

Toni Toivanen

# Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen (CCHFV) reaaliaikaisen PCR:N evaluointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikka  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Toni Toivanen Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen (CCHFV) reaaliaikaisen PCR:n evaluointi</p> <p>28 sivua + 2 liitettä 12 joulukuuta 2012</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Bioanalytiikka (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Bioanalytiikan koulutusohjelma</p>
<p>Suuntautumisvaihtoehto</p>	
<p>Ohjaajat</p>	<p>Lehtori Hannele Pihlaja Erikoistuva sairaalamikrobiologi, FT Anne Jääskeläinen Sairalamikrobiologi, FT, dosentti Hannimari Kallio-Kokko</p>
<p>Opinnäytetyö tehtiin HUSLABin virologian osastolle. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää kuinka hyvin reaaliaikainen RT-PCR soveltuu Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen (CCHFV) detektoimiseen.</p> <p>Näytteet koostuivat 60:stä oletetusti negatiivisesta potilasnäytteestä, ja 14:sta ENIVD:ltä (European Network for Diagnostics of "Imported" Viral Diseases) saadusta CCHFV-laaduntarkkailunäytteestä (RNA:ta). Potilasnäytteet eristettiin käyttäen QIAamp® Viral RNA-menetelmää (QIAGEN) ja tuotteen monistaminen suoritettiin reaaliaikaiseen RT-PCR-menetelmään pohjautuvalla Stratagene Mx3005P-analysaattorilla. Negatiiviset potilasnäytteet testattiin SYBR Greenia sekä koetinpohjaista menetelmää käyttäen ja laaduntarkkailunäytteet vain koetinpohjaista menetelmää käyttäen. Kyseisten menetelmien herkkyyttä määritettiin käyttämällä Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen kvantitatiivisia positiivikontrolleja, jotka edustivat Kosovo-Hoti –kantaa ja jotka oltiin saatu Robert Koch instituutista Saksasta (RNA:na).</p> <p>Tulokset olivat lupaavia. Negatiivinäytteet olivat negatiivisia, mikä osoittaa sen, että alukkeet oli hyvin suunniteltu. Stratagene Mx 3005P-analysaattori ei monistanut epäspesifistä PCR-tuotetta, ainoastaan primer dimereita. Laaduntarkkailunäytteiden tulokset olivat odotettuja. Koetin oli suunniteltu tunnistamaan yhtä neljästä viruksen genotyypistä ja näin olikin. Tulevaisuudessa tehdään tarvittavat muutokset tekemällä koettimista sekoitus, jolla on mahdollista tunnistaa kaikki neljä genotyyppiä.</p>	

Avainsanat	Reaaliaikainen RT-PCR, Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus

Author Title	Toni Toivanen Evaluation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) using real time PCR assay
Number of Pages Date	28 pages + 2 appendices 12 december 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Anne Jääskeläinen, Specializing Hospital Microbiologist, PhD Hannimari Kallio-Kokko, Hospital Microbiologist, PhD, Dosent
<p>The project was made for the HUSLAB Department of Virology, Helsinki, Finland. The purpose of this project was to evaluate how well a real-time RT-PCR method suited to detect Crimean-Congo hemorrhagic fever virus.</p> <p>The analysed samples consisted of sixty assumed-to-be negative patient samples and fourteen CCHFV quality control RNA-samples received from ENIVD (European Network for Diagnostics of "Imported" Viral Diseases). The patient samples were extracted using the QIAamp® Viral RNA assay (QIAGEN) and duplicating of the product was made with the Stratagene Mx 3005P analyzer which is based on a real-time RT-PCR. The negative patient samples were tested using the SYBR Green, and the probe-based assays and quality control samples were tested using only the probe-based assay. The sensitivity of these methods was measured using quantitative positive Crimean-Congo hemorrhagic fever control RNA-samples which represented Kosovo-Hoti strain which were from Robert Koch Institution Germany.</p> <p>The results were promising. The negative samples were negative which showed that primers were designed well. Stratagene Mx3005P did not duplicate non-specific PCR products, only primer dimers. The quality control sample results were as expected. The probe was designed to detect one of the four genotypes of the virus, and so it did. In the future, some changes are made to make a probe mix that would detect all four genotypes.</p>	
Keywords	real-time RT-PCR, Crimean-Congo hemorrhagic fever

## Sisällys

Johdanto	1
1 Verenvuotokuumevirukset	2
1.1 Nairovirukset	4
1.2 Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus	5
1.2.1 Oireet ja hoito	8
1.2.2 Diagnosointi	9
2 Polymeraasiketjureaktioiden perusteet	10
2.1 Polymeraasiketjureaktio – PCR	10
2.2 Käänteistranskriptiointi	11
2.3 Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio	11
2.4 SYBR Green I Dye	12
2.5 Koetinpohjaiset reaaliaikaiset PCR-menetelmät	13
3 Työturvallisuus geenimonistustöissä	13
4 Materiaalit ja menetelmät	14
4.1 Näytteet	15
4.2 RNA:n eristäminen	16
4.1 PCR-seos SYBR Green I dye:ta varten	16
4.2 PCR-seos koetinta varten	17
5 Tulokset ja tulosten tarkastelu	17
6 Tutkimusasetelma	21
7 Luotettavuuden arviointi	23
8 Pohdinta	23
Liitteet	
Liite 1. ENIVDin laaduntarkkailunäytteiden tulokset	
Liite 2. Negatiivipaneelin tulokset SYBR Green ja koetin	

## Johdanto

Työn tilaajana oli HUSLABin kliinisen mikrobiologian virologian ja immunologian osasto sekä Helsingin yliopiston, Haartman-instituutissa toimiva zoonoosi-virusryhmä. Työn tarkoituksena oli testata reaaliaikaisen RT-PCR:n toimivuutta Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen detektoinnissa ja parantaa infektiöhälytysvalmiutta. Detektoinnilla tarkoitetaan viruksen geneettisen materiaalin osoittamista näytemateriaalista.

Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus voi aiheuttaa vakavan sairauden ihmisillä ja sitä esiintyy Turkissa, Afrikan maissa, Bulgariassa, Venäjällä, Kreikassa ja Välimeren mais-  
sa, mutta myös Suomella on oltava valmiudet viruksen määrittämiseksi. Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus –kantojen suuren genettisen vaihtelun vuoksi useimmat RT-PCR-menetelmät eivät ole riittävän herkkiä, kattavia tai pysty havaitsemaan spesifejä juosteita. (Escafadal ym. 5).

Ennen analysointia näytteet käsitellään siten, että ne eivät sisällä infektiivistä virusta. Infektiivisen viruksen viljely ja kasvattaminen vaatisi BSL-4 (Bio-safety level 4) luokituksen omaavan turvalaboratorion ja lähin BSL-4 turvalaboratorio sijaitsee Tukholmassa. Viruksen inaktivointi voidaan puolestaan tehdä BSL-3-tason turvalaboratoriossa ennen esim. viruksen genomien eristämistä. Näytteiden käsittelyssä on silti noudatettava suurta huolellisuutta, koska aina on olemassa pieni riski, että näyte ei ole menettänyt infektiivisyyttään täysin.

Tässä työssä näytteistä eristetty RNA monistettiin käyttäen reaaliaikaista RT-PCR:ä, joka suoritettiin Stratagene Mx3005P-analysointilaitteella, jonka toiminta perustuu fluoresenssin havaitsemiseen monistuneesta tuotteesta. Näytteet tulivat HUSLABin virologian ja immunologian zoonoosi-laboratoriosta. Työn ohjaajina HUSLABin puolelta toimivat Hannimari Kallio-Kokko ja Anne Jääskeläinen. Koulun puolelta ohjaajana toimi Hannele Pihlaja.

## 1 Verenvuotokuumevirukset

Viraaliset verenvuotokuumeet ovat ryhmä sairauksia, jotka aiheutuvat useiden eri virusperheiden viruksista. Näihin kuuluu edustajia mm. arenaviruksista (mm. Lassavirus), filoviruksista (mm. Ebola- ja Marburg-virukset), nairoviruksista (mm. Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus), hantaviruksista (mm. hantaanvirus) ja flaviviruksista (mm. keltakuumevirus ja denguevirus). Termiä viraalinen verenvuotokuume käytetään kuvaamaan vakavaa multisysteemistä syndroomaa, joka vaikuttaa useisiin eri elimiin. Tyypillisesti verenkiertoelimistö vaurioituu ja elimistön toimintakyky heikkenee. Tähän liittyy usein myös verenvuotoa. Jotkin verenvuotokuumevirukset aiheuttavat verraten lieviä sairauksia, mutta on myös monia viruksia, jotka aiheuttavat vakavan, hengenvaarallisen sairauden. (Viral Hemorrhagic Fever(s).)

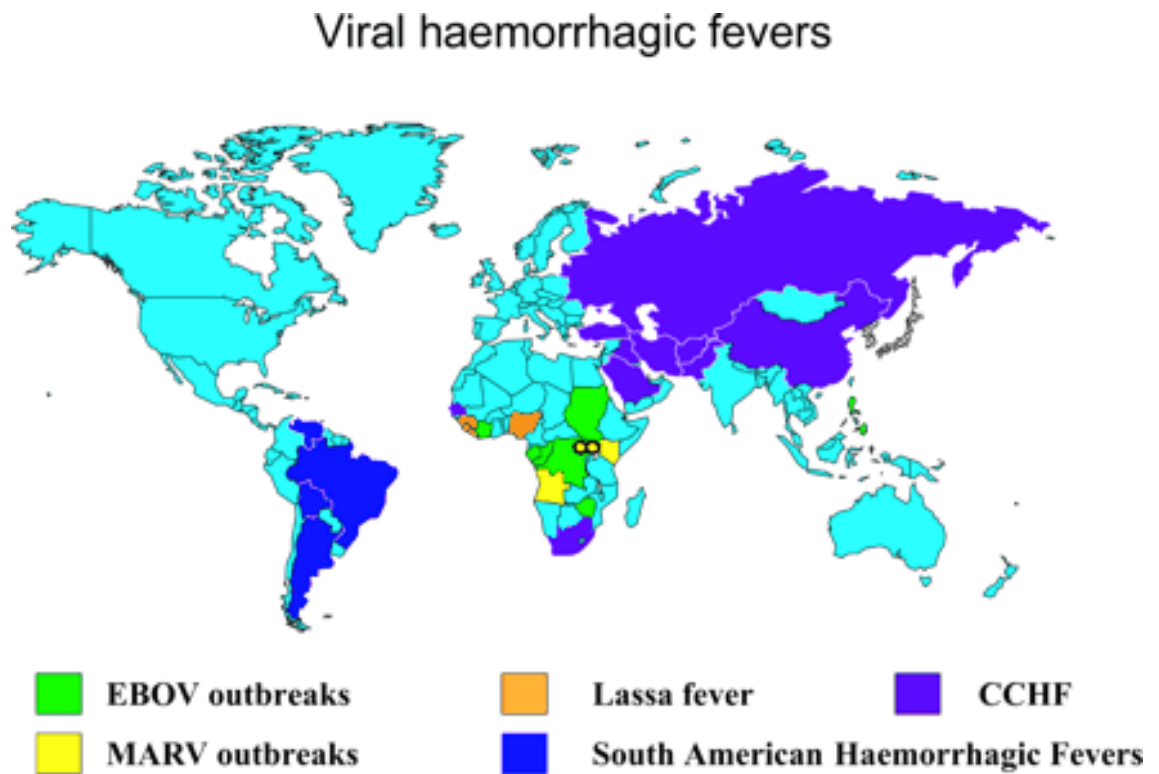
Verenvuotokuumevirusten eri perheiden jäsenillä on useita yhtäläisyyksiä:

Ne ovat kaikki RNA-viruksia ja niitä suojaa lipidikalvo. Niiden selviytyminen riippuu eläin- tai hyönteisisännästä, joita kutsutaan luontaisiksi varastoiksi.

