskykyä vertailtiin niiden kyvylä eristää, monistaa ja havaita kohdegeeni näytteestä. Herkkyttä testattiin laimennossarjan avulla. Jokaisesta näytelaimennoksesta testattiin kolme rinnakkaista näytettä. Taulukossa 10 on listattu jokaisen eristys- ja diagnostiikkalaitteen suoriutuminen testistä. Laimennossarjan tuloksien Cq-arvot ovat listattu liitteeseen 1. Positiiviseksi luettiin näytteet, joiden fluoresenssi ylitti kynnyksarvon.

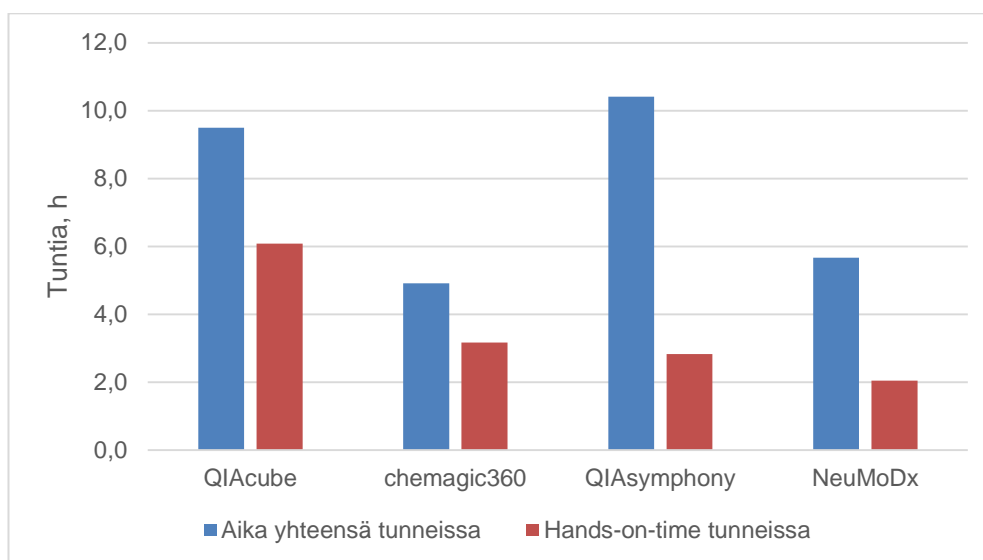
Taulukko 10. Laimennossarja testattiin jokaisella laitteella kolmella rinnakkaisella näytteellä. Chemagic360 oli testin herkin kykenemällä monistamaan 10^{-6} -laimennoksen kaikki kolme näytettä. Mikään testin laitteista ei monistanut havaittavasti 10^{-7} -laimennosta.

Laimennos	Havaitut monistumiset				
	QIAcube	chemagic360	QIASymphony	NeuMoDx	QIAstat
10^{-3}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-4}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-5}	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3
10^{-6}	2/3	3/3	0/3	0/3	2/3
10^{-7}	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Herkimmäksi laitteeksi osoittautui PerkinElmer chemagic360, joka onnistui monistamaan 10^{-6} -vahvuisen laimennoksen kaikki kolme rinnakkaista näytettä. Qiagen QIAcube Connect ja QIAstat-Dx monistivat kaksi kolmesta rinnakkaisesta näytteestä 10^{-6} laimennoksella. NeuMoDx onnistui monistamaan ja tunnistamaan kaikki kolme 10^{-5} laimennoksen näytettä, myös 10^{-6} laimennoksen näytteet monistuiivat eksponentiaalisesti, mutta niiden fluoresenssiarvot jäivät selvästi asetettujen raja-arvojen alle, jolloin tulos tulkittiin negatiiviseksi. QIASymphonyllä eristetyistä näytteistä kohdegeeni onnistuttiin havaitsemaan vain 10^{-4} ja sitä vahvemmissa laimennoksista.

