



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Ellinoora Korhonen

# Amplidiag® Bacterial GE -testin stabiiliustestaus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

31.5.2021

Tekijä Otsikko	Ellinoora Korhonen Amplidiag® Bacterial GE -testin stabiiliustestaus
Sivumäärä Aika	24 sivua + 2 liitettä 31.5.2021
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	tuotantopäällikkö Mia Horttanainen lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Mobidiag Oy:n tuotannon yksikössä osana Amplidiag® -tuoteperheen stabiiliustestauksia. Mobidiag Oy on suomalais-ranskalainen bioteknologiayritys, joka tuottaa ja kehittää ratkaisuja infektioautien sekä antibioottiresistentin In vitro -diagnostiikkaan (IVD). Opinnäytetyön tarkoituksena oli aloittaa kokonaisrasitus (worst case scenario) -stabiiliustutkimus Amplidiag® Bacterial GE -testille, joka on reaaliaikainen multiplex-PCR-menetelmä kahdeksan ripulia aiheuttavan bakteeripatogeenin nukleiinihapon osoittamiseen.</p> <p>IVD-reagenssien stabiiliustutkimukset koostuvat kolmesta alaosasta: hyllyistä (shelf life), joka käsittää tuotteen stabiiliuden sen säilytyksen aikana, käytönaikaisesta säilyvyydestä (in use), joka käsittää tuotteen stabiiliuden sen normaalin käytön aikana, sekä kuljetusstabiiliudesta, joka käsittää tuotteen stabiiliuden niiden olosuhteiden aikana, kun se kulkee valmistajalta asiakkaalle. Kokonaisrasitusstabiiliustutkimuksessa testataan tuotteen stabiilius pahimmassa mahdollisessa tilanteessa, ja tutkimuksessa yhdistyy nämä kolme edellä mainittua stabiiliustutkimusta.</p> <p>Opinnäytetyössä tuotettiin Amplidiag® Bacterial GE -testille kuljetussimulaatio, jossa tuote altistettiin niille olosuhteille, mitkä se pahimmassa mahdollisessa tapauksessa voi kohdata kuljetuksen aikana kuljetusfirman tietojen perusteella.</p> <p>Lisäksi testattiin testikitin stabiilius ennen kuljetussimulaatiota nollapisteessä, sekä kuljetussimulaation jälkeen. qPCR-ajot tehtiin Bio-Radin CFX96™ Real-Time PCR Detection System -laitteella, ja ajoissa käytettiin yrityksen sisäistä laadunvalvontaprotokollaa.</p> <p>Testien tuloksissa tarkasteltiin cq-arvoja sekä kalibraatiosarjan standardikuvaajan parametrejä suuntaa antavien laadunvalvontakriteerien puitteissa. Tulosten perusteella tultiin siihen loppupäätelmään, ettei kuljetus pahimmissa mahdollisissa olosuhteissa vaikuta testikitin stabiiliuteen suorituskykyä alentavasti. Testejä tullaan jatkamaan tulevaisuudessa stabiiliussuunnitelmassa määritetyissä myöhemmissä aikapisteissä.</p>	
Avainsanat	In vitro -diagnostiikka, stabiiliustestaus, qPCR

Author Title	Ellinoora Korhonen The Stability Studies of Amplidiag® Bacterial GE
Number of Pages Date	24 pages + 2 appendices 31 May 2021
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Mia Horttanainen, Production Manager Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>This thesis work was carried out at Mobidiag Ltd production department as a part of Amplidiag® product family stability studies. Mobidiag Ltd is a Finnish-French molecular diagnostics company that develops and provides molecular <i>In vitro</i> diagnostics for infectious diseases and antibiotic resistances. The purpose of this thesis work was to kick off the worst case scenario stability studies for Amplidiag® Bacterial GE, which is a multiplex real-time PCR screening test for eight bacterial pathogens from stool samples.</p> <p>The stability studies for IVD reagents are comprised of three sub studies: shelf life stability studies, which studies the time that an IVD reagent maintains its stability under the storage conditions, in-use stability studies, which studies the time an IVD reagent maintains its stability after opening the container system and putting it into use, and transport stability studies, which studies the reagents ability to maintain its stability during transport conditions. In worst case scenario stability studies the stability of an IVD reagent is tested in the worst possible situation, and it consists of all three sub studies mentioned above.</p> <p>In the study for this thesis the Amplidiag® Bacterial GE was put under a transport simulation, where the product was exposed to the conditions that it could possibly encounter in the worst case scenario. This was done by the information collected from the transport company.</p> <p>In addition the stability of the kit was tested in point zero before the transport simulation, and after the transport simulation. The qPCR screening test was done with Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System and the company's inner quality control protocol was used.</p> <p>In the result part of the thesis work the cq values of the targets and parameters from the calibration standard curve were examined. The final result for the thesis work is that the transport conditions in the worst case scenario do not affect the stability of the kit by decreasing its performance. The stability tests are going to continue in the future in time points determined in the stability evaluation protocol.</p>	
Keywords	In Vitro Diagnostics, Stability Evaluation, qPCR

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Stabiiliustestaus IVD-tuotannossa	2
3	qPCR analyysimenetelmänä	4
3.1	qPCR	4
3.2	Multiplex-qPCR	5
3.3	qPCR-tulosten analysointi	5
4	Amplidiag® Bacterial GE -testi	8
5	Työn toteutus	11
5.1	Kuljetussimulaatio	12
5.2	qPCR-ajot	13
6	Tulokset	15
7	Yhteenveto	22
	Lähteet	24

### Liitteet

Liite 1. Nollatestin amplifikaatio- ja standardikuvaajat

Liite 2. Kuljetuksen jälkeisen testin amplifikaatio- ja standardikuvaajat

## Lyhenteet

BGE	<i>Bacterial Gastroenteritis</i> . Bakterinen gastroenteriitti.
Cq-arvo	<i>Quantification cycle</i> . qPCR-nukleinihappomonistuksen syklimäärä, jossa fluoresenssimäärä ylittää asetetun kynnsarvon.
IVD	<i>In vitro</i> -diagnostiikka. Potilaasta otetusta näytteestä tehtävä tutkimus.
Lot	Eränumero, joka mahdollistaa tuotteen jäljitettävyyden.
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> . Kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio.
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> . Suhteellinen fluoresenssiyksikkö.

## 1 Johdanto

Mobidiag Oy on suomalais-ranskalainen bioteknologiayritys, joka tuottaa ja kehittää ratkaisuja infektioautien, sekä antibioottiresistentin In vitro -diagnostiikkaan (IVD). In vitrolla viitataan tutkimukseen, joka tapahtuu elävän organismin luonnollisen elinympäristön ulkopuolella. Mobidiagin valmistamat diagnostiikkatestit ja -laitteet pohjautuvat nukleiinihappoanalytiikkaan, ja ne tarjoavat luotettavia ja entistä tehokkaampia menetelmiä patogeenien analysointiin potilasnäytteistä kliinisissä laboratorioissa.

Jotta IVD-tuotteet pysyvät laadukkaita ja luotettavina, niin niiden tuotantoa säädellään monin eri laatujärjestelmin. Yksi näistä on tuotteen stabiiliuden määrittäminen ja säännöllinen testaaminen, jotta varmistutaan, että tuote on riittävän suorituskykyinen tarvittavan ajan puitteissa. Kaikki stabiiliustestaus IVD-tuotannossa perustuu kansainvälisiin EN ISO 23640 sekä CLSI EP25-A -standardeihin. [1; 2.]

Standardien mukaan IVD-tuotteen stabiilius koostuu kolmesta alaosasta: hyllyiästä (shelf life), joka käsittää tuotteen stabiiliuden sen säilytyksen aikana, käytönaikaisesta säilyvyydestä (in use), joka käsittää tuotteen stabiiliuden sen normaalin käytön aikana, sekä kuljetusstabiiliudesta, joka käsittää tuotteen stabiiliuden niiden olosuhteiden aikana, kun se kulkee valmistajalta asiakkaalle.

Opinnäytetyö toteutettiin osana Mobidiagin Amplidiag® -tuoteperheen stabiiliustestauksia. Testattavaksi tuotteeksi opinnäytetyöhön valikoitui Amplidiag® Bacterial GE -testi (BGE), joka on reaaliaikainen multiplex-PCR-menetelmä kahdeksan ripulia aiheuttavan bakteeripatogeenin nukleiinihapon osoittamiseen.