Nämä virukset ovat maantieteellisesti rajoittuneet alueille, joilla niiden isäntälajit elävät.

Ihmiset eivät ole näiden virusten luontainen varasto, vaan infektoituvat joutuessaan kosketuksiin virusta kantavien isäntäeliöiden kanssa. Joidenkin virusten tapauksissa myös ihminen voi tartuttaa viruksen toiseen ihmiseen. Virusten leviämistä on hankala ennustaa. Joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta parannuskeinoja tai vakiintunutta lääkettä verenvuotokuumeviruksiin ei ole. (Viral Hemorrhagic Fever(s).)

Oheinen kuvio (kuvio 1) osoittaa verenvuotokuumevirusten levinneisyyden vuonna 2005.



Kuvio 1. Verenvuotokuumevirusten levinneisyys vuonna 2005. (Lessons from nosocomial viral haemorrhagic fever outbreaks 2012). (EBOV= Ebolavirus, MARV= Marburg-virus, CCHF= Krimin Kongon verenvuotokuumevirus)

Alla olevasta taulukosta (taulukko 1) nähdään yleistä tietoa muutamista vektorivälitteisistä verenvuotokuumeviruksista.

Taulukko 1. Vektorivälitteiset verenvuotokuumevirukset. (Vector-borne diseases; CBRNE – Viral Hemorrhagic Fevers).

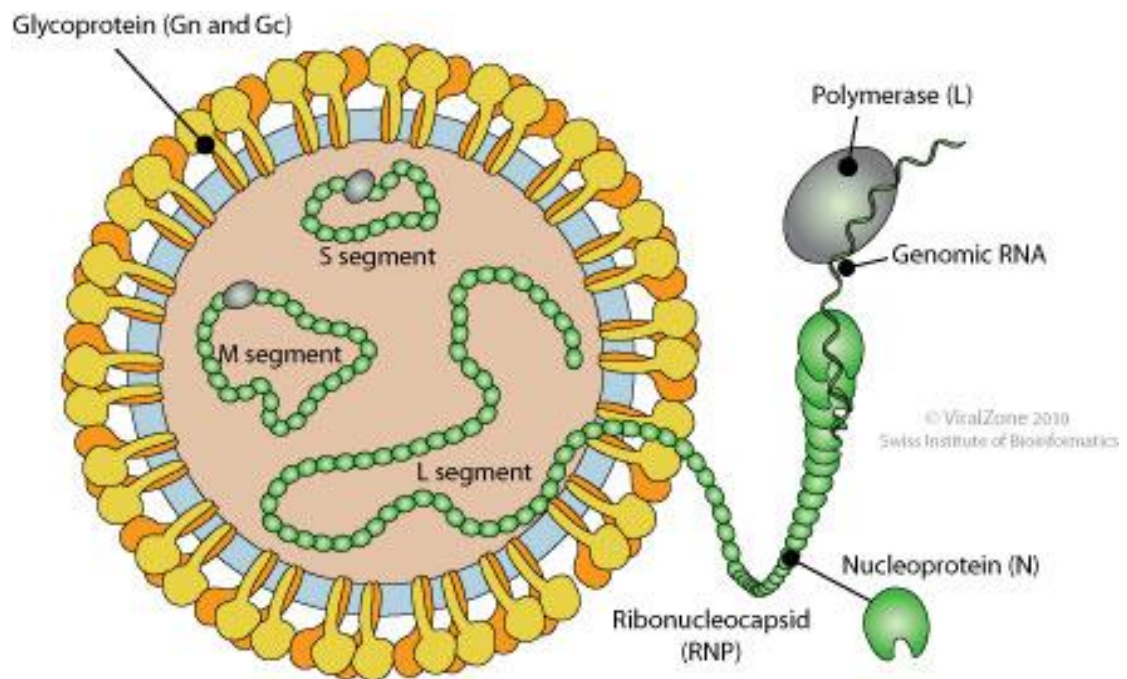
Virussuku	Virusryhmä	Sairaus / Virus	Vuosittaiset tapaukset	Levinneisyys	Vektori	Isäntäeläimet
Bunyaviridae	Nairovirus	Krimin-Kongon verenvuotokuume / Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus (CCHFV)	1000	Eurooppa, Aasia, Afrikka	puutiaiset (Hyalomma)	jänikset, varikset, lehmät, strutsit
Bunyaviridae	Phlebovirus	Rift Valleyn kuume / Rift Valley virus	10 000	Afrikka	Culex pipiens, Ae africanus, Anopheles	lampaat, karja, kamelit
Flaviviridae	Flavivirus	Keltakuume / Keltakuumevirus	200 000 ennen rokotusten aloittamista	Afrikka, Pohjois-Amerikka	Ae aegypti ja muut, Haemagogus	Apinat
Flaviviridae	Flavivirus	Denguekuume / Denguevirukset 1-4	250 000 – 500 000	Aasia, Amerikka, Afrikka	Ae aegypti ja muut, Haemagogus	-

### 1.1 Nairovirukset

Vielä vuosikymmen sitten nairovirukset olivat vähiten ymmärrettyjä Bunyavirusten heimon kuuluvia jäseniä. Tänä päivänä tilanne on täysin toisenlainen, johtuen suurista maailmalla tapahtuneista edistysaskeleista. Lisäksi on löydetty kaksi uutta virusta, joita ovat Kupevirus ja Finch Creek- virus. Virusten manipuloinnin vaikeus käänteisgeneettisin menetelmin on vaikeuttanut viruksen transkriptio- ja replikaatiomekanismien selvittämistä, ja yksittäisten geenien toiminnan ymmärtämistä. (Frias-Staheli – Medina – Bridgen 2011: 129.)

Nairovirukset ovat pieniä, vaipallisia viruksia, jotka ovat halkaisijaltaan suurin piirtein 100 nm. Nairoviruksen genomi koostuu yksijuosteisesta negatiivisäikeisestä RNA:sta,

joka on jakautuneena kolmeen segmenttiin. Niitä kutsutaan pieneksi (S), keskikokoiseksi (M) ja suureksi (L). Näiden segmenttien koko on yhteensä noin 12 000 emäspäriä. S-segmentti koodittaa nukleokapsidiproteiinia, M kahta pinnallista glykoproteiinia ja L polymeerasiproteiinia. Oheinen kuva (kuvio 2) havainnollistaa nairoviruksen rakenteen. Nairovirukset muodostavat yhden perheen Bunyavirusten heimon sisällä. Ne siirtyvät isännästä toiseen puutiaisten välityksellä. Tähän sukuun on luokiteltu kolmekymmentäkuusi virusta ja ne on luokiteltu yhteen seitsemästä seroryhmästä bunyavirusehimon sisällä perustuen hemagglutinaation estämiseen (HI), neutralisaatiotesteihin ja hiljattain myös molekyyliidataan. Nairoviruksista kaksi on vaarallisia patogeenejä: Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus ja Nairobin lammasvirus. (Frias-Staheli ym. 2011: 129.)



Kuvio 2. Nairoviruksen rakenne (Nairovirus).

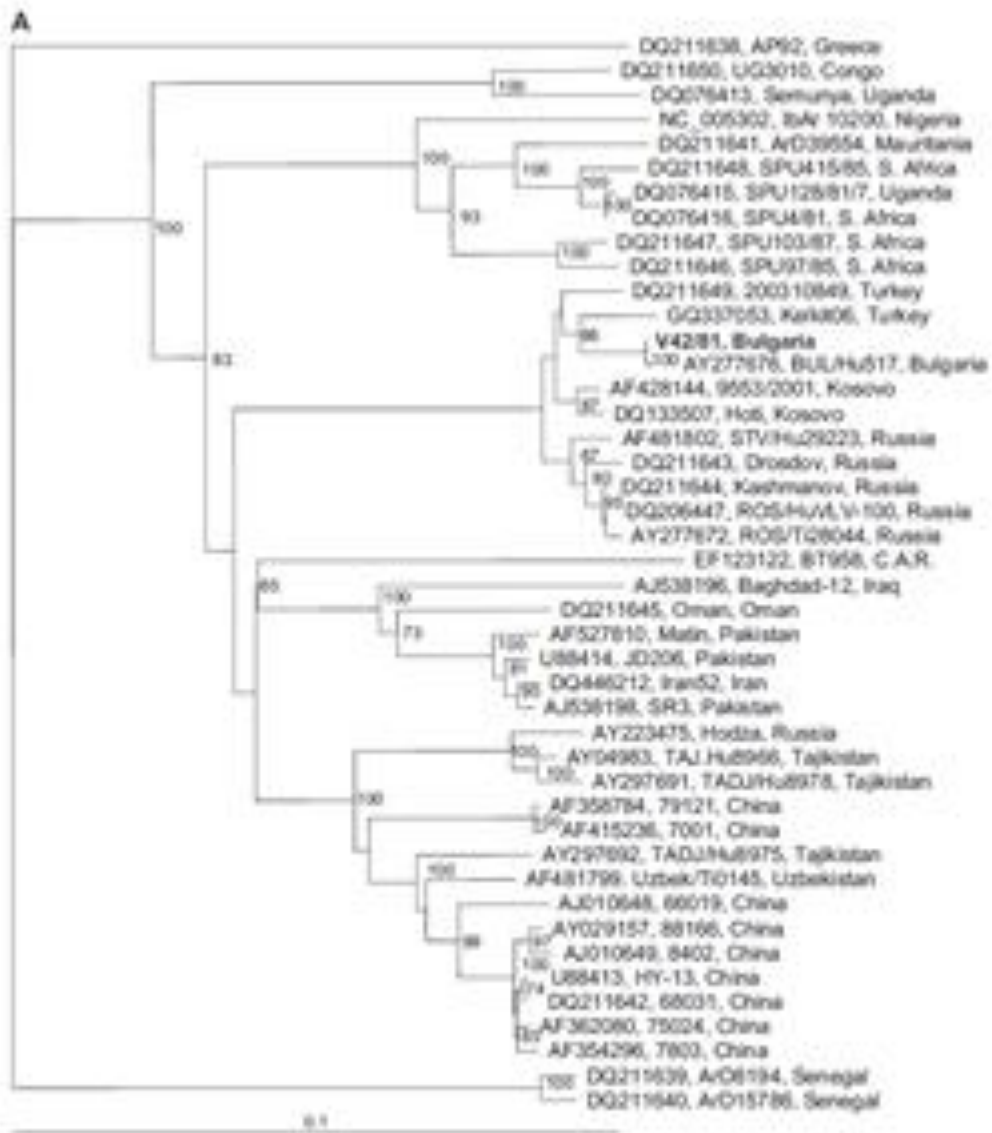
## 1.2 Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus

Krimin-Kongon verenvuotokuume aiheutuu viruksesta, joka kuuluu Nairovirusten perheeseen, joka puolestaan kuuluu Bunyavirusten heimoon (Atkinson ym. 2012: 1). Kyseessä on alun perin zoonoosivirus eli eläimestä ihmiseen tarttuva virus, mutta on myös havaittu harvinaisia, ihmisperäisiä tartuntoja. Sairaus on endeeminen monissa Afrikan maissa, Euroopassa ja Aasiassa. Vuodesta 2001 lähtien tartuntoja on rekiste-

röity Kosovossa, Albaniassa, Iranissa, Pakistanissa ja Etelä-Afrikassa. (Crimean-Congo haemorrhagic fever.)