6.2 Työaika

Laitteiden tehokkuutta arvioitiin vertailemalla 96 näytteen analysoinnin kestoa lyysispuskuriin siirretystä näytteestä qPCR-tuloksen saamiseen. Kuvassa 15 on esitetty sinisellä analyysiaika 96 näytteen tuloksen kokonaiskestosta ja punaisella analyysin hands-on-time, eli kuinka pitkään työntekijä edistää analyysiä aktiivisesti. QIAcuben ja chemagic360:n eristämät RNA:t siirrettiin eppendorf-putkissa PCR-templaatinlisäys huoneeseen, jossa jokaisen näytteen RNA lisättiin MasterMixiä sisältävään PCR-putkeen käsin. Valmiit PCR-putket siirrettiin CFX96 qPCR-laitteeseen, jolla ajettiin kahden tunnin pituinen PCR-ohjelma. QIASymphony pipetoi PCR-mastermixin ja templaatti RNA:n automaattisesti, joten käyttäjä vain siirsi valmiit PCR-putket PCR-laitteeseen ja käynnisti ohjelman. Liitteessä 2 on esitetty tarkemmat arviot analyysien eri vaiheiden kestoista. QIAstat-Dx:n työaika ei vertailtu muihin laitteisiin, sillä laite ei sovellu massatestaukseen.



Kuva 15. Analyysin kesto 96 näytteelle tunneissa. Kesto on arvioitu lyysispuskuriin siirretystä näytteestä qPCR-tuloksen saamiseen. Sininen palkki kertoo testin kokonaiskeston ja punainen palkki työntekijän aktiivisen hands-on-ajan.

Laboratorion referenssimenetelmänä käytetyn QIAcuben näytekapasiteetti 12 näytteellä kerrallaan oli selvä rajoittava tekijä. Näytteiden eristysprosessi oli melko nopea 30 minuutin kestolla, mutta se myös satoi käyttäjän operoimaan laitteella usein ja näytteiden eristäminen vaati suhteellisen paljon käsityötä. 96 näytteen analyysiin tarvittiin kahdeksan 12 näytteen eristystä. Yhteensä aikaa kului 96 näytteen eristykseen yli 9 tuntia, josta noin 6 tuntia käyttäjä teki aktiivisesti töitä.

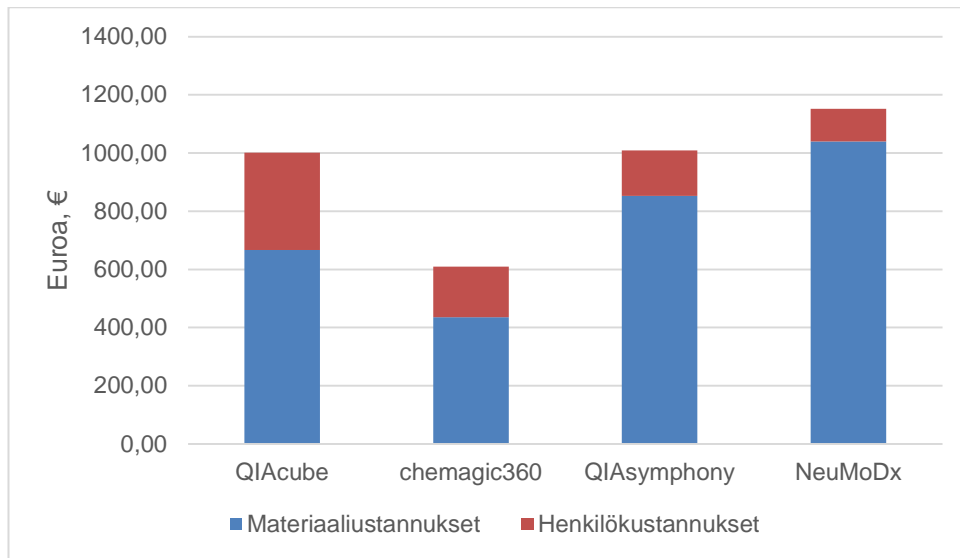
Chemagic360 kykenee eristämään 96 näytettä kerrallaan 65 minuutin eristysprotokollalla. Laitteen käyttö vaati paljon käsityötä, sillä jokainen näyte pipetoitiin erikseen kuoppalevyille. Käsien tehtävään pipetointiin ja RNA:n säilytysputkien merkitsemiseen kului huomattava määrä aikaa; käytännössä 96 näytteen eristyksen koko aika kului RNA-eluutioputkien merkkaamiseen.

QIASymphony mahdollistaa 96 näytteen eristyksen kerrallaan 24 näytteen erissä. Yhden erän eristyksen kesto oli noin 2 tuntia, ja kokonaiskestoksi 96 näytteen eristykseksi ja PCR-analyysille tuli yli 10 tuntia, josta käyttäjän aktiivista aikaa oli alle kolme tuntia.