Opinnäytetyön osalta stabiiliustestauksen tarkoituksena oli aloittaa BGE-testin kokonaisrasitusstabiiliustestaus (worst case scenario), eli tuotteen stabiiliuden testaus niin sanottu pahimmassa mahdollisessa tilanteessa. Tämä tarkoittaa tutkimusta, jossa yhdistyy tuotteen hyllyiän, käytönaikaisen säilyvyyden ja kuljetusstabiiliuden testaus. [3.]

## 2 Stabiiliustestaus IVD-tuotannossa

In vitro -diagnostisen (IVD) tuotteen stabiilius tarkoittaa sen kykyä säilyttää suorituskykynsä määritetyissä olosuhteissa, tietyn määritetyn ajan sisällä. IVD-tuotteeksi määritellään tuote, jolle on määritetty viimeinen käyttöpäivämäärä ja joka myydään asiakkaille kliinisen laboratoriotestauksen tarkoituksiin. Näihin lukeutuvat esimerkiksi IVD-testikitit ja niiden sisältämät kalibraatioreagenssit, kontrollit, laimennospuskurit ja muut reagenssit [2].

IVD-reagenssin stabiiliuden määrittäminen ja säännöllinen testaaminen on aina tuotteen valmistajan vastuulla. Tämä saavutetaan laatimalla jokaiselle tuotteelle stabiiliuden evaluointi -protokolla, joka perustuu kansainvälisiin EN ISO 23640 sekä CLSI EP25-A -standardeihin. Tämän protokollan tulee sisältää muun muassa suunnitelman testausaikatauluista, testattavien reagenssien määrästä, testauksessa käytettävistä laitteista ja raportointitavasta. Lisäksi protokollan tulee sisältää jokaiselle testille määritetyt hyväksymiskriteerit, joiden puitteissa tuloksia tarkastellaan. [3.]

EN ISO 23640 ja CLSI EP25-A -standardien perusteella IVD-reagensseille tulee tuottaa stabiiliustestit, joista selviää reagenssin hyllyikä (shelf life), käytönaikainen säilyvyys (in use) ja kuljetusstabiilius.

Hyllyikä tarkoittaa sitä aikaa, jonka tuote säilyttää suorituskykynsä sen valmistamisesta viimeiseen säilytyspäivään asti. Hyllyiän stabiiliustestauksen perusteella laaditaan siis tuotteen säilytysohje asiakkaalle, sekä tuotteen viimeinen käyttöpäivämäärä. Hyllyiän stabiiliustestit tehdään aina vähintään kolmelle eri lotille, eli tuotteen eränumerolle.

Käytönaikainen säilyvyys määrittää sen ajan, minkä tuote säilyttää täydellisen suorituskykynsä sen jälkeen, kun se on otettu käyttöön. Yhdellä tuotteella voi olla useita käytönaikaisen säilyvyyden stabiiliusvaatimuksia, riippuen sen käyttötavasta. Esimerkiksi samalla reagenssilla voi olla eri stabiiliusvaatimus, kun se on avatussa kittipakkauksessa ja kun se on avatussa astiassa.

Kuljetusstabiiliustestauksilla varmistetaan, että tuote säilyttää stabiiliutensa niiden kuljetusolosuhteiden aikana, jotka se kohtaa, kun se kuljetetaan valmistajalta asiakkaalle.

Tuotteen valmistajan tulee siis varmistaa, että kuljetusolosuhteet eivät vaikuta tuotteen viimeiseen käyttöpäivämäärään, ja näin ollen kuljetusolosuhteiden on oltava aina tarkkaan tunnettuja. Kuljetusstabiilius testataan usein simuloimalla kuljetusolosuhteet, ja tällöin testin tulee perustua tietoon oikeista kuljetusajoista ja lämpötiloista. [1.]

Stabiiliustestauksen suunnitteluun ja suorittamiseen on standardien mukaan kaksi eri lähestymistapaa, reaaliaikainen (real time) ja kiihdytetty (accelerated) tapa. Reaaliaikainen stabiiliustestaus tehdään kirjaimellisesti reaaliaikaisesti, eli tuotteet säilötään ja testataan niiden normaaliolosuhteissa. Kiihdytetyssä tutkimuksessa testin olosuhteita, esimerkiksi lämpötilaa ja kosteutta muutetaan, jotta saavutettaisiin tietynlaiset parametrit. Tällaisessa tutkimuksessa ikään kuin testataan mitä tuotteelle kävisi, jos se kohtaisi tiettyjä olosuhteenmuutoksia, jotka tiedetysti heikentävät suorituskykyä nopeammalla aikataululla. Lopullinen tuotteen stabiilius kiihdytetyssä tutkimuksessa saadaan Arrheniuksen yhtälön avulla laskemalla, ja tuloksia tulee verrata aina reaaliaikaisella tutkimuksella saavutettuihin tuloksiin. [2; 3.]

Tuotteen kokonaisrasituksen (worst case scenario) stabiiliustestauksessa testataan tuotteen stabiilius niin sanotusti pahimmassa mahdollisessa tilanteessa, ja tällöin testauksessa yhdistyy kuljetusstabiiliuden testaus kuljetussimulaatiolla, sekä hyllyiän ja käytönaikaisen säilyvyyden testaaminen. Tuote käy aina läpi kokonaisrasitustestauksen, ja tutkimus tehdään aina reaaliaikaisesti ja minimissään yhdelle lotille.

Kokonaisrasitustutkimuksessa siis testataan miten tuote säilyttää määritellyn toiminnallisuutensa silloin, kun se ensin käy läpi kuljetussimulaation niissä olosuhteissa, jotka se pahimmassa mahdollisessa tapauksessa voi kohdata kuljetuksen aikana kuljetusfirman tietojen perusteella, ja jää tämän jälkeen odottamaan hyllyiän ja käytönaikaisen säilyvyyden testausta suunnitelmaan määritellyissä myöhemmissä aikapisteissä.

Vaikka tuotteen kohtaamia kuljetusolosuhteita tutkimuksessa kutsutaan pahimmiksi mahdollisiksi, niin kyseiset olosuhteet ovat kuitenkin realismia valtaosassa kuljetuksista. Kokonaisrasitus testaa siis ”worst case” nimestään huolimatta usein tuotteen kohtaamaa normaalirasitusta. [3.]



### 3 qPCR analyysimenetelmänä

#### 3.1 qPCR

Kvantitatiivinen PCR (qPCR) on molekyylibiologinen menetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa tiettyjä nukleiinihapposekvenssejä, ja näin ollen esimerkiksi taudinaiheuttajia, halutusta näytteestä. Kun tavallisessa PCR:ssä analyysi voidaan tehdä vasta kaikkien syklien päätyttyä, niin qPCR mahdollistaa halutun DNA:n monistuksen seuraamisen reaaliaikaisesti fluoresoivien leimojen avulla. [4.]

qPCR-analyysin detektointiin voidaan käyttää kahta eri metodia, fluoresoivaa väriainetta tai fluoresoivia koettimia. Yksi yleisimmin käytetyistä väriaineista on SYBR Green I. Sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA:han sen fluoresenssi kasvaa noin tuhatkertaiseksi, jolloin se on mitattavissa helposti. Kun DNA taas hajoaa takaisin yksijuosteiseksi, niin myös värimolekyylit vapautuvat ja fluoresenssi laskee. Tätä detektointimenetelmää käytettäessä qPCR:n tuotteiden tarkistus voidaan tehdä qPCR-ajon jälkeen sulamiskäyräanalyysillä.

Toinen detektointimetodi on sekvenssispesifiset fluorofori-leimatut koettimet. Eri mekanismeilla toimivia koettimia on useita, mutta yleisimpiä ovat 5'-nukleasikoettimet, eli hydrolyysikoettimet, kuten TaqMan®, joita myös tässä opinnäytetyössä käytettiin. Kyseisten koetinten toiminta perustuu taq-polymeraasin 5'-eksonukleasiaktiivisuuteen. [5.]

TaqMan-koettimissa on tavallisesti 5'-päässä fluoresoiva reportterimolekyylä, ja 3'-päässä puolestaan reportteria vaimentava vaimentajamolekyylä (quencher). Fluoresoiva reportteripää sekä vaimentajapää muodostavan yhdessä FRET-ilmiön (fluorescence resonance energy transfer), eli fluoresenssiresonanssienergian siirtoparin, jossa vaimentaja vaimentaa reportterin signaalin. Molekyylien ollessa lähellä toisiaan samassa oligonukleotidissa, reportterin viritystila ei purkautukaan fluoresenssina, vaan siirtyy vaimentimelle. Vaimentimen fluoresenssi ilmenee eri aallonpituudella kuin reportterin, ja se havaitaan qPCR-laitteistolla matalana taustasäteilynä.