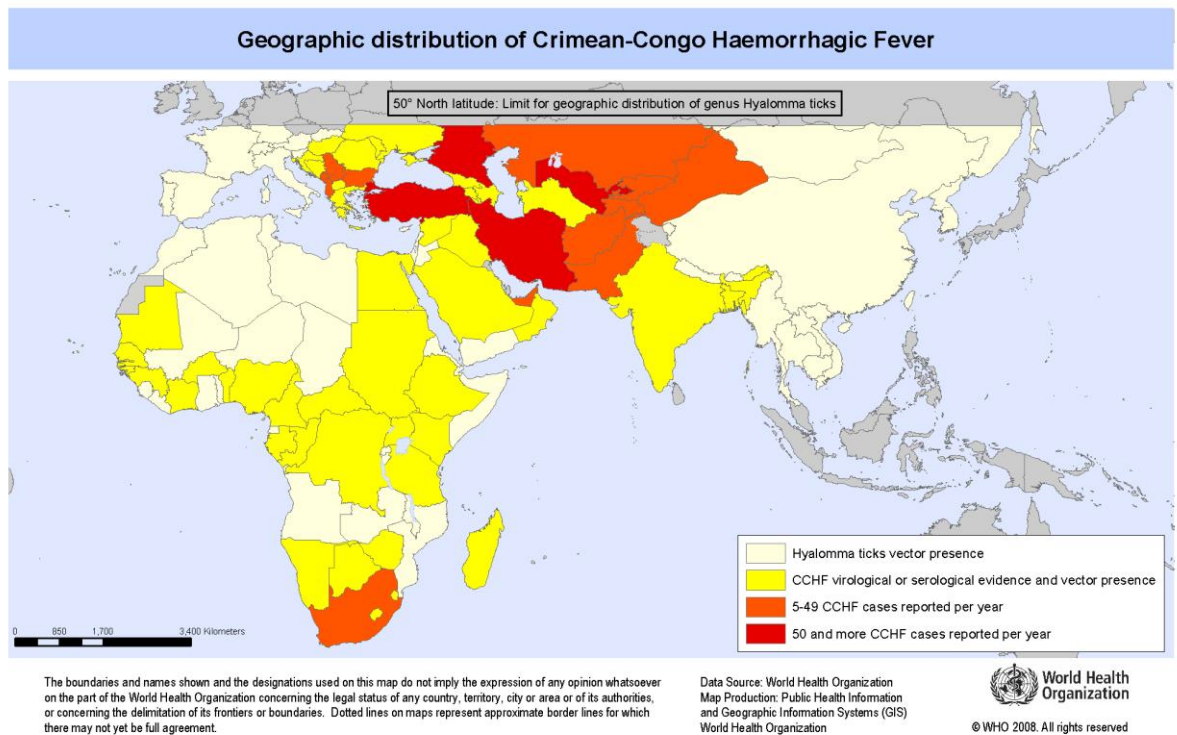
Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus havaittiin ensimmäisen kerran Krimeassa vuonna 1944. Vuonna 1969 havaittiin, että patogeeni joka aiheuttaa Krimin-Kongon verenvuotokuumeen oli sama kuin vuonna 1956 tunnistetussa viruksessa Kongossa. Näiden kahden paikan linkkittyminen toisiinsa johti viruksen nimeämiseen. (Crimean-Congo haemorrhagic fever.)

Oheisissa kuviossa (kuvio 3) on Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen S-segmentin fylogeneettinen sukupuu.



Kuvio 3. Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen S-segmentin fylogeneettinen sukupuu. (Papa – Papadimitriou – Christanova 2011).

Kuvio 4 havainnollistaa Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen levinneisyyden maailmalla vuonna 2008. Valkoiset alueet ovat alueita, joissa Hyalomma-sukuiset puutiaiset ovat läsnä; keltaiset alueet ovat alueita virusta mahdollisesti esiintyvä ja joilla vektoria on läsnä; oranssit alueet ovat alueita, joilla on todettu vuosittain 5 – 49 CCHF-tapausta; ja punaiset alueet ovat alueita, joilla on todettu yli 50 CCHF-tapausta vuosittain.



Kuvio 4. Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen levinneisyys maailmalla. Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF)).

### 1.2.1 Oireet ja hoito

Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus siirtyy ihmisiin pääosin Hyalomma-sukuisten puutiaisten välityksellä, mutta myös suora tartunta vireemisten isäntäeläinten veren tai kudosten välityksellä on mahdollinen tai jopa suoraan sairastuneen ihmisen eritteiden/veren välityksellä. Ihmisillä Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus aiheuttaa tyypillisesti äkillisen, korkean kuumeen puhkeamisen, huonovointisuutta, pahoja päänsärkyjä mutta myös vakavia ruoansulatuselimistön oireita. Sairauden myöhäisvaiheessa voidaan havaita merkittäviä verenvuotoja kuolleisuusprosenttien ollessa 10–50. (Cri-

mean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness 2010.)

Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen hoito on pääosin supportiivista. Hoidossa tulisi kiinnittää huomiota nestetasapainon tarkkailuun, elektrolyyttien epänormaaliuden korjaamiseen, hapetukseen, hemodynaamiseen eli veren virtaukseen liittyvään hoitoon ja sekundaari-infektioiden asianmukaiseen hoitoon. Antiviraalista lääkettä ribaviriinia on käytetty vakiintuneen Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen hoidossa ja sillä on saavutettu näkyviä tuloksia osalla potilaista. Sekä oraaliset että suonensisäiset yhdisteet on havaittu tehokkaiksi. (Crimean-Congo haemorrhagic fever; Crimean-Congo Hemorrhagic Fever 2012.)

### 1.2.2 Diagnosointi

Epäiltäessä Krimin-Kongon verenvuotokuumevirusta diagnosointi suoritetaan erityisvarustelluissa, korkean turvallisuustason luokituksen omaavissa laboratorioissa. (Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness 2010.) Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus detektoidaan usein verinäytteestä reaaliaikaisen RT-PCR-menetelmän avulla. Kyseinen menetelmä on todella herkkä. Suuren geneettisen vaihtelun johdosta Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen juosteissa vaaditaan useita alukkeita kaikkien genotyyppien detektoimiseksi. (Crimean-Congo Hemorrhagic Fever 2007.)

Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen antigeenejä (virusproteiineja) voidaan detektoida useiden immunologisten menetelmien avulla. Virusperäisiä antigeeneja voidaan joskus havaita kudospäätteissä käyttämällä immunofluoresenssia tai EIA:ta. Artikkelissa Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein antigens käytettiin antigeenien detektoimiseen kahta menetelmää käyttäen polyklonaalisia vasta-aineita, jotka oltiin eristetty joko ihmisen plasmasta tai hyperimmunisoidun hevosen seerumista. Ensimmäinen menetelmä oli western blot (menetelmä, jossa erilaiset molekyylit erotellaan kokonsa mukaan sähkökentässä), jossa käytettiin polyklonaalisia ihmisen vasta-aineita ja toinen ELISA, jossa käytettiin hevosen vasta-aineita (Bagriacik – Albayrak – Uslu – Ertek 2010. 38.19.)

IgG- ja IgM-luokan vasta-aineita voidaan havaita kuuden päivän sisällä oireiden alkamisesta käyttämällä entsyymipohjaisia immunokemiallisia menetelmiä, joita ovat esi-

merkiksi ELISA ja EIA. IgM-luokan vasta-aineet säilyvät havaittavissa jopa neljä kuukautta ja IgG-luokan vasta-aineet heikkenevät, mutta säilyvät jopa viisi vuotta. (Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness 2010.)

Potilaat, joilla on kuolettava sairaus, eivät yleensä ehdi kehittämään mitattavissa olevaa vasta-ainevastetta ja näillä yksilöillä, samoin kuin potilailla joilla sairaus on kestänyt muutaman päivän, diagnoosi saavutetaan havaitsemalla virusta verestä tai kudospnäytteistä. Virusta voidaan eristää veri- tai kudospnäytteestä sairauden ensimmäisten päivien aikana kasvattamalla soluviljelmässä BSL4-laboratoriossa. (Crimean-Congo hemorrhagic fever.)

## 2 Polymeraasiketjureaktioiden perusteet

### 2.1 Polymeraasiketjureaktio – PCR

On mahdollista, että millään muulla menetelmällä ei ole ollut yhtä suurta vaikutusta molekyylibiologiassa kuin PCR:llä. Tämän tekniikan avulla voidaan nopeasti havaita virus tai geeni, jopa silloin, kun saadussa kudoksessa on vain muutama solu, jotka sisältävät mielenkiinnon kohteena olevaa DNA-sekvenssiä. (Nuovo 1994: 1.)

Käytettäessä PCR-menetelmää eristetään potilasnäytteessä oleva nukleiinihappo tai näytettä käsitellään, jonka jälkeen tutkimuskohteena olevaa DNA-juostetta monistetaan entsymaattisesti. Tuote tunnistetaan monistuksen jälkeen joko emäsjärjestyksen pohjalta hybridisaatiolla käyttäen spesifistä koetinta tai kokonsa perusteella agarosigeelissä. (Lappalainen ym. 1999: 1031.)

Käytettäessä PCR-menetelmää täytyy kohdegeenin emäsjärjestys olla tiedossa, jotta alukkeet, joita käytetään monistettavassa DNA-jaksossa voidaan suunnitella optimaalisesti. DNA-polymeraasi, rakentaa uuden DNA-säikeen alukkeiden väliseltä alueelta. PCR:ssä toistuvia vaiheita ovat DNA-säikeiden erotus toisistaan, alukkeiden pariutuminen vastinalueidensa kanssa ja DNA:n kopiointi. Kaikki nämä vaiheet vaativat eri lämpötilan. PCR-menetelmä vaatii automaattisen lämmitys- ja jäähdytyslaitteen, joka ohjelmoidaan siten, että se toistaa tarvittavat lämpötilasyklit kymmeniä kertoja peräkkäin. Monistuksen tuloksena syntyy aluke-rajoitteinen DNA-jakso, joka monistuu eksponenti-

aalisesti. Monistettavan genomien ollessa RNA:ta on siitä ensin syntetisoitava vastin-DNA:ta jota monistetaan. (Lappalainen ym. 1999: 1031.)