NeuMoDx analysoi näytteen automaattisesti lyysatusta näytteestä, jolloin käyttäjän tarvitsi vain valmistella reagenssit, tehdä näytelistaus ja syöttää näytteet laitteeseen. Yhden näytteen analyysiaika oli noin 80 minuuttia, ja laite pystyy analysoimaan noin 18 näytettä tunnissa. Kokonaiskestoksi 96 näytteelle tulisi noin 6 tuntia, josta käyttäjän aktiivista työaikaa olisi kaksi tuntia.

6.3 Käyttökustannukset

Laitteiden käyttökustannuksia arvioitiin laskemalla materiaalikustannuksiksi jokaisen näytteen ja testin tarvitsema määrä reagensseja ja välineitä yhteen ja henkilökustannuksiksi laitteen vaatima aktiivinen työaika kerrottuna keskimääräisellä tutkimusanalytiikon tuntipalkalla, johon oli lisätty sosiaalikulut. Tuntipalkaksi määriteltiin 55 €. Laitteiden käyttökustannukset 96 näytteen analyysille on esitetty kuvassa 16. Käyttökustannuksiin ei ole huomioitu laitteiden hankintahintaa. QIAstat-Dx:n käyttökustannuksia ei verrattu muihin laitteisiin, sillä laite ei sovellu massatestaukseen.



Kuva 16. 96 näytteen analysoinnin kokonaiskustannukset koostuvat sinisellä merkityistä materiaalikustannuksista ja punaisella merkityistä henkilökustannuksista.

Laboratorion referenssimenetelmällä QIAcubella eristettynä 96 näytteen analyysin kokonaiskustannukset olivat noin 1 001 €, josta materiaalikustannuksia oli 666,41 € ja henkilökustannuksia 334,58 €. Chemagic360 eristyksellä 96 näytteen analyysin hinnaksi muodostui noin 610 €, josta materiaalikustannuksia oli 435,41 € ja henkilökustannuksia 174,14 €. QIASymphony kokonaiskustannukset 96 näytteen analyysiin oli 1 009 €, josta 852,98 € oli materiaalikustannuksia ja 155,83 € henkilökustannuksia. NeuMoDx:n 96 näytteen analyysin hinta oli 1 152,57 €, josta materiaalikustannuksia oli 1 040,13 € ja henkilökustannuksia 112,44 €.

6.4 QIAstat-Dx:n suorituskyky

QIAstat-Dx pikatestilaitteen Respiratory SARS-CoV-2 -kitin kliinistä suorituskykyä verrattiin THL:n laboratorion käytössä olevaan SARS-CoV-2 referenssimenetelmään tutkimalla diagnostiikkaan saapuvia näytteitä rinnakkain molemmilla menetelmillä. Vertailun tulokset on esitetty taulukossa 11. Yhteensä molemmilla menetelmillä testattiin 67 näytettä.

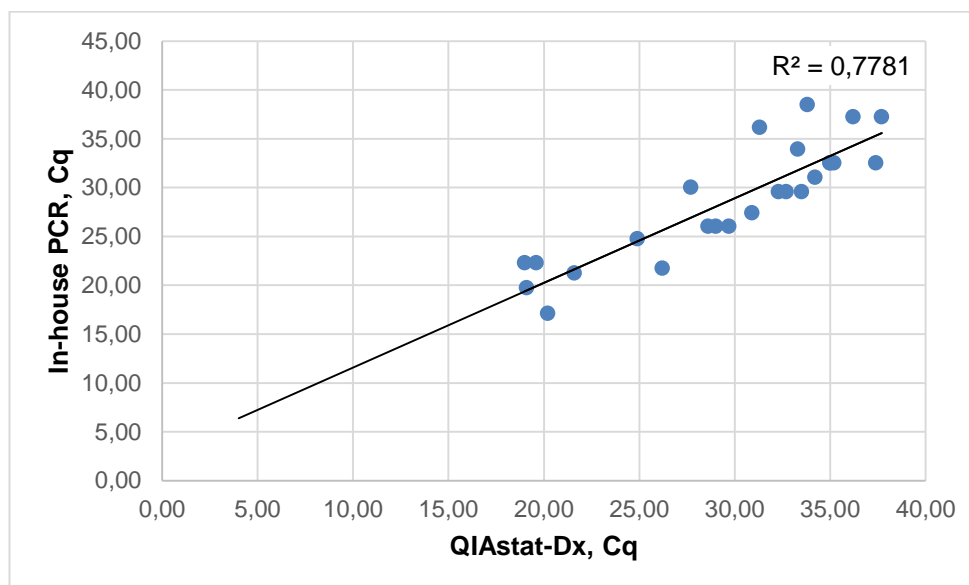
Herkkyys kertoo validoitavan menetelmän kyvyn löytää positiiviset näytteet kaikkien näytteiden joukosta. Herkkyys määritetään laskemalla validoitavalla menetelmällä saattujen positiivisten näytteiden osuus kaikista oikeista positiivisista näytteistä. Respiratory