Kun koetin annealing-vaiheessa liittyy kohdemolekyylisiin, alkaa taq-polymeraasi tehdä vastinjuostetta, ja pilkkoo samalla koettimen liuokseen. Tämän seurauksena reportteri ja vaimennin ajautuvat kauemmas toisistaan ja FRET-ilmiö lakkaa toimimasta, eli reportterin fluoresenssisignaali tulee esiin. Tämä on signaali, joka kertoo DNA:n monistumisesta ja joka qPCR-laitteella halutaan havaita. [6.]

TaqMan-menetelmää käytettäessä on siis varmistettava, että fluoresoiva reportteri ja vaimentaja eivät tuota valoa samalla aaltopituudella, minkä seurauksena vaimentaja tunnistettaisiin reportterina. Esimerkkejä toimivista pareista ovat esimerkiksi FAM (carboxy fluorescein) reportterina ja TAMRA (carboxy-tetra-methylrhodamine) vaimentajana [7].

### 3.2 Multiplex-qPCR

Multiplex-qPCR tarkoittaa useamman erilaisen sekvenssin monistamista ja tunnistamista samanaikaisesti. Tämä on mahdollista, kun yhteen reaktioon lisätään useampia, jokaiselle halutulle tuotteelle ominaisia alukkeita ja koettimia.

Jotta multiplex-reaktio saavuttaa tarvittavan spesifisyyden, täytyy reaktio-olosuhteiden ja varsinkin alukkeiden suunnittelussa olla huolellinen. Erityisen tärkeää on huolehtia siitä, etteivät erilaiset alukkeet sitoudu toisiinsa, ja näin muodosta primer dimereita. Myös alukkeiden sulamislämpötilojen on oltava tarpeeksi samanlaiset, jotta saman ajo-ohjelman käyttö on mahdollista.

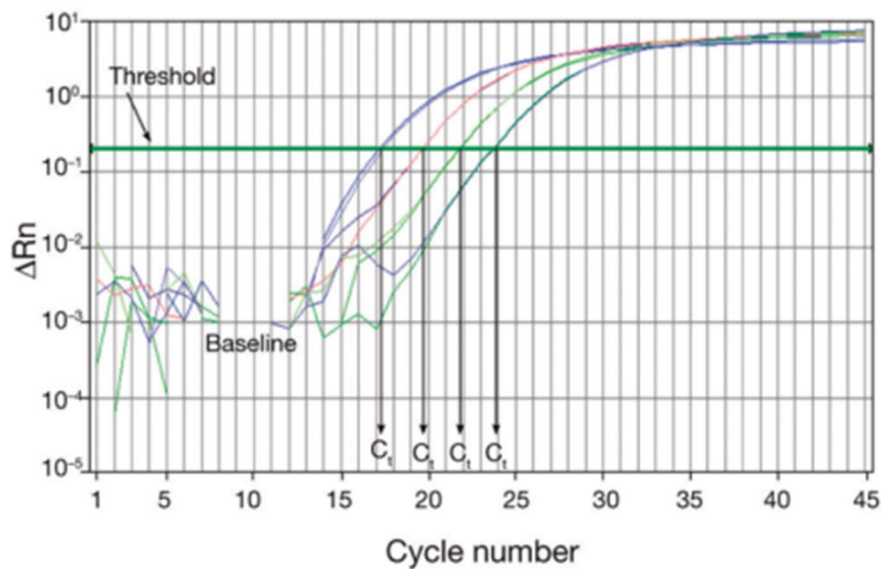
Multiplex qPCR:llä säästetään kuitenkin aikaa sekä reagensseja, koska samasta potilasnäytteestä saadaan yhdellä testillä testattua useita taudinaiheuttajia. Myös kontaminaatoriskit pienenevät, kun näytteenkäsittelyä tapahtuu vähemmän. [8.]

### 3.3 qPCR-tulosten analysointi

qPCR:ssa tulokset ovat nähtävissä koko reaktion ajan eksponentiaalisesti kasvavina käyriä, jotka laite piirtää fluoresenssin intensiteetin perusteella. Fluoresenssin taso mitataan joka syklin lopussa, ja se ilmoitetaan suhteellisena fluoresenssiyksikkönä, RFU:na (relative fluorescence unit). Aluksi fluoresenssitaso pysyy taustatasolla

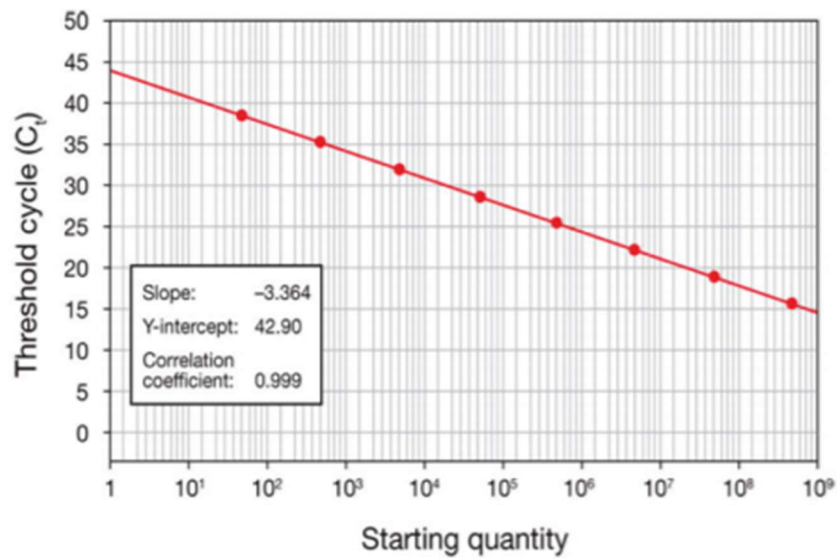
(baseline), ja kun tuotetta on muodostunut riittävästi, se havaitaan kuvaajassa käyrien jyrkkänä nousuna. Esimerkki tällaisesta amplifikaatiokuvaajasta kuvassa 1.

Kuvaajan perusteella voidaan analysoida tuotteen muodostumisen aloitus-, huippu- ja loppukohta. qPCR-tulosten analyysissa keskitytään usein kuitenkin kynnyksära-arvoon (threshold-value), joka asetetaan eksponentiaalisen vaiheen puoliväliin, jossa näytteen fluoresenssi ylittää taustafloresenssin, sekä  $c_q$ -arvoon (Quantification Cycle), eli tiettyyn syklimäärään, jossa fluoresenssi ylittää määritetyn kynnyksära-arvon.  $C_q$  arvo on siis se syklimuku, joka on kynnyksära-arvon sekä fluoresenssin kasvukäyrän leikkauskohdassa, kuten kuvasta 1 voi nähdä.



Kuva 1. Esimerkki qPCR amplifikaatiokuvaajasta, jossa nähtävillä kynnyksära-arvo (threshold), taustataso (baseline) ja eksponentiaalisesti kasvavat käyrät  $c_q$ -arvoineen [9].

qPCR-reaktion suorituskykyä voidaan arvioida tutkimalla reaktion tehokkuutta ja toistettavuutta kalibraatiosarjan standardokuvaajasta saatavien parametrien perusteella. Tällaisia parametreja ovat esimerkiksi kulmakerroin (slope), korrelaatiokerroimen neliö  $R^2$  (correlation coefficient) ja y-akselin leikkauspiste (intercept). Kuvassa 2 on nähtävillä esimerkki qPCR-reaktion kalibraatiosarjan kuvaajasta, jossa myös kyseiset parametrit.



Kuva 2. Esimerkki qPCR-reaktion kalibraatiosarjan standardikuvaajasta [9].

Kulmakerroin kuvaa qPCR-reaktion tehokkuutta, ja se lasketaan standardisuoran avulla  $10^{-1/\text{kulmakerroin}}$ . Ihanteellisimmassa tilanteessa qPCR-tuotteen määrä kaksinkertaistuu jokaisella kierroksella, jolloin kulmakertoimeksi saadaan  $-3,32$ . Tämä vastaa tehokkuutta 100 %.  $R^2$ , eli korrelaatiokertoimen neliö kuvaa kalibrointikuvaajan lineaarisuutta, ja ideaalisesti  $R^2 = 1$ , vaikkakin 0,999 on yleisesti maksimiarvo. Y-akselin leikkauspiste kuvaa reaktion sensitiivisyyttä ja vastaa detektoinnin teoreettista rajaa. [9.]