Uuden PCR-testin käyttöönotto alkaa testin suunnittelulla, eli alukkeiden suunnittelulla sekä valitsemisella ja PCR-sykliden eri vaiheiden optimilämpötilojen määrittämisellä alukkeiden mukaan. DNA-sekvenssi luetaan molemmista juosteista 5′–3′-suuntaisesti. Varsinainen PCR alkaa denaturaatiolla. DNA denaturoidaan, eli juosteet erotetaan toisistaan  $\geq 94$  °C:ssa, jonka jälkeen lämpötila lasketaan, jotta alukkeet pystyvät kiinnittymään templaattiin. Lämpötila riippuu oligonukleotidien sulamispisteistä, jotka on valittu PCR-tuotteen monistamista varten. Tätä kutsutaan annealing-reaktioksi. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet vähän aikaa, lämpötila nostetaan noin 72°C:een, jolloin reaktioseoksessa oleva DNA-polymeraasi alkaa liittää nukleotideja alukseen 3′-päästä lähtien templaatin mallin mukaan (pidennysreaktio). (Nuovo 1994: 40; PCR Optimization: Reaction Conditions and Components; Suominen – Ollikka 1999: 107–108.)

## 2.2 Käänteistranskriptointi

Käänteistranskriptointi on prosessi, jossa yksijuosteinen RNA käännetään komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käyttäen totaalisellulaari RNA:ta, käänteistranskriptioentsyymiä, aluketta, dNTP:siä tai RNAasi-inhibiittoreita. Valmista cDNA:ta voidaan käyttää RT-PCR-reaktiossa. (Reverse Transcription (RT) cDNA Synthesis 2012.)

## 2.3 Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio

Reaaliaikaisen PCR:n avulla voidaan nimensä mukaisesti seurata PCR-reaktion etenemistä reaaliajassa. Menetelmän avulla voidaan määrittää suhteellisen pieni määrä PCR-tuotetta (DNA:ta, cDNA:ta tai RNA:ta). Reaaliaikainen PCR pohjautuu reportterimolekyylin fluoresenssin havaitsemiseen, mikä kasvaa reaktion edetessä. Tämä havainnollistaa PCR-tuotteen lisääntymistä jokaisessa monistussyklissä. Nämä fluoresoivat reportterimolekyylit sisältävät väriä, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han tai sekvenssispesifisiin koettimiin. Reaktio voi lähteä liikkeelle hyvin pienillä määrillä nukleinihappoja ja lopputuote voidaan määrittää tarkasti. (Hunt.)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä alukkeiden optimaalinen kiinnittymislämpötila voidaan määrittää käyttämällä sulamislämpötila-analyysiä. Analyysin suorittamista varten tarvitaan

komplementaarisia alukkeita. Sulamislämpötila-analyysi paljastaa alueen, jolla sitoutuminen alukkeiden välillä tapahtuu. (Fraga – Meulia – Fenster 10.3.9.) Sulamislämpötila-analyysi määritetään analysaattoreiden avulla. PCR-reaktio etenee niin, että 1. ohjelman lopuksi lämpötila lasketaan 5 °C alukkeiden kiinnittymislämpötilan yläpuolelle, jolloin kaksijuosteiset DNA-säikeet pariutuvat. Seuraavaksi lämpötilaa nostetaan 0,1 °C :seen sekunnissa. Mikäli monistumista tapahtuu vain yhden tuotteen kohdalla, fluoresenssisignaali putoaa tuotteen avautuessa ja tämä sulamislämpötila määritetään. Ohjelman lopussa on kuumennusvaihe, joka on 2-3 °C:tta alle määritetyn sulamislämpötilan. Tämä johtaa siihen, että haluttu monistustuote säilyy kaksijuosteisena lähettäen fluorisoivaa signaalia, kun taas lyhyet, epäspesifiset tuotteet sulavat. (Walker, John M – Rapley, Ralph (Eds.).)

#### 2.4 SYBR Green I Dye

Menetelmässä pienet molekyylit, jotka sitoutuvat kaksijuosteiseen DNA:han voidaan jakaa kahteen luokkaan: Interkalaattoreihin ja Minor-groove-sitajiin (MGB). Sitoutumistavasta riippumatta menetelmälle on kaksi edellytystä, jotta PCR-tuotteen reaaliaikainen havaitseminen on mahdollista. Nämä ovat fluoresenssimolekyylien sitoutuminen kaksijuosteiseen DNA:han ja se että PCR:n inhibitiota ei tapahdu. (TaqMan® and SYBR® Green Chemistries 2011.)

Lisättäessä SYBR Green I dye näytteeseen, se sitoutuu välittömästi kaikkeen näytteessä olevaan kaksijuosteiseen DNA:han. PCR:n aikana DNA-polymeraasi monistaa kohteen sekvenssiä, joka synnyttää PCR-tuotteita. SYBR Green I dye sitoutuu jokaiseen uuteen kaksijuosteiseen DNA-kopioon. Reaktion edetessä syntyy lisää PCR-tuotetta. Tulos havaitaan fluoresenssin intensiteetin kasvamisena, joka on suhteessa tuotetun PCR-tuotteen määrään. (TaqMan® and SYBR® Green Chemistries 2011.)

Menetelmän etuna on, että sitä voidaan käyttää minkä tahansa kaksijuosteisen DNA-sekvenssin vahvistamiseen. Menetelmä ei vaadi koetinta. Tämä vähentää aikaa, joka kuluu menetelmän pystyttämiseen ja se tulee myös halvemmaksi. Menetelmän haittana on, että se voi tuottaa vääriä positiivisia signaaleja. Tämä siksi, koska SYBR Green I dye sitoutuu mihin tahansa kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin se voi myös sitoutua epäspesifeihin kaksijuosteisiin DNA-sekvensseihin. (TaqMan® and SYBR® Green Chemistries 2011.)

## 2.5 Koetinpohjaiset reaaliaikaiset PCR-menetelmät

DNA-koettimet, jotka sisältävät esimerkiksi konjugoidun minor groove-sitojan muodostavat äärimmäisen vakaita komplekseja yksijuosteisten DNA-säikeiden kanssa, mikä sallii lyhyempien koettimien käytön hybridisaatioon perustuvissa menetelmissä (Kutyavin ym. 2000: 655).

Koettimen periaatteena on, että se sisältää 5'-päässä olevaa fluoresoivaa merkkiainetta, sisäisen, fluoresenssin vaimentavan merkkiaineen ja 3'-päässä olevan minor groove-sitojan (MGB). Fluoresenssienergian siirtyminen (FRET) vaimentaa ehjän koettimen fluoresenssin. Alukkeiden pidentymisvaiheen aikana hybridisoitu koetin hajoaa Taq-polymeraasin 5'-pään eksonukleaasiaktiivisuuden johdosta ja fluoresenssisignaali vapautuu. Yksijuosteisen koettimen fluoresenssia PCR:n aikana seurataan reaaliajassa menetelmää varten suunniteltujen laitteiden avulla. MGB nostaa sulamislämpötilaa mahdollistaen lyhyempien, sekvenssispesifisempien alukkeiden käytön. (Kutyavin ym. 2000: 658.)

## 3 Työturvallisuus

Turvallisuusluokitus laboratorioissa (BSL 1-4) määräytyy siellä käsiteltävien mikro-organismien mukaan (riskiluokat 1-4). Tapaturmien raportointi, sairastuvuuden seuranta ja kaikkien työntekijöiden tietoisuus siitä kuinka tärkeää turvalliset työtavat ovat kuuluvat asiaan. (Haakana – Pakkala 2003: 826.)

HUSLABin kliinisen mikrobiologian virologian osastolla PCR-työskentelyssä noudatetaan suurta huolellisuutta ja mahdolliset kontaminaatioreitit on pyritty katkaisemaan suorittamalla PCR-seoksen teko, nukleiinihapon eristys ja itse PCR-reaktio eri huoneissa. DNA:n monistusmenetelmät ovat erityisen herkkiä monistustuotteen aiheuttamalle kontaminaatiolle. Vääriä positiivisia tuloksia voi seurata huolimattomien työtapojen ja kontaminoituneiden pipettien välityksellä. (Piiparinen ym. 1999: 1033.)

Näytteitä pipetoitaessa näyteputket avataan Mekasoft-palaa käyttäen. Mekasoft imee korkista mahdollisesti roiskuvan nesteen itseensä. Näin vältetään siltä, että korkin roiskeet kontaminoisivat muita näytteitä. Pipetoinnissa käytetään suodattimellisia pipetin-

kärkiä ja kärki vaihdetaan jokaisen näytteen pipetoinnin välillä. Eri puskureiden välillä kärki aina vaihdetaan.

BSL4-laboratoriossa käsitellään riskiryhmään 4 kuuluvia mikrobeja, jotka voivat aiheuttaa ihmiselle kuolettavan infektion. Riskiryhmään 4 kuuluu esim. Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus. Kaikki suojaustoimet laboratoriossa tähtäävät siihen, että infektion leviäminen estetään. (Haakana – Pakkala 2003: 827.) CCHF-epäilytapauksissa potilasnäytteet voidaan inaktivoida BSL3-tason laboratoriossa PCR-analysointia varten. Virusviljely voidaan suorittaa ainoastaan BSL4-tason laboratoriossa, lähin BSL4-laboratorio sijaitsee Tukholmassa Smittskyddsinstitutet:ssa.

#### **4 Materiaalit ja menetelmät**

HUSLABin kliinisen mikrobiologian virologian yksikössä Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen käytetään yliopiston viruszoonosilaboratorion kanssa yhteistyössä tehtävää reaaliaikaista RT-PCR-menetelmää. Näytteiden PCR-ajoihin käytetään Stratagene Mx3005P-analysointia. Käytin tutkimuksessani kahta erilaista reaaliaikaisen RT-PCR:n detektiomenetelmää, joita olivat SYBR Green ja koetin.

Negatiivipaneelin näytteet kerättiin HUSLABin kliinisen mikrobiologian virologian ja immunologian zoonoosi-laboratoriosta. Negatiivipaneelin näytteet käsiteltiin anonyymisti koodattuina ja niiden avulla haluttiin selvittää aiheuttavatko ne epäspesifistä monistumista detektoitaessa Krimin-Kongon verenvuotokuumevirusta reaaliaikaisen RT-PCR-menetelmän avulla. CCHFV-positiivikontrollinäytteinä käytettiin ulkoiseen laaduntarkkailuun tarkoitettuja kvantitatiivisia näytteitä, jotka edustivat Kosovo-Hoti -kantaa. Positiivikontrollit oli saatu valmiina RNA:na saatu Robert Koch instituutista Saksasta. Näiden lisäksi käytettävissä oli 14 CCHFV-laaduntarkkailunäytettä ENIVD:ltä. Kyseessä oli kliinisen mikrobiologian virologian osaston kaikkien aikojen ensimmäinen Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen laaduntarkkailunäytepaneeli, joten näytteitä tuli käsitellä todella huolellisesti. Laaduntarkkailunäytteet edustivat neljää eri genotyyppiä ja ne olivat valmista RNA:ta, joten ainoastaan negatiivipaneelin näytteet tuli eristää detektoimista varten.