SARS-CoV-2 -kitin herkkyys referenssimenetelmään verrattuna oli testin perusteella 93 %. Spesifisyys kertoo validoitavan menetelmän kyvyn löytää negatiiviset näytteet kaikkien näytteiden joukosta. Spesifisyys on validoitavan menetelmän negatiivisten osuus kaikista oikeista negatiivisista näytteistä. SARS-CoV-2- kitin spesifisyys referenssimenetelmään verrattuna oli testin perusteella 100 %. [36, s. 38]

Taulukko 11. QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2-kitin tuloksia verrattiin In-house-PCR:n tuloksiin. Kaksi In-house-PCR:llä positiivista näytettä jäi negatiiviseksi QIAstat-Dx:llä. Menetelmien vertailussa testattiin yhteensä 67 näytettä.

	In-house-PCR pos	In-house-PCR neg	yhteensä
QIAstat pos	25	0	25
QIAstat neg	2	40	42
yhteensä	27	40	67
		Herkkyys (%)	92,59
		Spesifisyys (%)	100,0

QIAstat-Dx:n Respiratory SARS-CoV-2 -kitin positiivisten näytteiden Cq-arvoja verrattiin laboratorion referenssimenetelmällä saatuihin Cq-arvoihin (kuva 17). Laitteiden välisten Cq-arvojen korrelaatio oli 0,78.



Kuva 17. QIAstat-Dx:n 25:n analyysin Cq-arvoja verrattiin referenssimenetelmällä saatuihin Cq-arvoihin. Menetelmien välinen korrelaatio on 0,78.

QIAstat-Dx:llä testattiin muista laitteista poiketen laimennossarja vahvimasta laimennoksesta vain 10^{-7} -laimennokseen saakka. Testausta supistettiin testikasettien säätämiseksi.

7 Pohdinta ja yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää THL:n asiantuntijamikrobiologian yksikön uusien eristys- ja diagnostiikkalaitteiden soveltuvuus COVID-19-diagnostiikkaan.

7.1 Luotettavuus

Eri menetelmien herkkyudet olivat lähes yhtä hyvät pois lukien QIASymphonyn herkkyys, joka jäi selkeästi muita heikommaksi. QIASymphonyn eristysmenetelmää tulisi optimoida ennen kuin se voidaan ottaa laboratorion diagnostiikkakäyttöön. Asiantuntijamikrobiologiayksikkö on osallistunut kolmeen kansainväliseen COVID-19-diagnostiikan laatukierrokseen (järjestäjät WHO, ECDC ja QCMD), joissa oli yhteensä 22 SARS-CoV-2-positiivista tai negatiivista näytettä. Näytteiden testaamiseen käytettiin QIACube- ja chemagic360-eristyskäytöksiä ja NeuMoDx:ää. Kaikki tulokset olivat oikein, joten testejä voi pitää luotettavina.

7.2 Laitteistojen vertailun havainnot

Diagnostiikan sujuvuuden kannalta on tärkeää, että kaikissa näytteen esikäsittelyprosessissa työnkulku on samanlainen ja että kaikki ylimääräiset välivaiheet poistetaan. Sujuvuuden varmistamiseksi haluttiin, että näytteet voidaan käsitellä kaikille käytössä oleville laitteille samaa lyysispuskuria ja putkia käyttäen. Työssä sovellettiin laboratorion referenssimenetelmänä toimivaa Qiagenin QIACubelle valmistettua RNeasy-kitin viruseristysprotokollaa muille laitteille. QIACubella voidaan kerrallaan eristää 12 näytettä, mutta käytännössä näytteitä voidaan yhdellä ajolla eristää vain 10, sillä eristysprosessin positiivinen ja negatiivinen kontrolli vievät kaksi paikkaa. Diagnostiikkakäyttöön laitteen kapasiteetti on todella pieni.