## 4 Amplidiag® Bacterial GE -testi

Amplidiag® Bacterial GE on reaaliaikainen multiplex-PCR-menetelmä, kahdeksan ripulia aiheuttavan bakteeripatogeenin nukleiinihapon osoittamiseen. Testiä käytetään potilasnäytteiden analysointiin kliinisissä laboratorioissa, ja testillä voi muun muassa korvata perinteiset, aikaa vievät bakteeriviljelyt. Patogeenien tunnistus perustuu BGE-testissä morfologian ja viljelytulosten sijaan DNA-tunnistukseen. [10.]

GE viittaa sanaan gastroenteriitti (*Gastroenteritis*), joka tarkoittaa suolistotulehdusta, ja sen aiheuttajana voi olla virus, bakteeri, parasiitti tai sieni. Tartunta on useimmiten peräisin vedestä tai ruoasta, ja tartunnan oireena on akuutti ripuli. Gastroenteriitti on toiseksi yleisin syy lapsikuolleisuuteen kehitysmaissa ja yksi yleisimmistä sairauksista matkustavilla turisteilla. Jotta spesifisen hoidon antaminen suolistotulehdukseen mahdollistuisi, nopean ja luetettava diagnosointi on erityisen tärkeää. Hoitamattomana jotkut bakteerit ovat kyvykkäitä kehittämään pysyviä gastroenterisiä oireita.

Yleisin akuutin ripulin aiheuttava bakteeri on kolibakteeri. Useimmiten enterotoksigeeninen *Esherichia coli* (ETEC) mutta myös muut kolibakteerit, kuten enteroaggregatiivinen *E. coli* (EAEC), enterohemorraginen *E. coli* (EHEC) ja enteropatogeeninen *E. coli* (EPEC) voivat olla ripulin aiheuttajia. Myös kampylobakteerit (*C. coli* ja *C. jejuni*), salmonellat, ja shigellat ovat tunnettuja taudinaiheuttajabakteereja. [11.]

BGE-testi kykenee tunnistamaan edellä mainitut yleisimmät ja tärkeimmät bakteerit potilaan ulostenäytteestä nukleiinihappomarkkereiden perusteella. Tulokset valmistuvat jopa muutaman tunnin sisällä siitä, kun ulostenäyte on saapunut laboratorioon tutkittavaksi.

BGE-testipakkaus sisältää itse analyysikitin Amplidiag® Bacterial GE Kit (kuva 3), joka tunnistaa kahdeksan patogeenia kolmeen multiplex-reaktioon jaettuna, sekä erillisen kalibraatiokitin, jonka avulla tulokset tulkitaan Amplidiag Analyzer -analyysiohjelmaa käyttäen. Kalibraatiokitti sisältää neljä kalibraatio-DNA-standardia, jotka ovat 10-kertainen laimennossarja.



Kuva 3. Amplidiag® Bacterial GE Kit -analyysikittipakkaus. Analyysikitti sisältää 3 analyysiseosta, joihin kahdeksaa eri taudinaiheuttajaa vastaavat alukkeet on jaettu, sekä master mixin, positiivisen DNA-kontrollin ja negatiivisen kontrollin. [10.]

BGE-analyysikitti sisältää reagenssit yhteensä 96 eri reaktioon, kolmen eri multiplex-reaktion muodossa. Multiplex reaktiot toteutuvat koken eri analyysiseoksen (assay mix) muodossa, joihin kahdeksan eri taudinaiheuttajaa vastaavat alukkeet on jaettu. Kuvassa 3 analyysiseokset 1–3 ovat nähtävillä keltakorkkisina vialeina. Lisäksi analyysikitti sisältää qPCR-reaktion vakiosti tarvittavat komponentit master mixin (kuvassa 3 sininen korkki), positiivisen DNA-kontrollin (kuvassa 3 punainen korkki), sekä negatiivisen kontrollin (kuvassa 3 valkoinen korkki).

Tarkempi kuvaus BGE-kitin testipaneelistä on nähtävillä taulukossa 1, jossa on lueteltuna eri multiplex-reaktioita vastaavat taudinaiheuttajat ja taudinaiheuttajien kohdegeenit. Lisäksi taulukossa on lueteltuna kunkin qPCR-reaktion detektoinnissa käytetty fluoresoiva väri.

Taulukko 1. Amplidiag® Bacterial GE -testin testipaneeli. Listattuna multiplex-reaktioittain taudinaiheuttaja, taudinaiheuttajaa vastaavat kohdegeenit, sekä detektoinnissa käytettävä fluoresoiva väri.

Multiplex	Taudinaiheuttaja	Kohdegeeni	Väri
1	EHEC	stx1	FAM
1		stx2	HEX
1	EPEC	eae	ROX
2	ETEC	elt	FAM
2		est	FAM
2	Yersinia	rumB	HEX
2		virF	HEX
2	<i>Campylobacter coli</i>	gyrB	ROX
2	<i>Campylobacter jejuni</i>	rimM	ROX
3	Shigella/EIEC	ipaH	FAM
3		invE	FAM
3	EAEC	aggR	HEX
3	<i>Salmonella</i>	invA	ROX
Kaikki		IAC	Cy5

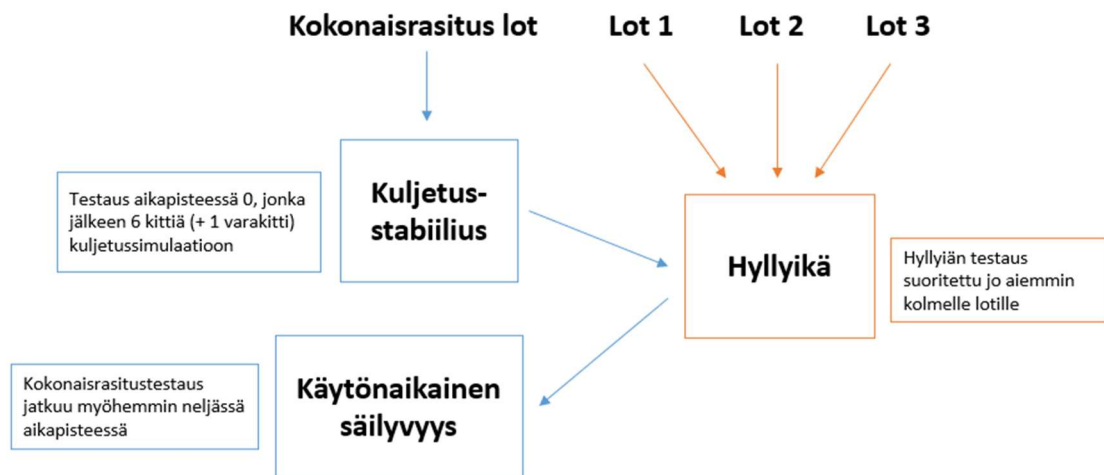
Kuten taulukosta 1 voi nähdä, joitakin taudinaiheuttajia vastaa yksi, ja joitakin useampi kohdegeeni. Yksi BGE-kitin erityispiirteistä on se, että se kykenee erottamaan EHEC:n Shiga-toksiinin geenivariantit stx1:n ja stx2:n toisistaan. Tämä geenivarianttien erottaminen on edistyksellistä kliiniseltä kannalta, sillä esimerkiksi riski epätyypilliseen hemolyttis-ureemiseen oireyhtymään (hemolytic uremic syndrome, HUS) on liitetty ainoastaan stx2-geeneihin. [10.]

Lisäksi kaikkiin kolmeen multiplex-reaktioon on lisätty mukaan IAC sisäiseksi kontrolliksi varmistamaan reaktion tekninen onnistuminen.

## 5 Työn toteutus

Opinnäytetyön toteutuksessa noudatettiin jo aiemmin stabiiliustestauksia varten laadittua yrityksen sisäistä dokumenttia Amplidiag Bacterial GE Stability Evaluation Plan. [12.]

Kuvassa 4 on kuvattu BGE-testin stabiiliustestaussuunnitelma ty pistettynä. Stabiiliustestaus suoritetaan yhteensä neljälle eri lotille, ja testattavat kitit valitaan satunnaisesti myyntikittien joukosta. Hyllyikä testataan kolmelle eri lotille, kun taas kokonaisrasitus-testauksessa yksi lot kulkee kaikkien kolmen eri stabiiliustestauksen läpi.