#### 4.1 Näytteet

Negatiivipaneelin näytteisiin kuului 20 kappaletta TBEV-IgM-positiivisia näytteitä, 20 kappaletta denguevirus-IgM-positiivisia näytteitä ja 20 kappaletta denguevirus-negatiivisia näytteitä. Näytteet oltiin numeroitu edellä mainittua vastaavassa järjestyksessä. T1-T20-näytteet edustivat TBEV-IgM-positiivisia, D1-D20-näytteet dengue-IgM-positiivisia ja N1-N20-näytteet dengue-negatiivisia

Negatiivipaneelin näytteet analysoitiin kolmessa erässä siten, että yhden päivän aikana ajettiin ja eristettiin 20 näytettä. Jokaiseen näytesarjaan kuului ajettavien näytteiden lisäksi kaksi PCR-eristysvettä ja kaksi kvantitatiivista CCHFV-positiivikontrollia. Ensimmäinen eristysvesi lisättiin kuoppalevyille ultrapuhtaassa huoneessa ja toinen näytteenkäsittelytilassa. Eristysvesien avulla kontrolloitiin sitä, ettei ultrapuhtaasta huoneesta tai näytteenkäsittelytilasta siirry kuoppalevyille kontaminantteja. Positiivikontrolleilla puolestaan tarkkailtiin testin toimivuutta. 20 kappaleen sarjoissa ajettavista näytteistä jouduttiin yksi erä laittamaan uusinta-ajoon (Liite 2 4(5)), koska positiivikontrollit eivät toimineet.

Laaduntarkkailunäytteet analysoitiin kolmessa erässä, joista yksi oli uusinta-ajo. Ensimmäisessä erässä näytteet analysoitiin sekä SYBR greenia että koetinpohjaista menetelmää käyttäen. Ensimmäisen koettimella suoritettujen analyysien tutkimustuloksiin ei voitu luottaa, koska koetin mahdollisesti hajosi eikä PCR-tuotteen monistuminen tapahtunut odotetulla tavalla sekä positiivinen PCR-kontrolli jäi negatiiviseksi. Syyinä saattoi olla koettimen saama liiallinen valoaltistus. Toisessa erässä analysoitavien näytteiden PCR-seoksen valmistuksessa minimoitiin koettimelle aiheutuva valoaltistus ja PCR-seos valmistettiin vasta juuri ennen templaatin pipetoimista, joka tapahtuu näytteenkäsittelyhuoneessa. Lisäksi koetin säilytettiin pimeässä aina siihen hetkeen asti, kunnes se pipetoitiin PCR-seokseen. Uusinta-ajossa templaattia pipetoitiin 10ul 5ul sijasta, koska näytemateriaalia oli vielä hyvin jäljellä.

## 4.2 RNA:n eristäminen

RNA:n eristäminen tapahtuu erillisessä näytteenkäsittelyhuoneessa ja eristystä tehtäessä täytyy huolehtia siitä, ettei eristettävä tuote kontaminoidu millään tavalla. Ennen näytteenkäsittelyhuoneeseen menoa puetaan välitilassa suojakäsineet ja suojatakki. Mentäessä huoneeseen puetaan toiset suojakäsineet, puhdistetaan laminaarivirtauskaappi etanolilla, laitetaan kaappiin hetkeksi uv-lamppu, joka hajottaa pinnoille mahdollisesti jäänyttä RNA:ta ja DNA:ta, ja asetetaan laminaarivirtauskaapin pohjalle puhdas Mekasoft-imupaperi. Tämä siksi, jotta suojattaisiin kaappia mahdollisilta työskentelystä aiheutuvilta roiskeilta. Roiskeiden sattuessa kaappi on näin helpompi puhdistaa. Suojakäsineitä vaihdetaan eri työvaiheiden välillä ja silloin, mikäli käsineisiin joutuu potilasnäytettä tai muuta vierasta ainetta. (Jääskeläinen 2012.)

Näytteitä pipetoitaessa näyteputket avataan Mekasoft-palaa käyttäen.

Näin vältetään siltä, että korkin roiskeet kontaminoisivat muita näytteitä. Pipetoinnissa käytetään suodattimellisia pipetinkärkiä ja kärki vaihdetaan jokaisen näytteen pipetoinnin välillä. (Jääskeläinen 2012.)

Eristys tehtiin manuaalisella eristysmenetelmällä käyttäen QIAamp:n Viral RNA Mini Kittä (QIAGEN). Näytteet olivat seeruminäytteitä. Eristyksessä käytettävä näytemäärä oli 140 ul, joka eluoiitiin 60 ul:aan eluointipuskuria. Viraalista RNA:ta voidaan eristää plasmasta (antikoagulanttina jokin muu kuin hepariini), seerumista ja muista solupaista kehon eritteistä. Näytteet voivat olla tuoreita tai pakastettuja. Jos näytteet ovat jäädytettyjä niitä ei tulisi sulattaa ja pakastaa useita kertoja. Toistuvat plasmanäytteiden sulattamis-pakastamisjaksot johtavat viraalisten tiittereiden vähenemiseen ja niitä tulisi välttää optimaalisen herkkyuden varmistamiseksi. (QIAamp® Viral RNA Mini Handbook 2010: 7.)

## 4.1 PCR-seos SYBR Green I dye:ta varten

PCR-seosta varten tarvitaan nukleaasivapaata vettä, alukkeet, RT-entsyymi, RNA-templaatti ja One-Step SYBR Geen Master Mix, Low ROX. Alukkeet on suunniteltu etukäteen ja ajettiin käyttäen liitteessä 2 (2-5) esiteltyä PCR-ohjelmaa. Alukkeet edustivat Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen S-segmenttiä. (Jääskeläinen ym. 2012). Ennen PCR-seoksen tekoa on hyvä tehdä huolelliset esivalmistelut pipetointivirheiden vähentämiseksi. Näin maksimoidaan menetelmän tarkkuus. PCR-seokseen pipetoi-

daan kaikki muut komponentit paitsi RNA-templaatti, joka lisätään reaktioon erillisessä näytteenkäsittelyhuoneessa. Ennen pipetoimista PCR-seos sekoitetaan kevyesti, jotta kaikki seoksessa olevat komponentit sekoittuisivat. (qScript™ One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit, Low ROX™ 2009.) Seos valmistettiin pipetoimalla tarvittavia aineita taulukon 2 mukaisesti alukkeiden konsentraation ollessa 150 nM.

#### 4.2 PCR-seos koetinta varten

PCR-seoksen valmistuksessa käytetään qScript One-Step Fast MGB qRT-PCR pakkausta. cDNA-synteesi ja PCR-tuotteen monistuminen tapahtuvat samassa testiputkessa. Menetelmä on optimoitu niin, että se tuottaa maksimaalisen RT-qPCR:n tehokkuuden, herkkyuden ja spesifisyyden pienennetyillä näytemäärillä ja nopeilla sykleillä (qScript™ One-Step Fast MGB qRT-PCR Kit, Low ROX™ 2007.) . Seos valmistettiin pipetoimalla tarvittavia aineita taulukon 3 mukaisesti alukkeiden konsentraation ollessa 400 nM ja koettimen 200 nM sekä ajettiin käyttäen liitteessä 1 ja liitteessä 2 1(5) esiteltyä PCR-ohjelmaa. Alukkeet edustivat Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen Hotikannan S-segmenttiä. (Jääskeläinen ym. 2012).

## 5 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kaikki negatiivipaneelin näytteet olivat odotusten mukaisesti negatiivisia, kuten taulukosta 5 voidaan nähdä. Näytteet analysoitiin sekä SYBR Greenia että koetinta käyttäen. Denguevirus-negatiivisista näytteistä olisi teoriassa voinut hyvin pienellä todennäköisyydellä löytyä Krimin-Kongon verenvuotokuumevirusta, mutta näin ei käynyt. Tällainen oletamus siksi, koska Krimin-Kongon verenvuotokuumevirus ja dengue-kuume muistuttavat taudinkuvallisesti toisiaan. Tämä osoittaa sen, että reaaliaikainen RT-PCR on spesifi määritysmenetelmä, koska dissosiaatiokäyrissä ei näkynyt epäspesifistä ja väärää monistumistuotetta humaani-nukleiinihapoista jne, ainoastaan primer dimereita, jotka voivat joissakin tapauksissa häiritä määrittystä. Oikea monistustuote nähdään erillisenä korkeana piikkinä ( $T_m$  n. 80,5°C) ja primer dimerit aikaisempaan piikkinä ( $T_m$  n. 75,5°C). (Liite 2). Primer Dimerit ovat tuotetta, jota syntyy alukkeiden epäspesifisestä pidentymisestä ja sitoutumisesta. Näin tapahtuu heti kun PCR-reagenssit yhdistyvät, erityisesti silloin jos reagenssit on sekoitettu huoneenlämmössä. PCR:n aikana primer dimereiden muodostuminen kilpailee spesifisen PCR-tuotteen kanssa. (Optimization of

Reactions to Reduce Formation of Primer Dimers 1999.) Tuloksien avulla voidaan päätellä, että alukkeet ovat spesifejä, ne eivät monista nukleiinihappoja, jotka ovat huimaan alkuperää. Spesifiyttä voidaan myös perustella sillä, että näytteet oli kerätty 60:stä eri henkilöstä, jolloin analysoitavaa materiaalia oli riittävän paljon.

Tutkimustulokset laaduntarkkailunäytteiden suhteen olivat varsin odotettavia. Koetin oli suunniteltu niin, että se tunnistaa CCHFV Hoti-kannan viruksen neljästä genotyypistä. Ne laaduntarkkailunäytteet, jotka edustivat koettimelle spesifistä Hoti-kannan genotyyppiä tulivat positiivisiksi. Kolmen muun genotyypin edustajan näytteet jäivät negatiivisiksi, koska koetin ei pystynyt tunnistamaan niitä. (Taulukko 6) Tämä johtuu nukleiinihappojen vaihtelusta. Tutkimustulokset osoittivat sen, että koetin on selvästi herkempi määritysmenetelmä kuin SYBR Green. Koettimen havaitsema PCR-tuotteen kopiomäärä oli 23, kun taas SYBR Greenilla se oli 2333 (taulukko 4 & 5). Koettimien toimivuuden edellytyksenä on, että koetin on suunniteltu siten, että se tunnistaa viruksen erilaisia genotyyppiä jolloin saadaan luotettavia tutkimustuloksia.

Taulukko 2. Mastermix-seos 20:lle negatiivipaneelin näytteille, PCR-eristysvesille ja positiivikontrolleille.

Final conc.	Mastermix	1X
	Master mix	12,5
150 nM	Primer-FW	0,375
150 nM	Primer-RV	0,375
	H2O	6,25
	Temp.	5
	RT enzyme	0,5
		25

Taulukko 3. Mastermix-seos laaduntarkkailunäytteille, PCR-eristysvesille ja positiivikontrolleille.

**CCHFV MGB qRT.PCR Mastermix (MGB koetin)**

Final conc.	Mastermix	1X
	Master mix	5
400 nM	Primer-FW	0,8
400 nM	Primer-RV	0,8
200nM	Koetin	0,4
	H2O	7
	Temp.	5
	RT enzyme	1
		20

Taulukko 4. CCHFV-positiivikontrollilaimennokset

**Uusi Rna kontrolli ja laimennossarja siitä 11. RNA extr.**

CCHFV (GE/ml)	280ul elution 124x30 ul alik.							
	Volume	GE/ul	copies in : 1/10, 5ul F		1/100	1/1000	1/10000	1/100 000
2,00E+08	5,60E+07	4,67E+05	1,40E+07	233333	23333	2333	233	23

Taulukko 5. SYBR greenilla ja probella ajettujen negatiivipaneelin näytteiden tulokset.