Työn tulosten perusteella PerkinElmer chemagic360 -eristysautomaatti soveltuu parhaiten laboratorion tarpeisiin. Laite oli työssä tehtyjen testien mukaan herkin vertailta-

vista laitteista. Laitteen käyttökustannukset olivat myös työssä vertailussa olevista laitteista pienimmät. Laitteessa käytettäviä reagensseja tuotetaan Suomessa, joten niiden saatavuus voi olla kriisitilanteissa parempi, kuin kilpailijoiden. Chemagic360 mahdollistaa suuren näytemäärän eristämisen, mutta puoliautomaattisena laitteena se vaatii myös paljon käsityötä. Jokainen eristettävä näyte pipetoidaan eristyslevylle käsin ja eristetty RNA pipetoidaan levyiltä käsin putkeen. Eristyslaite vaatii optimaaliseen työrhythmiin kaksi työntekijää, jolloin laite saadaan jatkuvaan käyttöön ilman ylimääräisiä katkoksia. Pipetointirobotti voisi myös sujuvoittaa työn kulkua.

Qiagenin QIASymphony SP/AS tarjoaa automaattisen RNA-eristyksen sekä PCR-mastermixin ja laitteella eristettyjen RNA:iden pipetoinnin PCR-levylle täysin automaattisesti. Automaattinen pipetointi soveltuu hyvin diagnostiikkaan ja poistaa pipetoinnin osalta inhimillisen virheen mahdollisuuden kokonaan. Työssä tehtävien testien perusteella laitteen herkkyys käytetyllä protokollalla oli kuitenkin testin heikoin. Protokollaa täytyisi optimoida, jotta laitetta voitaisiin pitää luotettavana COVID-19-diagnostiikassa. Laitteen eristys on myös melko hidas, sillä 24 näytteen erän eristämisessä menee lähes kaksi tuntia. Laitteen AS-moduulin PCR-pipetointimoduuli tuo kuitenkin mahdollisuuden käyttää laitetta PCR-pipetointirobottina. Laite voi pipetoida PCR-mastermixin ja näytteet PCR-levylle, vaikka laitteella ei tekisikään näytteiden eristystä. Diagnostiikka-prosessia voisi optimoida hyödyntämällä laitteen pipetointiautomaatiikkaa.

NeuMoDx 96 Molecular System on täysin diagnostiikkaan kehitetty qPCR-laitteisto, joka tekee näytteiden käsittelyn itsenäisesti. Laite analysoi näytteet nopeasti mikrofluidiikan ansiosta ja työn perusteella menetelmän herkkyys on hyvä. Reagenssien hinta osoittautui testin suurimmiksi ja reagenssien saatavuus on osoittautunut heikoksi. Laitteen kapasiteetti 18 näytettä tunnissa ei riitä diagnostiikkalaboratorion tarpeisiin, mutta laite toimii hyvin tukena kiireellisten näytteiden analysoinnissa. Laite soveltuu huonosti tutkimuskäyttöön, sillä eristettyä RNA:ta ei saa talteen jatkotutkimuksia varten. Laitteen käyttöönotossa oli ongelmia jatkuvien vikojen vuoksi, joista osa johtui viallisista osista.

QIAstat-Dx SARS-CoV-2 Panel on herkkä ja nopea tapa analysoida yksittäisiä kiireellisiä näytteitä. Testi tunnistaa SARS-CoV-2-viruksen lisäksi muitakin hengitystieinfektioita aiheuttavia patogeeneja, joten testi soveltuu todella hyvin esimerkiksi tehohoitopotilaiden näytteiden analysointiin. Testi ei sovellu massadiagnostiikan tarpeisiin äärimmäisen pienestä kapasiteetista ja kalliista hinnasta johtuen. Testi ei säästä eristettyä RNA:ta jatkotutkimuksia varten, joten testi soveltuu vain diagnostiikkakäyttöön.

7.3 THL:n jatkotoimenpiteet

Tätä kirjoittaessa koronapandemia on vielä käynnissä ja kapasiteetin nosto THL:n COVID-19-diagnostiikassa on edelleen ajankohtaista. Työssä tehdyn vertailun perusteella on päätetty investoida kahteen PerkinElmer chemagic360 -eristysautomaattiin. Eri valmistajien laitteita on kuitenkin hyvä olla, sillä reagenssien saatavuudessa saattaa tulla ongelmia, jos näytteitä otetaan paljon. Keväällä 2020 reagenssien ja muiden tarvikkeiden saatavuudessa oli suuria vaikeuksia maailmanlaajuisesti.