Kuva 4. BGE-testin stabiiliustestaussuunnitelma ty pistettynä. Hyllyiän testauksessa kolme lotia, kun taas kokonaisrasitustestauksessa yksi lot kulkee kaikkien kolmen eri stabiiliustestauksen läpi.

Hyllyiän testaus kolmelle lotille oli yrityksessä tehty jo aiemmin, joten opinnäytetyön tarkoituksena olisi kokonaisrasituksen testauksen aloittaminen. Koska kokonaisrasituksen stabiiliustestaus tehdään reaaliaikaisesti, ja kuljetuksen jälkeen testattavat aikapisteet ovat 6, 12, 18 ja 24 kuukautta kuljetuksen jälkeen, keskityttiin opinnäytetyössä nimenomaan kuljetusstabiiliuden testaukseen ja kuljetussimulaation laatimiseen. Tämä



toteutettiin testaamalla yksi testikitti ns. nollapisteessä ennen simulaatiota, toteuttamalla kuljetussimulaatio ja testaamalla yksi testikitti heti kuljetussimulaation jälkeen.

## 5.1 Kuljetussimulaatio

Kuljetussimulaatio toteutettiin EN ISO 23640 ja CLSI EP25-A -standardien mukaan ja simulaatioon valikoituneet BGE-kitit valikoitiin satunnaisesti asiakkaille tuotettujen myyntiin menevien kittien joukoista.

Seitsemän samaa lotia olevaa BGE-analyysikittiä ja seitsemän samaa lotia olevaa BGE-kalibraatiokittiä pakattiin yrityksen tuotannon pakkaamossa samalla tavalla, kuten ne pakattaisiin normaalistikin asiakkaalle. Testikitit pakattiin kahteen säilytuspussiin ja tämän jälkeen styroksilaatikkoon, ja mukaan lisättiin 8 x -1 °C- sekä 4 x -23 °C -asteista geelijääpussia. Mukaan lisättiin myös lämpömittari monitoroimaan lämpötilaa laatikon sisällä kuljetussimulaation aikana.

Tuotteiden kuljetus asiakkaalle kestää kaksi päivää, ja niiden aikana tuotteiden voidaan pahimmassa tapauksessa ajatella altistuvan seuraavanlaiselle lämpötilanvaihtelulle: +40 °C (+38 °C – +42 °C) kahden tunnin ajan, 30 °C (+28 °C – +32 °C) neljän tunnin ajan ja 22 °C (+20 °C – +24 °C) 70 tunnin ajan. Tämä perustuu kuljetusfirma Fedexiltä saatuun tietoon.

Näin ollen pakatulle kittilaatikonle tuotettiin kuljetussimulaatio altistamalla se seuraavanlaisille olosuhteille:

- +40 °C lämpökaappi kahden tunnin ajan
- +30 °C lämpökaappi neljän tunnin ajan
- huoneenlämpö 70 tunnin ajan

## 5.2 qPCR-ajot

Työn qPCR-osuus aloitettiin tekemällä nollatestiajo eli testaamalla BGE-testin stabiilius niin sanotussa nollapisteessä eli silloin, kun testikitti on vasta valmistettu ja parhaimmillaan. Myöhempiä tuloksia voitaisiin tarvittaessa verrata näihin nollatestin tuloksiin.

Lisäksi toinen testikitti testattiin heti kuljetussimulaation jälkeen, ja näin ollen määritettiin BGE-kitin kuljetusstabiilius

qPCR-ajo sekä nollatestissa että kuljetuksen jälkeisessä testissä tehtiin yrityksen sisäisen, BGE-testille spesifisen Stability Evaluation -suunnitelman mukaan, suunnitelmassa määrättyissä puhdastiloissa ja suunnitelmassa määritettyjä välineitä ja laitteita käyttäen. [12.]

qPCR-analyysi aloitettiin tekemällä kolme esiseosta (premix) BGE-analyysikitin sisältämistä master mixistä (MM) ja analyysiseoksista (AM1, AM2, AM3) taulukon 2 mukaan. Esiseos siis sisältää kaikki muut qPCR reaktioon tarvittavat komponentit, paitsi itse DNA:n. AM1:sta tehtiin 23-kertainen esiseos pipetoimalla eppendorf-putkeen 230 µl master mixiä ja 115 µl analyysiseos 1:tä. AM2:sta ja AM3:sta tehtiin kummastakin 17-kertainen esiseos pipetoimalla 170 µl master mixiä ja 85 µl kumpaakin analyysiseosta.

Taulukko 2. qPCR-ajoa varten pipetoidut esiseokset.

<b>Esiseos 1</b>				
Reagenssi	1x		23	x
MM	10	µl	230	µl
AM1	5	µl	115	µl
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>µl</b>	345	µl

<b>Esiseos 2/3</b>				
Reagenssi	1x		17	x
MM	10	µl	170	µl
AM2/3	5	µl	85	µl
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>µl</b>	255	µl

Esiseokset 1–3 pipetoitiin kuoppalevyille kuvan 5 pipetointikaavion mukaisesti. Jokaista esiseosta pipetoitiin 15 µl elektronisella pipetillä.

Tämän jälkeen reaktioon lisättiin DNA pipetoimalla kuvan 5 mukaisesti BGE-kalibraatiokitin sisältämät kalibraatio-DNA-standardit CS1–CS4 sekä kolme rinnakkaista positiivista DNA-kontrollia (PC1, PC2 ja PC). Lisäksi pipetoitiin negatiivinen kontrolli (NTC), jonka tehtävä on auttaa kontaminaatioiden monitoroimisessa. Kaikkia näytteitä pipetoitiin 5 µl elektronisella pipetillä.

	AM1	AM2	AM3	AM1						AM1	AM2	AM3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CS1	CS1	CS1	mix 1								
B	CS1	CS1	CS1	mix 1								
C	CS2	CS2	CS2	mix 2								
D	CS2	CS2	CS2	mix 2								
E	CS3	CS3	CS3	mix 3						PC1	PC1	PC1
F	CS3	CS3	CS3	mix 3						PC2	PC2	PC2
G	CS4	CS4	CS4							NTC	NTC	NTC
H	CS4	CS4	CS4							PC	PC	PC

Kuva 5. Pipetointikaavio, jonka mukaan näytteet pipetoitiin kuoppalevyille. Esiseoksia AM1–AM3 pipetoitiin 15 µl, ja CS1–CS4, QC-mixejä 1–3, ja PC:t ja NTC pipetoitiin 5 µl.

Lopuksi kuoppalevyille pipetoitiin 5 µl jokaista QC-mixiä 1–3. QC (Quality Control) -mixit ovat yrityksen tuotannon laadunvarmistuksessa rutiinisti käyttämiä laadunvalvontareagensseja, jotka valmistettiin tuotantotiimin jäsenen toimesta. QC-mixejä käytetään tarkastelemaan jokaisen analyysiseoksessa olevan koettimen olemassaoloa ja toimintaa, ja QC-mixeihin on jaoteltu aina yhdelle koettimelle spesifi templaatti mixiä kohden. BGE-testikitin tapauksessa CS- ja PC-näytteissä on templaattit sekä stx1 ja sxt2:lle, mutta niillä ei saa eroteltua kaikkia mixin eri koettimia näiden geenikohteiden takana. [13.]

Opinnäytetyön tulosten tarkastelussa QC-mixien läsnäoloa ei otettu huomioon, mutta niiden käyttö oli kuitenkin tärkeää yrityksen laadunvalvonnan kannalta.

qPCR-laitteistona työssä oli Bio-Radin CFX96™ Real-Time PCR Detection System ja ajo-ohjelmaksi valittiin Stability Evaluation -suunnitelmassa määritelty valmis yrityksen oma BGE-testille spesifinen laadunvalvonnan ajo-ohjelma. Ajo-ohjelma on nähtävillä taulukossa 3.

Taulukko 3. Työssä käytetty qPCR-ajo-ohjelma.

Lämpötila	Aika	Sykliden määrä
95°C	10 min	1 x
95°C	15 s	45 x
60°C	1 min	
Fluoresenssi luetaan jokaisen 60°C syklin jälkeen		

Ajon jälkeen tulokset analysoitiin Bio-Rad CFX Manager -ohjelman ja Excelin avulla.