## TULOKSET

### qPCR SYBR green herkkyys:

Herkkyys toistetusti: 2333 kopiota per qPCR reaktio

Uusi Rna kontrolli ja laimennossarja siitä 11.5.	280ul	RNA extr. elution 120ul	4x30 ul alik. copies in 30ul	1/10, 5ul PCR	1/100	1/1000
CCHFV (GE/ml)	Volume	GE/ul				
2,00E+08	5,60E+07	4,67E+05	1,40E+07	233333	23333	2333

### NEG PANELIT N1-N20, D1-D20, T1-T20

qPCR SYBR green	N1-N20	KAIKKI NEGAT
	D1-D20	KAIKKI NEGAT
	T1-T20	KAIKKI NEGAT

### NEG PANELIT N1-N20, D1-D20, T1-T20

qPCR MGB probe	N1-N20	KAIKKI NEGAT
	D1-D20	KAIKKI NEGAT
	T1-T20	KAIKKI NEGAT

Taulukko 6. Koettimella ajettujen laaduntarkkailunäytteiden tulokset.

alkuperä	Kosovo Hoti	Kosovo Hoti	Kosovo Hoti	Kosovo Hoti	Kosovo Hoti	Afg 09-2990
laimennos	1:10E2	1:10E3	1:10E4	1:10E5	1:10E6	1:10E2
<b>Omat koettimella saadut tulokset</b>	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	-

Afg 09-2990	Afg 09-2990	Afg 09-2990	ArD 39554	AP-92	pGEM-4Z	neg.	neg.
1:10E2	1:10E3	1:10E4	1:10E2	1:10E2	1:10E4	none	none
-	-	-	-	-	+ *	-	-

## 6 Tutkimusasetelma

Krimin-Kongon verenvuotokuumevirusta ei ole toistaiseksi esiintynyt Suomessa, mutta tästä huolimatta on oltava menetelmä viruksen määrittämiseen matkailijoiden mahdollisesti mukanaan tuomien infektioiden diagnosoimiseksi. HUSLABin kliinisen mikrobiologian virologian ja immunologian osastolla sekä Helsingin yliopiston Haartman Instituutin virologian osastolla on reaaliaikaiseen RT-PCR:ään pohjautuva Stratagenen Mx3005P –analysaattori, jolla määritykset voidaan tehdä.

Tutkimuskysymyksiäni ovat:

- Kuinka hyvin reaaliaikainen RT-PCR sopii Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen?
- Häiritsevätkö muut taudinkuvaltaan samankaltaiset virukset määrittämistä?
- Kuinka työskennellä siten, että minkäänlaisia kontaminaatioita ei aiheudu Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen vaadittavan laboratorio-prosessin aikana?
- Soveltuvatko sekä SYBR Green että koetin Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen detektoimiseen?

Sain mielestäni hyvät vastaukset tutkimuskysymyksiini. Ensimmäiseen kysymykseen, joka koski reaaliaikaisen RT-PCR:n soveltuvuutta Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen tuli selkeä vastaus. Reaaliaikainen RT-PCR soveltuu Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen, erityisesti koetinta käyttäen. Mene-

telmä ei aiheuta epäspesifiä monistumista, mikä voi johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin. Koetinta käytettäessä menetelmä on myös riittävän tarkka, sillä se pystyy havaitsemaan jo hyvin pienetkin virusmäärät.

Toisessa kysymyksessäni pohdin, häiritsevätkö muut taudinkuvaltaan samanlaiset virukset määrittystä. Kuten jo aiemman kysymyksen vastauksesta voidaan päätellä vastaus on ei. Negatiivipaneeliin oltiin valittu sellaisia viruksia, jotka muistuttavat taudinkuvaltaan Krimin-Kongon verenvuotokuumevirusta, mutta ne eivät aiheuttaneet vääriä positiivisia tuloksia tai minkäänlaista monistumista.

Kolmanteen kysymykseen, joka käsitteli Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen käsittelyä mahdollisimman kontaminaatiovapaasti ei ole yksiselitteistä vastausta. On kuitenkin selvää, että määrittäjän on noudatettava kaikkia nukleinihapon eristyksessä vaadittuja toimenpiteitä laadukkaiden tutkimustulosten saamiseksi. Rauhallinen työskentely ja huolelliset työtavat sisältäen niin huolellisen pipetoinnin kuin suojakäsineiden käytön ja niiden vaihtamisen riittävän usein ovat tärkeitä sekä oman että näytteiden turvallisuuden kannalta. Tämä siksi, koska näytteet eivät saa kontaminoitua millään tavalla eikä omaa turvallisuutta saa vaarantaa käsittelemällä näytteitä huolimattomasti.

Neljäs kysymys koski kahden eri detektiomenetelmän soveltuvuutta viruksen määrittämisessä ja tulosten perusteella voidaan vetää johtopäätös, jonka perusteella sekä SYBR Green että koetin soveltuvat viruksen detektoimiseen. SYBR Green ei kuitenkaan pääse koettimen kanssa vastaaviin herkkyysiin, joten koettimen käyttö on suositeltavampaa.

## 7 Luotettavuuden arviointi

Luotettavuuden arvioinnissa tulee ottaa huomioon erityisesti omat työskentelytavat ja tutkimustulokset. Tulosten analysoimisessa tulee tarkkailla mahdollisia kontaminaatioita, positiivikontrollien toimivuutta ja tietenkin itse potilasnäytteiden tuloksia. Potilasnäytteet oltiin koodattu anonymisti ja ne pipetoitiin kuoppalevylle loogisessa järjestyksessä näytenumerosta yksi alkaen, jotta tulokset eivät menisi sekaisin. Suorittaessani opinäytetyöni käytännön osuutta pyrin noudattamaan oikeaoppisia työtapoja ja kuuntelin ohjaajiani, jotta osaisin työskennellä mahdollisimman turvallisesti suojaten sekä itseni että potilasnäytteet. Tutkimustuloksissa ei näkynyt merkkejä kontaminaatioista, sillä eristysvedet olivat puhtaat. Tämä osoittaa sen, että ultrapuhaasta huoneesta tai näytteenkäsittelytilasta ei ole siirtynyt kontaminaatioita kuoppalevylle. Positiivikontrollit toimivat, joten tulokset ovat luotettavia. Mikäli positiivikontrollit eivät toimi tai eristysvedessä on kontaminaatio on sarja analysoitava uudestaan. Tutkimustulosten luotettavuutta tukee myös se, että negatiivipaneelin näytteet olivat negatiivisia ja laaduntarkkailunäytepaneelin tulokset odotusten mukaisia.

## 8 Pohdinta

Työni tarkoituksena oli parantaa Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen infektiohälytysdiagnoosiikkaa ja tutkia soveltuuko reaaliaikainen RT-PCR Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen. Määritykset tehtiin Stratagene Mx 3005P-analysaattori, jonka toiminta perustuu fluoresenssiin havaitsemiseen monistetusta tuotteesta. Negatiivipaneelin näytteitä tutkittiin sekä SYBR Greenia että koetinpohjaista menetelmää käyttäen ja laaduntarkkailunäytteitä ainoastaan koetinpohjaista menetelmää käyttäen. Tutkimustulokset osoittivat, että koetinta käytettäessä virus pystytään detektoimaan jo hyvin pienistä virusmääristä, mikä on tärkeää, koska virus ei saa jäädä havaitsematta. Koetin tunnisti laaduntarkkailunäytteistä juuri sen viruksen genotyypin minkä pitikin. Tulosten perusteella tehdään tarvittavat muutokset ja suunnitellaan sellainen koetinseos, jonka avulla on mahdollista tunnistaa kaikki viruksen neljä genotyyppiä.

SYBR Greenilla herkkyys ei ollut yhtä suuri, mutta sekään ei aiheuttanut epäspesifistä monistumista tai vääriä positiivisia tuloksia. Emme ajaneet negatiivipaneelin näytteitä SYBR Greenilla tai koettimella kahteen kertaan vaan luotimme siihen, että tulokset olivat luotettavia koska kummallakaan menetelmällä ei tapahtunut epäspesifiä monistumista eikä kontaminaatioita esiintynyt. Yksi negatiivipaneelinäytesarja uusittiin ainoastaan silloin, kun positiivikontrolli ei toiminut. Se, että evaluoimani menetelmä soveltuu Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen on ilahduttavaa.

Opinnäytetyön tekemisen kokee tärkeäksi, kun siitä saaduista tuloksista on hyötyä työelämälle. Koin työn tekemisen mielekkääksi, sillä sain ohjaajiltani hyvää ohjausta ja sain aina vastaukset mieltä askarruttaviini kysymyksiin. Pääsin tekemään eristystöitä itsenäisesti sen jälkeen kun olin ensin sivusta seurannut miten eristys tapahtuu. Pidän itsenäisestä työskentelystä, koska silloin osaan keskittyä paremmin eikä tule sellaista tunnetta, että selän takana olisi koko ajan joku tarkkailemassa. Eristystyöt vaativat suurta huolellisuutta suuren kontaminaatoriskin vuoksi, joten olin erityisen huolellinen eristäessäni näytteitä ja keskityin vain ja ainoastaan olennaiseen.

Eettisestä näkökulmasta ajateltuna testi kuormittaa luontoa jonkin verran. Yhdellä eristyskitillä voidaan eristää varsin suuri määrä näytteitä, mikä on hyvä asia ja Stratagenella voidaan ajaa kymmeniä näytteitä samanaikaisesti. Testin haittapuolena ovat kohtalaisen suuret jätemäärät, joita syntyy eristystöitä tehdessä.

Sen, että näytteet täytyi eristää manuaalisesti ennen ajoa koin melko työlääksi, koska pipetointia oli paljon. Tästä huolimatta pidän käsityöskentelystä enemmän kuin siitä, että kaikki tapahtuu automaattisesti. Tämä siksi, koska käsityöskentelyssä näkee oman työnsä tulokset ja sen, onko onnistunut vai ei. Useimpien virusten määrittämisessä eristäminen tapahtuu automaattisesti. Manuaalieristys voisi pidemmän päälle olla todella työläs menetelmä, mikäli näytteitä olisi paljon. Näin ei kuitenkaan ainakaan toistaiseksi ole, sillä kyseinen taudinaiheuttaja on harvinainen eikä Suomessa ole esiintynyt yhtäkään tapausta.

Epävarmuutta siitä saadaanko riittävästi näytemateriaalia menetelmään evaluoimiseen ei ollut. Tavoitteet oli selkeästi rajattu heti alusta lähtien eikä niiden puitteissa tapahtunut muutoksia. Työ sujui odotetulla tavalla eikä yllätyksiä tullut vastaan.

Työn tekeminen oli opettavainen kokemus. Tiesin, että huolelliset työskentelytavat geenimonistustöissä ovat äärimmäisen tärkeitä, mutta opinnäytetyöni käytännön osuutta tehdessä nämä asiat korostuivat entisestään. On erinomaisen hienoa, että tulokset olivat juuri sitä mitä oltiin odotettukin. Tämä johtaa kylläkin myös siihen, että opinnäytetyöstäni ei tullut kovin pitkää, koska ei olisi ollut mielekästä suorittaa monipuolista vertailua tulosten välillä.