QIASymphonyn eristysprotokollaa pitäisi optimoida, jotta laitteen tarjoama lisäkapasiteetti saataisiin laboratorion käyttöön. Laite mahdollistaa lähes automaattisen prosessin käsittelystä näytteestä valmiiksi PCR-seokseksi, eikä se sido työntekijää laitteen pariin pitkäksi aikaa. Optimoituna laite olisi hyvin arvokas diagnostiikassa, jos muut laitteet ruuhkautuvat.

Pipetointirobotin käyttö vähentäisi huomattavasti kontaminaatoriskiä ja inhimillisen virheen mahdollisuutta. Laboratoriossa on käynnistetty QIASymphonyAS:n PCR-pipetointimoduulin käyttöönottoprojekti chemagic360:ssä käytetyille syväkuoppalevyille, mikä vähentäisi olennaisesti eristyksen ja PCR:n käsin pipetointia. Laboratoriossa tehdään parhaillaan vertailua ja kilpailutusta myös muista pipetointiautomaateista, jotka voisivat sujuvoittaa diagnostiikkaa.

THL jatkaa In-house-PCR:n käyttöä diagnostiikkaan kokonaan kaupallisiin kitteihin siirtymisen sijaan, sillä viruksen muuntuessa laboratorio voi tarvittaessa siirtyä nopeasti analysoimaan uusia kantoja muokkaamalla RT-PCR:n oligoja. Kaupalliset kitit eivät kykene vastaavaan ketteryteen monimutkaisten hyväksymisprosessien takia.

Laitteiden soveltuvuus muiden virusten diagnostiikkaan koronapandemian päättymisen jälkeen on hyvä selvittää. Chemagic360 on jo validoitavana muita eristyksiä varten. NeuMoDx tarjoaa mahdollisuuden käyttää omia oligoja testeihin, joten sen käyttömahdollisuudet diagnostiikkaan ovat erittäin laajat.

Lähteet

- 1 Koronavirukset. 2020. Verkkoaineisto. Terveystieteiden tutkimuskeskus. <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/koronavirukset>>. Päivitetty 19.3.2020. Luettu 5.4.2020.
- 2 Timeline of WHO's response to COVID-19. Verkkoaineisto. World Health Organization. <<https://www.who.int/news-room/detail/29-06-2020-covidtimeline>>. Luettu 6.7.2020.
- 3 Lennette, Edwin. 1985. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 4 Fields, Bernard; Knipe, David; Howley, Peter. 1996. Fundamental Virology. Third Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- 5 Cann, Alan. 2016. Principles of Molecular Virology. Sixth Edition. London: Academic Press.
- 6 Schoeman, Dewald; Fielding, Burtram. 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. Verkkoaineisto. Virology Journal. <<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>>. Luettu 22.6.2020.
- 7 Corman, Victor; Muth, Doreen; Niemeyer, Daniela; Drosten, Christian. 2018. Chapter Eight – Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. Verkkoaineisto. Advances in Virus Research. Volume 100. <<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>>. Luettu 23.6.2020.
- 8 Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). 2003. Verkkoaineisto. World Health Organization. <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/70863>>. Luettu 25.5.2020.
- 9 Lumio, Jukka. 2019. SARS ja MERS. Verkkoaineisto. Lääkärikirja Duodecim. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00603>. Luettu 25.5.2020.
- 10 WHO MERS Global Summary and Assessment of Risk. 2019. Verkkoaineisto. World Health Organization. <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/326126>>. Luettu 25.5.2020.
- 11 Laboratory Testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. 2018. Verkkoaineisto. World Health Organization. <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/259952>>. Luettu 25.5.2020.