## 6 Tulokset

Mobidiagilla Amplidiag-tuotteiden laadunvalvonnan tulokset analysoidaan Bio-Rad CFX Manager -ohjelman lisäksi yrityksen omalla ohjelmalla, Amplidiag Analyzer -analyysiohjelmalla. Tämän jälkeen tuloksia verrataan olemassa oleviin, yrityksen sisäisessä Stability Evaluation -suunnitelmassa määritettyihin laadunvalvontakriteereihin. Opinnäytetyötä varten tulokset analysoitiin kuitenkin manuaalisesti Bio-Rad CFX Manager -ohjelmaa ja Exceliä käyttäen, eikä näitä tuloksia voi näin ollen pitää yrityksen kriteereihin pätevinä. Opinnäytetyön tuloksia vertailtiin Stability Evaluation -suunnitelmassa esitettyihin

kriteereihin kuitenkin suuntaa antavasti. Yrityksen sisäiset kriteerit ovat kuitenkin salaisia, joten niitä ei ole voitu opinnäytetyössä tarkalleen mainita.

qPCR-tulosten analysointi aloitettiin varmistamalla CFX-ohjelmalla, että kaikki amplifikaatiokuvaajien käyrät ovat eksponentiaalisia. Täten varmistuttiin tuotteiden monistumisen onnistumisesta. Lisäksi CFX-ohjelmassa näkyvä kuoppalevykaavio muokattiin vastaamaan qPCR-ajossa käytettyä kuoppalevykaaviota.

Tämän jälkeen valittiin halutut kaivot (ensimmäisenä kalibraatio-DNA-standardin 1 reaktioiden kaivot), ja siirrettiin kyseisten reaktioiden geenikohteiden RFU-loppupisteet Exceliin. Excelissä pystyttiin jokaiselle geenikohteelle laskemaan kynnsraja-arvo yrityksen sisäisen Stability Evaluation -suunnitelman mukaisesti. Tämän jälkeen siirryttiin takaisin CFX-ohjelmaan, ja määritettiin valittujen kalibraatio-DNA-standardin 1 (CS1) -reaktioiden geenikohteille taustatason kynnsraja-arvo (baseline threshold), jossa geenikohteen käyrän taustataso asetettiin yrityksen sisäisen Stability Evaluation -suunnitelman mukaiselle välille ja kynnsraja-arvoksi asetettiin Excelistä laskettu arvo.

Sama tehtiin myös kalibraatio-DNA-standardien 2, 3 ja 4 reaktioiden geenikohteille, mutta koska kalibraatio-DNA-standardit ovat 10-kertainen laimennossarja, tulosten tarkastelussa voitiin keskittyä lähinnä kalibraatio-DNA-standardin 1 reaktioiden tuloksiin. CFX-ohjelmasta poimitut amplifikaatiokuvaajat ja kalibraatiosarjan standardisuorat CS1-reaktioille nollatestissä opinnäytetyön liitteenä 1, ja kuljetuksen jälkeisessä testissä opinnäytetyön liitteenä 2.

CFX-ohjelmasta saatiin taustatason kynnsraja-arvon muokkaamisen jälkeen poimittua jokaisen geenituotteen kalibraatiosarjan standardisuorasta tarvittavat vertailuparametrit kulmakerroin, korrelaatiokertoimen neliö  $R^2$  sekä y-akselin leikkauspiste, jotka ovat nähtävillä taulukossa 4. Taulukossa laskettu myös ero kyseisissä parametreissa nollatestin ja kuljetussimulaation jälkeisen testin välillä.

Taulukko 4. Kalibraatiosarjan standardisuoran parametrit kulmakerroin, korrelaatiokertoimen neliö  $R^2$  ja Y-akselin leikkauspiste, sekä niiden ero nollatestin ja kuljetuksen jälkeisen testin välillä.

Parametri	Kohde	Nollatesti	Kuljetuksen jälkeen	Ero
Kulmakerroin	stx1	-3,39	-3,62	0,23
	stx2	-3,38	-3,61	0,23
	eae	-3,39	-3,55	0,16
	ETEC	-3,51	-3,59	0,08
	Yersinia	-3,41	-3,61	0,20
	Campylobacter	-3,23	-3,38	0,15
	Shigella/EIEC	-3,42	-3,54	0,12
	EAEC	-3,37	-3,56	0,19
	Salmonella	-3,27	-3,41	0,14
$R^2$	stx1	0,998	0,994	-0,004
	stx2	0,998	0,992	-0,006
	eae	0,997	0,997	0,000
	ETEC	0,996	0,989	-0,007
	Yersinia	0,997	0,995	-0,002
	Campylobacter	0,999	0,998	-0,001
	Shigella/EIEC	0,998	0,995	-0,003
	EAEC	0,999	0,995	-0,004
	Salmonella	0,996	0,996	0,000
Y-akselin leikkauspiste	stx1	41,30	41,92	0,62
	stx2	42,17	42,83	0,66
	eae	40,82	41,63	0,81
	ETEC	42,06	42,02	-0,04
	Yersinia	41,49	42,09	0,60
	Campylobacter	41,27	41,40	0,13
	Shigella/EIEC	41,37	41,68	0,31
	EAEC	39,72	40,24	0,52
	Salmonella	40,03	40,30	0,27

Kaikki muut taulukossa 4 esitetyt kalibraatiosarjan standardisuoran parametrit, paitsi ETEC:n korrelaatiokertoimen neliö  $R^2$  kuljetuksen jälkeisessä testissä (merkitty taulukossa 4 punaisella) osuvat yrityksen sisäisiin suuntaa antaviin kriteereihin. Kyseinen poikkeava tulos johtuu todennäköisesti hienoisesta vaihtelusta pipetoinnissa, ja jos qPCR-ajo olisi uusittu, tulos olisi saattanutkin mennä kriteereihin.

Taulukossa 5 on lisäksi nähtävillä CFX-ohjelmasta poimitut CS1-reaktioiden loppupisteen intensiteetti-arvot molemmissa testeissä. Esitetyt tulokset ovat rinnakkaismäärityksiä ja kyseisten arvojen avulla voidaan päätellä lopputuotteen muodostumisen riittävyys, eli myös nämä tulokset antavat tietoa qPCR-ajon suorituskyvystä.

Taulukko 5. CS1-reaktioiden loppupisteen intensiteetti-arvot nollatestissä ja kuljetuksen jälkeisessä testissä.

Kohde	Loppupisteen intensiteetti nollatestissä	Loppupisteen intensiteetti kuljetuksen jälkeen
stx1	3946	3638
	4318	4089
stx2	5416	5020
	5594	5347
eae	3264	3044
	3406	3281
ETEC	8326	8203
	8363	8048
Yersinia	5005	4974
	5035	4930
Campylobacter	8661	8542
	8781	8554
Shigella/EIEC	4832	4865
	5954	5228
EAEC	2263	2270
	2791	2453
Salmonella	4177	4279
	5257	4624
IAC (Cy5)	2488	2346
	1750	1647
	2038	2029
	2515	2502
	1699	1554
	2561	2191

Kaikki taulukossa 5 esitetyt arvot osuvat yrityksen sisäisiin suuntaa antaviin kriteereihin.

Cq-arvot kalibraatio-DNA-standardeille 1–4 (CS1–CS4) sekä positiivisille DNA-kontrolleille (PC) pystyttiin siirtämään CFX-ohjelmasta suoraan Exceeliin taustatason kynnyksärajan määrittämisen jälkeen. Cq-arvot kalibraatio-DNA-standardeille 1–4 nollessa ja kuljetuksen jälkeisessä testissä, sekä ero testien välillä on esitetty taulukossa 6. Esitetyt cq-arvot ovat keskiarvoja rinnakkaismäärytyksistä.



Taulukko 6. Kalibraatio-DNA-standardien CS1–CS4 cq-arvojen keskiarvot ja ero keskiarvojen välillä nollostestissä ja kuljetuksen jälkeen.