Jälkikäteen ajateltuna olen tyytyväinen saamaani opinnäytetyön aiheeseen, joka tapahtui muutaman mutkan kautta. Aiheeni oli selkeästi rajattu ja sitä oli suhteellisen helppo lähteä työstämään. Näytemäärä oli mielestäni sopiva evaluoinnin suorittamiseen. Näytteitä ei ollut niin paljoa, että niistä koituva työmäärä yhdelle olisi ollut liian suuri, mutta ei myöskään liian vähäinen. Näytteitä oli riittävä määrä siihen, että testin spesifisyyttä ja soveltuvuutta Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksen määrittämiseen voidaan luetettavasti arvioida.

## Lähteet

Atkinson, Barry – Chamberlain, John – H. Logue, Christopher – Cook, Nicola – Bruce, Christine – D. Dowall, Bruce – Hewson, Roger 2012. Development of a Real- Time RT – PCR Assay for the Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 12. 1–8.

Bagriacik, Emin – Albayrak, Nurhan – Uslu, Kadriye – Ertek, Mustafa 2010. Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein antigens. The Journal of Immunology 184. 38.19.

CBRNE – Viral Hemorrhagic Fevers. Medscape Reference. Verkkodokumentti. Päivitetty 18.4.2011. <<http://emedicine.medscape.com/article/830594-overview>>. Luettu 11.12.2012.

Crimean-Congo haemorrhagic fever. World Health Organization. Verkkodokumentti. Päivitetty 11/2001. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/>>. Luettu 18.4.2012.

Crimean-Congo hemorrhagic Fever 2007. 2. Verkkodokumentti. Päivitetty 8/2009. <[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/crimean\\_congo\\_hemorrhagic\\_fever.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/crimean_congo_hemorrhagic_fever.pdf)>. Luettu 6.12.2012.

Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. Eurosurveillance. 1-4. Verkkodokumentti. <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19504>>. Luettu 18.4.2012.

Duh, Darja – Saksida, Ana – Petrovec, Miroslav – Dedushaj, Iusuf – Avšič-Županc, Tatjana, Tatjana 2005. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. Journal of Virological Methods 133. 175–179.

Escadafal, Camille – Öhlschläger, Stephan – Avšič-Županc, Tatjana – Papa, Anna – Vanhomwegen, Jessica – Wölfel, Roman – Mirazimi, Ali – Teichmann, Anette – Donoso-Mantke, Oliver – Niedrig, Matthias. First international external quality assessment of molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Käsikirjoitus.

Fraga, Dean – Meulia, Tea – Fenster, Steven 2008. Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Ohio, USA. 10.3.1–10.3.33. Verkkodokumentti. <[http://www.oardc.ohio-state.edu/mcic/documents/Current\\_Protocols\\_Real-time%20PCR.pdf](http://www.oardc.ohio-state.edu/mcic/documents/Current_Protocols_Real-time%20PCR.pdf)>. Luettu 17.5.2012.

Frias-Staheli, Natalia – A. Medina, Rafael – Bridgen, Anne 2011. Bunyaviridae. Molecular and Cellular Biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Haakana, Sinikka – Pakkala, Lassi 2003. Biologiset altisteet laboratoriotyössä: Suomen Lääkärilehti 58. 826-827.

Hunt, Margaret. Real Time PCR. Microbiology and Immunology On-line. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.7.2010. <<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>>. Luettu 5.5.2012.

Jääskeläinen, Anne 2012. Erikoistuva sairaalamikrobiologi, FT. HYKS, kliinisen mikrobiologian virologian osasto. Helsinki. Suullinen tiedonanto 8.5.2012.

Jääskeläinen AJ, Kallio-Kokko H, Vapalahti O. Käsikirjoitus tekeillä, 2012.

Kutyavin, Igor V. – Afonina, Irina A. – Mills, Alan – Gorn, Vladimir V. – Lukhtanov, Eugeny A. – Belousov, Evgeniy S. – Singer, Michael J. – Walburger, David K. – Lokhov, Sergey G. – Gall, Alexander A. – Dempcy, Robert – Reed, Michael W. – Meyer, Rich B. – Hedgpeth Joe. 2000. 3´-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28 (2). 655-661. USA: Oxford University Press.

Lappalainen, Maija – Söderlund, Maria – Piiparinen, Heli – Puolakkainen, Mirja – Mannonen, Laura – Suni, Jukka – von Bonsdorff, Carl-Henrik – Koskiniemi, Marjaleena – Hyypiä, Timo – Vaheri, Antti – Hedman, Klaus 1999. Geenimonistusmenetelmät virusdiagnoosissa. *Duodecim* 115. 1031-1036.

Lessons from nosocomial viral haemorrhagic fever outbreaks 2012. *Oxford Journals*. Verkkodokumentti. <<http://bmb.oxfordjournals.org/content/73-74/1/123/F1.expansion.html>>. Luettu 4.6.2012.

Nairovirus. *ViralZone*. Verkkodokumentti. <[viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/251.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/251.html)>. Luettu 5.5.2012.

Nuovo, Gerard J. 1994. *PCR in situ Hybridization Protocols and Applications*. New York: Raven Press.

Optimization of Reactions to Reduce Formation of Primer Dimers. *Roche Molecular Biochemicals* 1999. Verkkodokumentti. <<http://www.gene-quantification.de/roche-primer-dimer.pdf>>. Luettu 18.10.2012.

Papa, Anna – Papadimitriou, Evangelia – Christova, Iva 2011. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 43. 226.

QIAamp® Viral RNA Mini Handbook 2010. Käsikirja. 3. painos. QIAGEN.

qScript™ One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit, Low ROX™ 2009. Quanta BioSciences Inc.

qScript™ One-Step Fast MGB qRT-PCR Kit, Low ROX™ 2007. Quanta BioSciences, Inc.

Reverse Transcription (RT) cDNA Synthesis 2012. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.10.2012. <[http://www.protocolonline.org/prot/Molecular\\_Biology/RNA/Reverse\\_Transcription\\_\\_RT\\_\\_\\_cDNA\\_Synthesis/index.html](http://www.protocolonline.org/prot/Molecular_Biology/RNA/Reverse_Transcription__RT___cDNA_Synthesis/index.html)>. Luettu 13.10.2012.

Strauss, James H – Strauss, Ellen G 2002. *Viruses and Human disease*. California, USA: Academic Press.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 1999. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. 3. painos. Helsinki: Opetushallitus.

TaqMan® and SYBR® Green Chemistries. *Applied Biosystems* 2011. Verkkodokumentti.

<<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>>. Luettu 5.5.2012.

Vector-borne diseases. Verkkodokumentti. World Health Organization. <[http://www.who.int/vaccine\\_research/documents/Chapter3\\_Vector-borne\\_New.pdf](http://www.who.int/vaccine_research/documents/Chapter3_Vector-borne_New.pdf)>. Luettu 4.6.2012.

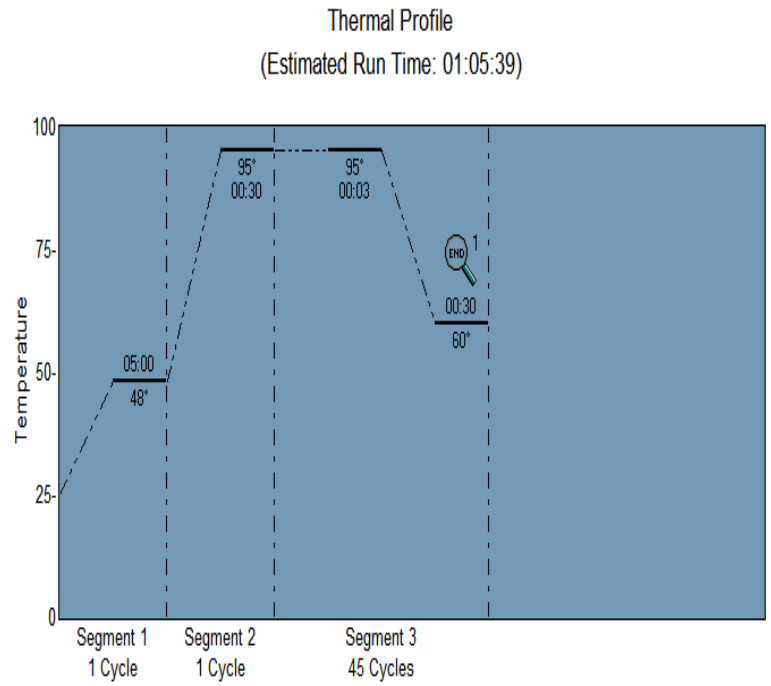
Viral Hemorrhagic Fever(s). Verkkodokumentti. MedicineNet.com. Päivitetty 22.11.2011 <[http://www.medicinenet.com/viral\\_hemorrhagic\\_fever/article.htm](http://www.medicinenet.com/viral_hemorrhagic_fever/article.htm)>. Luettu 4.12.2012

Walker, John M – Rapley, Ralph (Eds.). Medical BioMethods Handbook 2005.

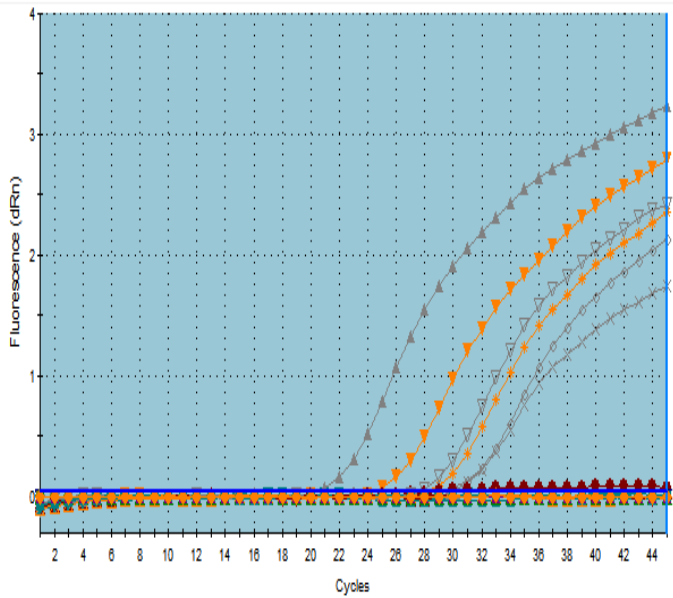
## ENIVDin laaduntarkkailunäytteiden tulokset

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM									
B	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM									
C	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM									
D	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM									
E	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	NTC								
F	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM									
G	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	NTC								
H	Unknown Ib2 FAM	Unknown Ib2 FAM	Not as Use									