- 12 Disease background of COVID-19.2020. European Centre for Disease Prevention and Control. Verkkoaineisto. Euroopan tautikeskus ECDC. <<https://www.ecdc.europa.eu/en/2019-ncov-background-disease>>. Luettu 10.6.2020.
- 13 Lauer SA; Grantz KH; Bi Q; Jones FK; Zheng Q; Meredith HR. 2020. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of Internal Medicine*.
- 14 He X; Lau EHY; Wu P; Deng X; Wang J; Hao X. 2020. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*.
- 15 Aguilar JB; Faust JS; Westafer LM; Gutierrez JB. 2020. Investigating the Impact of Asymptomatic Carriers on COVID-19 Transmission. Verkkoaineisto. medRxiv. <<https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20037994>>. Luettu 10.6.2020.
- 16 Savolainen-Kopra, Carita; Melin, Merit. 2020. COVID-19-diagnostiikka ja sen osuvuus. Verkkoaineisto. Lääkärilehti. <<https://www.laakarilehti.fi/tyossa/covid-19-diagnostiikka-ja-sen-osuvuus>>. Luettu 14.7.2020.
- 17 Mackay, Ian. 2007. Real-Time PCR in Microbiology. From Diagnosis to Characterization. London: Caister Academic Press.
- 18 Siun, Chee Tan; Beow, Chin Yiap. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Verkkoaineisto. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <<https://dx.doi.org/10.1155%2F2009%2F5743987/>>. Luettu 4.5.2020.
- 19 Ali, Nasir; Rampazzo, Rita; Costa, Alexandre; Krieger, Marco. 2017. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. Verkkoaineisto. *BioMed Research International*. <<https://dx.doi.org/10.1155%2F2017%2F9306564>>. Luettu 4.5.2020.
- 20 Berensmeier, Sonja. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 495–504 (2006). <<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>>. Luettu 7.7.2020.
- 21 Van Doremalen, Neelthe; Bushmaker, Trenton; Morris, Dylan; Holbrook, Myndi; Gamble, Amandine; Williamson, Brandi; Tamin, Azaibi; Harcourt, Jennifer; Thornburg, Natalie; Gerber, Susan; Lloyd-Smith, James; de Wit, Emmie; Muster, Vincent. 2020. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. Verkkoaineisto. *The New England Journal of Medicine*. <<https://dx.doi.org/10.1056%2FNEJMc2004973>>. Päivitetty 17.3.2020. Luettu 9.6.2020.
- 22 Rabenau, H. F.; Cinatl, J.; Morgenstern, B.; Bauer, G.; Preiser, W.; Doerr H. W. 2005. Stability and inactivation of SARS coronavirus. Verkkoaineisto. *Medical Microbiology and Immunology*. <<https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00430-004-0219-0>>. Luettu 9.6.2020.

- 23 Riskinarviointi BSL2 SARS-CoV-2. 2020. Yrityksen sisäinen dokumentti. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- 24 Kumar, Mia; Mazur, Steven; Ork, Britini; Postnikova, Elena; Hensley, Lisa; Jahrling, Peter; Johnson, Reed; Holbrook, Michael. 2015. Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. Verkkoaineisto. Journal of Virological Methods. <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.002>>. Luettu 9.6.2020.
- 25 2-merkaptotoetanol. Käyttöturvallisuustiedote. Verkkoaineisto. VWR. <https://fi.vwr.com/assetsvc/asset/fi_FI/id/7667991/contents/> Luettu 9.9.2020.
- 26 Corman, Victor; Landt, Olfert; Kaiser, Marco; Molenkamp, Richard; Meijer, Adam; Chu, Daniel; Bleicker, Tobias; Brünink, Sebastian; Schneider, Julia; Schmidt, Marie; Mulders, Daphne; Haagmans, Bart; van der Veer, Bas; van den Brink, Sharon; Wijsman, Lisa; Goderski, Gabriel; Romette, Jean-Louis; Ellis, Joanna; Zambon, Maria; Peiris, Malik; Goossens, Herman; Reusken, Chantal; Koopmans, Marion; Drosten, Christian. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Verkkoaineisto. Euro Surveillance. <<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>>. Luettu 13.7.2020.
- 27 CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. 2020. Käyttöohje. Centers for Disease Control and Prevention.
- 28 QIAcube® User Manual. 2018. Käyttöohjeet. QIAGEN.
- 29 RNeasy® Mini Handbook. 2019. Käyttöohjeet. QIAGEN.
- 30 chemagic™ 360 instrument. 2016. Verkkoaineisto. PerkinElmer, Inc. <https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_chemagic-360_ROW-CT6-30-0116-01.pdf>. Luettu 9.7.2020.
- 31 QIASymphony® SP/AS Yhdistetty käyttöopas. 2018. Käyttöohjeet. QIAGEN GmbH.
- 32 NeuMoDx™ 96 Molecular System –järjestelmä Käyttöopas. 2018. Käyttöohjeet. NeuMoDx Molecular, Inc.
- 33 NeuMoDx™ LDT Master Mix Test Strip, RNA. 2018. Käyttöohjeet. NeuMoDx Molecular, Inc.
- 34 QIAstat-Dx® Analyzer 1.0 -käyttöopas. 2019. Käyttöohjeet. QIAGEN GmbH.
- 35 QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel Instructions for Use (Handbook). 2020. Käyttöohjeet. QIAGEN GmbH.