Kohde	Näyte	Cq keskiarvo nollostestissä	Cq keskiarvo kuljetuksen jälkeen	Ero
stx1	CS1	24,18	23,70	-0,48
	CS2	27,42	25,15	-2,27
	CS3	30,96	30,46	-0,50
	CS4	33,82	34,13	0,31
stx2	CS1	25,16	24,77	-0,39
	CS2	28,34	28,18	-0,16
	CS3	31,78	31,26	-0,52
	CS4	34,22	34,71	0,49
eae	CS1	23,98	23,60	-0,38
	CS2	27,18	26,97	-0,21
	CS3	30,68	30,13	-0,55
	CS4	33,34	33,83	0,49
ETEC	CS1	25,22	24,89	-0,33
	CS2	28,32	28,00	-0,32
	CS3	31,52	31,10	-0,42
	CS4	34,47	34,38	-0,09
Yersinia	CS1	24,50	24,20	-0,30
	CS2	27,67	27,40	-0,27
	CS3	31,08	30,65	-0,43
	CS4	33,79	34,05	0,26
Campylobacter	CS1	24,99	24,58	-0,41
	CS2	28,08	27,72	-0,36
	CS3	31,23	30,77	-0,46
	CS4	33,92	33,88	-0,04
Shigella/EIEC	CS1	24,41	24,08	-0,33
	CS2	27,52	27,35	-0,17
	CS3	31,06	30,53	-0,53
	CS4	33,99	34,10	0,11
EAEC	CS1	23,19	22,77	-0,42
	CS2	26,34	26,06	-0,28
	CS3	29,86	29,26	-0,60
	CS4	32,83	33,12	0,29
Salmonella	CS1	24,15	23,77	-0,38
	CS2	28,34	26,91	-1,43
	CS3	30,49	30,04	-0,45
	CS4	33,08	33,19	0,11

Taulukosta 6 voi huomata, että nollatestin ja kuljetussimulaation jälkeisen testin cq-arvojen välillä on pientä eroa, keskimäärin arvojen pienenemistä, mutta CS4-reaktioiden kohdalla myös arvojen nousua. Tämä johtuu todennäköisesti hienoisesta vaihtelusta pipetoinnista, ja ajoa tarkemmin katsomalla voi huomata CS4-reaktioiden kaikkien geenikohteiden tulevan hieman jäljessä muihin nähden. Kaikki CS1-reaktioiden cq-arvot, joiden tarkkailuun kriteereissä keskitytään, osuvat kuitenkin suuntaa antaviin yrityksen sisäisiin kriteereihin.

Taulukossa 7 on esitetty positiivisen kontrolli-DNA:n cq-arvot nollatestissä ja kuljetuksen jälkeen, sekä ero testien välillä. Esitetyt arvot ovat keskiarvoja triplikaattinäytteistä.

Taulukko 7. Positiivisen kontrolli-DNA:n (PC) cq-arvot nollatestissä ja kuljetuksen jälkeisessä testissä, sekä ero testien välillä.

Kohde	PC:n cq-arvon ka. nollatestissä	PC:n cq-arvon ka. kuljetuksen jälkeen	Ero
stx1	24,89	24,96	0,07
stx2	25,73	25,85	0,12
eae	27,49	27,61	0,12
ETEC	30,33	30,45	0,12
Yersinia	24,87	24,92	0,05
Campylobacter	28,30	28,34	0,04
Shigella/EIEC	28,31	28,38	0,07
EAEC	30,26	30,31	0,04
Salmonella	30,74	30,66	-0,08

Taulukosta 7 voi huomata positiivisen kontrolli DNA:n cq-arvoissa nollatestin ja kuljetussimulaation jälkeisen testin välillä pieniä eroavaisuuksia, enimmäkseen pientä nousua. Kaikki arvot osuvat kuitenkin suuntaa antavien yrityksen sisäisten kriteereiden sisälle.

Taulukoiden 4–6 tuloksia voidaan käyttää sekä analyysikitin että kalibraatiokitin stabiiliuden arvioimiseen, kun taas taulukon 7 positiivisen kontrolli-DNA:n cq-arvoja voi käyttää ainoastaan analyysikitin stabiiliuden arvioimiseen.

Koska kaikki taulukoissa 4–7 esitetyt kuljetuksen jälkeisen testin tulokset pysyvät edelleen hyvin suuntaa antavien yrityksen sisäisten kriteereiden sisällä, yhtä poikkeusta (kts. taulukko 4) lukuun ottamatta, voidaan todeta, että kuljetus pahimmassa mahdollisessa tapauksessa ei vaikuta Amplidiag® Bacterial GE -testin stabiiliuteen suorituskykyä alentavalla tavalla.

## 7 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli aloittaa Amplidiag® Bacterial GE -testin kokonaisrasituksen stabiiliustutkimus tekemällä qPCR-testille nolla-ajo, sekä tuottamalla myöhemmin stabiiliustestauksessa tutkittaville testikiteille kuljetussimulaatio. Lisäksi yksi testikitti testattaisiin heti kuljetussimulaation jälkeen, jotta nähtäisiin, miten pelkkä kuljetus niin sanotuissa pahimmissa mahdollisissa olosuhteissa vaikuttaa BGE-testin stabiiliuteen.

Työ aloitettiin tekemällä ensimmäiselle testikitille nollapistetestaus. qPCR-ajo tehtiin BGE-testille spesifisen Stability Evaluation -suunnitelman mukaan, suunnitelmassa määrätyissä puhdastiloissa ja suunnitelmassa määriteltyjä välineitä ja laitteita käyttäen. Tämän jälkeen tehtiin kuljetussimulaatio seitsemälle testikitille kuljetuspalvelu Fedexiltä saatujen, pahimpien mahdollisten kuljetusolosuhdetietojen mukaan. Yksi testikiteistä testattiin kuljetussimulaation jälkeen qPCR-ajolla, ja loput testikitit jätettiin odottamaan tulevia testauksia aikapisteissä 6, 12, 18 ja 24 kuukautta kuljetuksen jälkeen.

qPCR-ajojen tulokset analysoitiin manuaalisesti Bio-Rad CFX Manager -ohjelmaa ja Exceliä käyttäen. Tuloksissa tarkasteltiin cq-arvojen lisäksi kalibraatiosarjan standardisuoran parametrejä. Koska Mobidiagilla laadunvalvontaan liittyvät tulokset analysoidaan Bio-Rad CFX Manager -ohjelman lisäksi yrityksen omalla Amplidiag Analyzer -

analyysiohjelmalla, tässä työssä analysoidut tulokset eivät ole verrannollisia yrityksen sisäisiin laadunvalvontakriteereihin. Tuloksia verrattiin kriteereihin kuitenkin suuntaa antavasti.

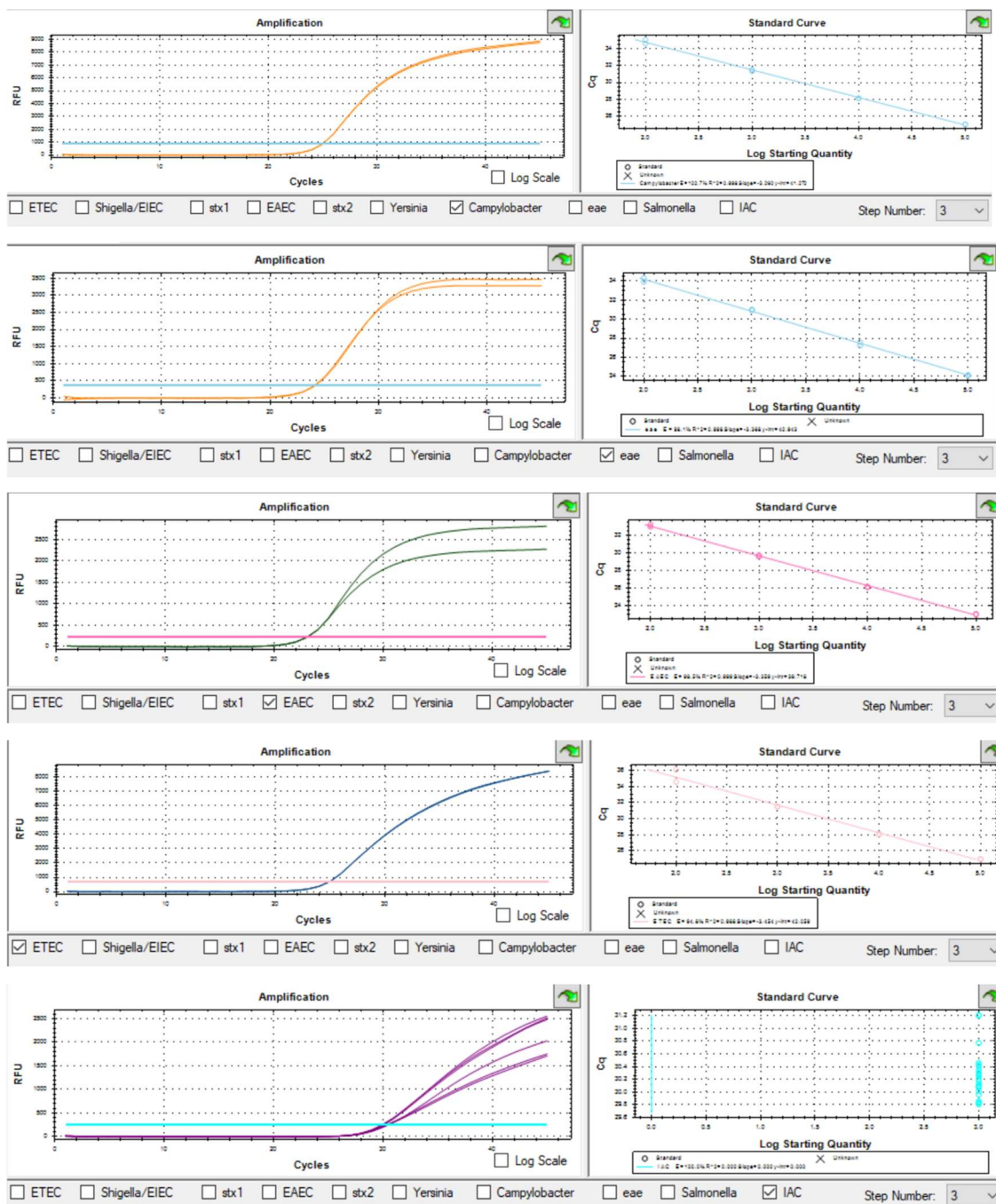
Työssä saatujen qPCR-tulosten perusteella voidaan todeta, ettei kuljetus pahimmassa mahdollisessa tapauksessa vaikuta BGE-testin stabiiliuteen suorituskykyä alentavasti. Kuljetuksen jälkeiset tulokset pysyvät edelleen hyvin suuntaa antavien kriteereiden sisällä, yhtä poikkeusta (taulukko 4) lukuun ottamatta. Kyseinen poikkeama johtuu todennäköisesti hienoisesta vaihtelusta pipetoinnissa, ja jos aikaa ajon uusimiselle olisi ollut, niin tulos olisi todennäköisesti saattanut mennä kriteereihin.