- 36 Hägg, Margareta. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkoaineisto. VTT.
<<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>.
Luettu: 10.9.2020.

Laimennossarjan Cq-arvot

Taulukko 1. Työssä käytetty laimennossarja eristettiin kaikilla vertailussa olevilla laitteilla, laitteiden herkkyyttä arvioitiin menetelmällä saatujen kynnyksarvojen eli Cq-arvojen perusteella.

Laimennos	QIAcube Connect (Cq)	chemagic 360 (Cq)	QIASymphony (Cq)	NeuMoDx (Cq)	QIAstat (Cq)
10 ⁻¹	19,81	17,13	19,92	17,57	20,20
10 ⁻²	24,31	21,75	24,23	23,18	26,20
10 ⁻³	27,14	25,94	28,55	26,72	29,00
10 ⁻³	27,16	26,41	28,40	26,63	28,60
10 ⁻³	27,23	25,70	28,95	26,27	29,70
10 ⁻⁴	30,45	29,59	32,21	30,00	33,50
10 ⁻⁴	30,57	29,31	31,80	28,62	32,70
10 ⁻⁴	30,69	29,82	32,07	29,85	32,30
10 ⁻⁵	34,00	32,23	no Cq	34,16	35,20
10 ⁻⁵	34,34	32,83	no Cq	32,07	37,40
10 ⁻⁵	35,36	32,45	no Cq	32,30	35,00
10 ⁻⁶	37,45	36,33	no Cq	no Cq	37,70
10 ⁻⁶	40,95	36,43	no Cq	no Cq	36,20
10 ⁻⁶	no Cq	38,93	no Cq	no Cq	no Cq
10 ⁻⁷	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq
10 ⁻⁷	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq
10 ⁻⁷	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq
10 ⁻⁸	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	
10 ⁻⁸	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	
10 ⁻⁸	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	
10 ⁻⁹	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	
10 ⁻⁹	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	
10 ⁻⁹	no Cq	no Cq	no Cq	no Cq	

Työaikavertailu

Taulukko 1. Laitteiden työaikaa vertailtiin esikäsitellyn näytteen vastaanottamisesta testin tuloksen saamiseen. Taulukon vaiheiden kestot on ilmoitettu minuuteissa.

Laite	QIAcube (min)	Chemagic360 (min)	QIASymphony (min)	NeuMoDx (min)	QIAstat-Dx (min)
Näytemäärä	12	96	24	18	1
ERISTYS					
Reagenssien valmistelu	5	5	10	10	0
Näytelistauksen laatiminen	5	5	5	5	0
Näytteiden siirto	5	30	5	5	5
Eristysohjelma	30	65	120	80	70
RNA-putkien merkkäminen	10	30	0	0	0
RNA:n pipetointi putkiin	0	15	0	0	0
Siirto PCR-huoneeseen	5	5	5	0	5
Siivous (viive seuraavaan ajoin)	5	15	10	3	5
Eristys hands-on yht	35	105	35	23	15
Eristykseen kuluva aika	50	125	125	80	75
Kapasiteettikerroin	8	1	4	5,3	96
PCR					
Mixin valmistus ja pipetointi	20	20	10	0	0
Templaatin pipetointi	45	45	0	0	0
Ajon käynnistäminen	5	5	5	0	0
Siivous	15	15	10	0	0
PCR-ohjelma	120	120	120	0	0
PCR ajoa viivyttävä hands-on	50	50	5	0	0
PCR hands-on yht	85	35	25	0	0
Hands-on-yht	85	85	30	0	0
Aika eristys ja pcr yht	570	295	625	340,0	7200
Hands on eristys ja pcr yht	365	190	170	122,7	1440

Analyysi, 96 näytettä	QIAcube	chemagic360	QIASymphony	NeuMoDx	QIAstat-Dx
Aika yhteensä (h)	9,5	4,9	10,4	5,7	120,0
Hands-on-time (h)	6,1	3,2	2,8	2,0	24,0

Analyysi, 96 näytettä	QIAcube	chemagic360	QIASymphony	NeuMoDx	QIAstat-Dx
Materiaaliustannukset (€)	666,41	435,41	852,98	1040,13	8640
Henkilökustannukset (€)	334,58	174,17	155,83	112,44	1320,00