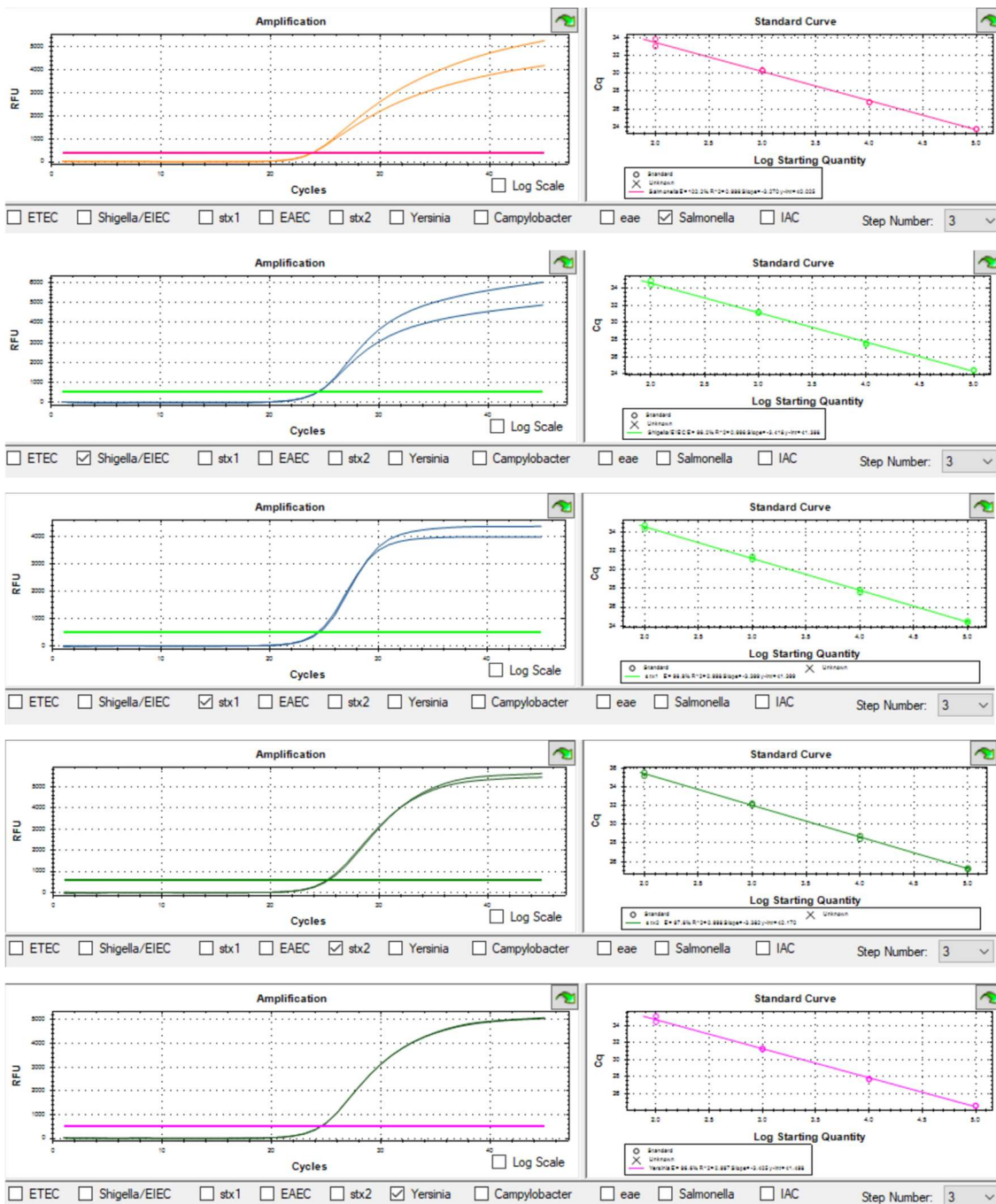
BGE-testin kokonaisrasitusstabiiliustutkimus tulee jatkumaan tulevaisuudessa opinnäytetyössä toteutetun kuljetussimulaation läpi käyneille testikiteille stabiiliussuunnitelmassa määritetyissä myöhemmissä aikapisteissä.

## Lähteet

- 1 SFS-EN ISO 23640. In Vitro Diagnostic medical devices. Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents. 2015. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.
- 2 CLSI. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. CLSI document EP25-A. Wayne, PA. 2009. Clinical and Laboratory Standard Institute.
- 3 Meeting memo. IVD Reagent Stability Studies. 10.12.2020. Mobidiag Oy.
- 4 Bio-Rad Applications Guide: Real-Time PCR Applications Guide. Verkkoaineisto. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>> Luettu 24.3.2021.
- 5 Bio-Rad: Introduction to PCR Primer & Probe Chemistries. Verkkoaineisto. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/introduction-pcr-primer-probe-chemistries?ID=LUSOJW3Q3>> Luettu 24.3.2021.
- 6 Butler, John M. 2012. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.
- 7 PrimeTime qPCR Probes. Verkkoaineisto. Integrated DNA Technologies. <<https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/gene-expression/primetime-qpcr-probes>> Luettu 22.4.2021
- 8 Bio-Rad Applications Guide: Principles and Uses of Multiplex PCR. Verkkoaineisto. <<https://www.bio-rad.com/featured/en/multiplex-pcr.html>>. Luettu 29.3.2021.
- 9 Thermo Fisher Scientific. Real-Time PCR Handbook. Luettu 29.4.2021.
- 10 Amplidiag. Verkkoaineisto. Mobidiag Oy. <<https://mobidiag.com/products/amplidiag/>>. Luettu 18.3.2021
- 11 Kamylobakteerin, salmonella, shigellan ja EHEC-bakteerin aiheuttamat suolistotulehdukset. Verkkoaineisto. Duodecim. Terveyskirjasto. <[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01187](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01187)> Luettu 18.3.2021.
- 12 Amplidiag Bacterial GE Stability Evaluation Plan. Yrityksen sisäinen dokumentti. Mobidiag Oy.
- 13 Katajamäki, Sini. 2021. Associate Scientist, Mobidiag Oy. Sähköpostikeskustelu. 16.4.2021.

Nollatestin amplifikaatio- ja standardikuvaajat







Kuljetuksen jälkeisen testin amplifikaatio- ja standardikuvaajat