## Amplification Plots



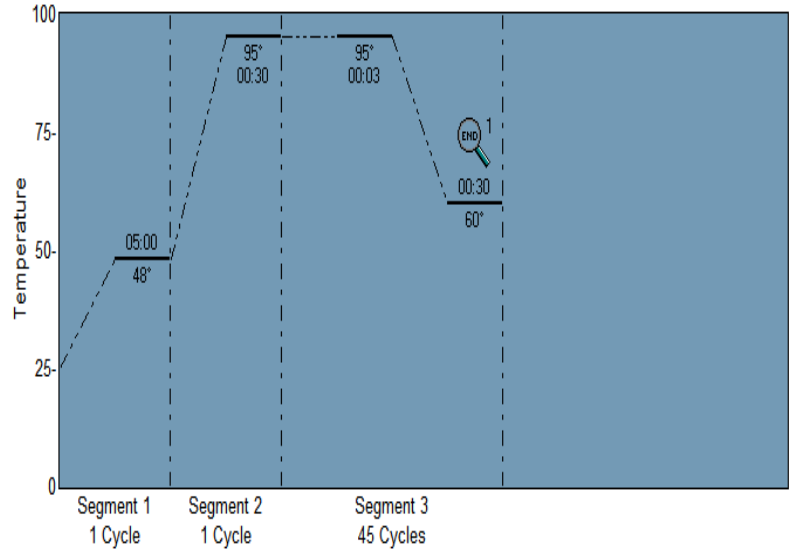
## Negatiivipaneelin tulokset SYBR Green ja koetin

Koetin kaikki negatiivipaneelin näytteet

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	NTC		
B	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	NTC		
C	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM			
D	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM			
E	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	NTC		
F	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM			
G	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM			
H	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM	Unknown H2O FAM			

Thermal Profile  
(Estimated Run Time: 01:05:39)

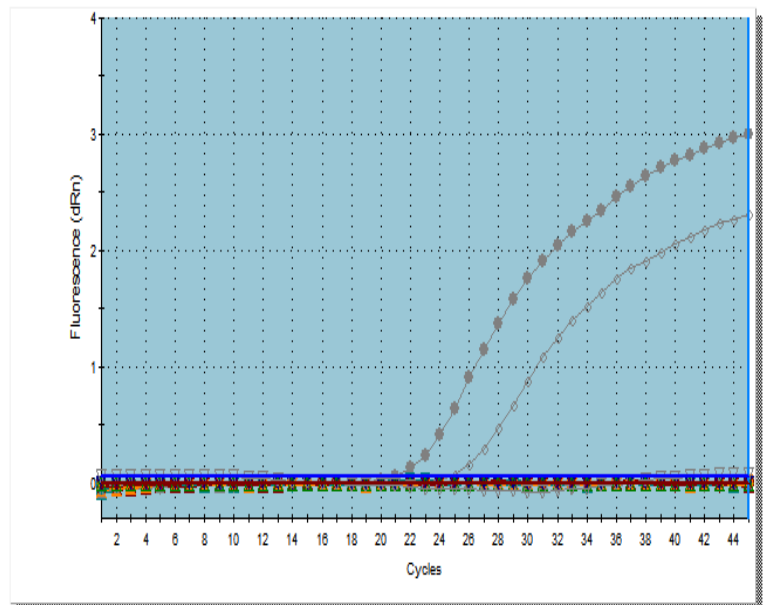


### Analysis Sel./Setup-Term Settings View

Amplification-based threshold using search range of 5 to 60 percent.  
Moving average points for amplification = 3, dissociation = 3.  
Dissociation graphical temperature separation = 0.50.  
Baseline Settings Plate: \* indicates manual baseline cycle range settings.

### Amplification Plots

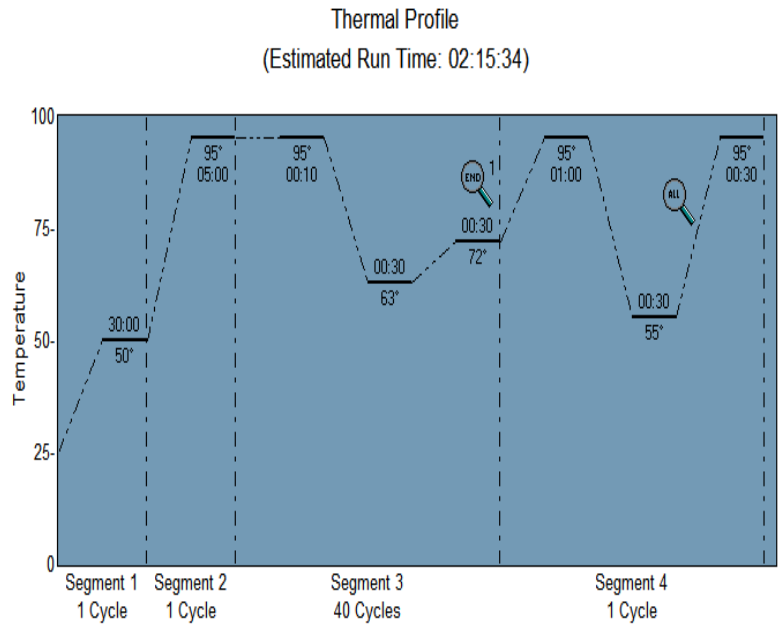
	1	2	3	4	6	8	7	8	9	10	11	12
A	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	NTC	
B	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	NTC	
C	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2		
D	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2		
E	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	NTC	
F	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2		
G	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2		
H	ROX1-H2 FAM7-H2	ROX1-H2 FAM6-H2	ROX1-H2 FAM5-H2	ROX1-H2 FAM4-H2	ROX1-H2 FAM3-H2	ROX1-H2 FAM2-H2	ROX1-H2 FAM1-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2	ROX1-H2 FAM0-H2		



SYBR Green näytteet D1-D20

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	NTC IBP STGR	Unknown IBP STGR								
B	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR									
C	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR									
D	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR									
E	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR									
F	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	NTC IBP STGR									
G	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	NTC IBP STGR									
H	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR	Unknown IBP STGR									

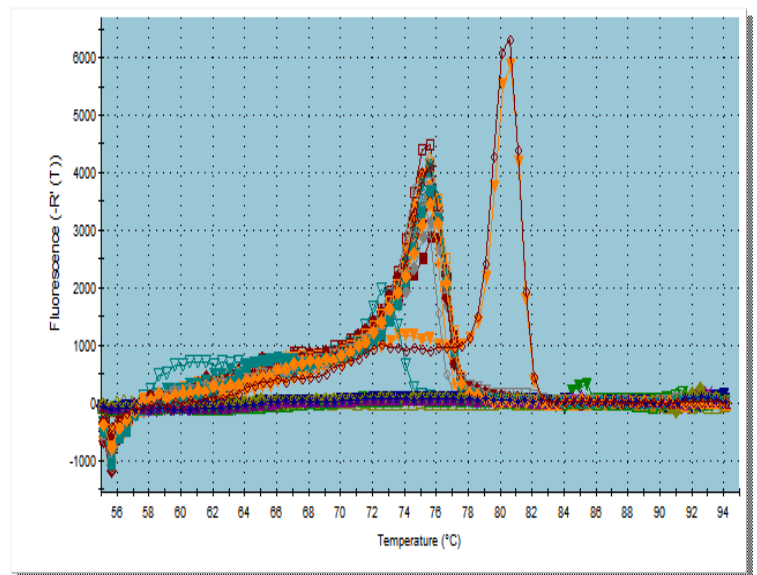


Analysis Sel./Setup-Term Settings View

Amplification-based threshold using search range of 5 to 80 percent.  
Moving average points for amplification = 3, dissociation = 3.  
Dissociation graphical temperature separation = 0.50.  
Baseline Settings Plate: \* indicates manual baseline cycle range settings.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown ROX2-16 DPS 2.15	Unknown ROX2-16 DPS 1.12	NTC ROX2-16 DPS 1.21	Unknown ROX2-16 DPS 2.15								
B	Unknown ROX2-16 DPS 2.15	Unknown ROX2-16 DPS 1.27	Unknown ROX2-16 DPS 1.27									
C	Unknown ROX2-16 DPS 2.15	Unknown ROX2-16 DPS 1.27	Unknown ROX2-16 DPS 1.27									
D	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.27									
E	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.27	Unknown ROX2-16 DPS 1.27									
F	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	NTC ROX2-16 DPS 1.27									
G	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	NTC ROX2-16 DPS 1.27									
H	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.13	Unknown ROX2-16 DPS 1.17									

Dissociation Curve

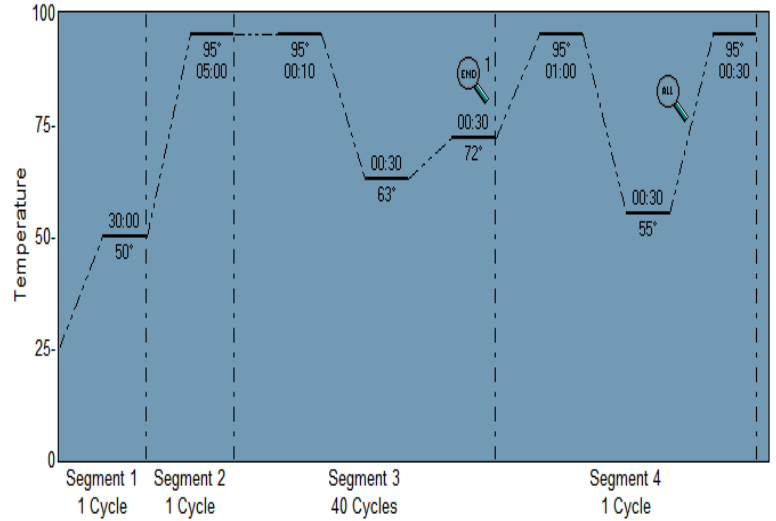


SYBR Green näytteet N1-N20

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR	NTC							
B	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR									
C	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR									
D	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR									
E	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR	NTC								
F	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR									
G	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR									
H	Unknown SYBR	Unknown SYBR	Unknown SYBR									

Thermal Profile  
(Estimated Run Time: 02:15:34)

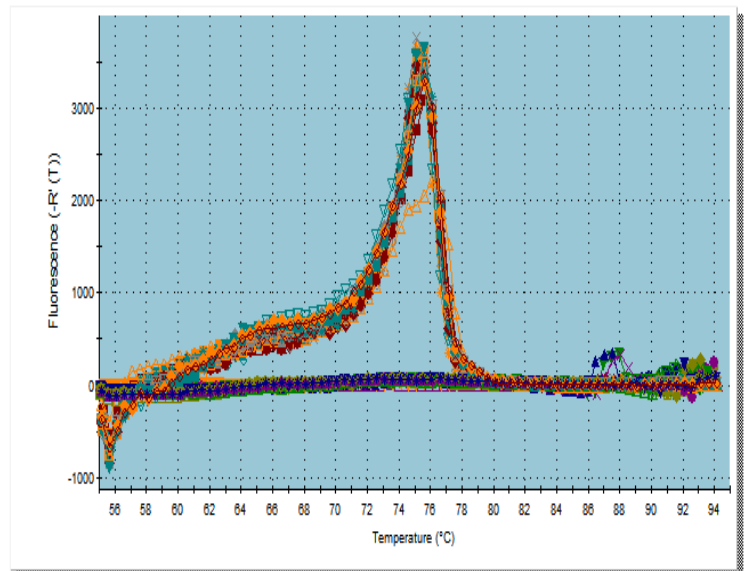


Analysis Sel./Setup-Term Settings View

Amplification-based threshold using search range of 5 to 60 percent.  
Moving average points for amplification = 3, dissociation = 3.  
Dissociation graphical temperature separation = 0.50.  
Baseline Settings Plate: \* indicates manual baseline cycle range settings.

	1	2	3	4	6	8	7	8	9	10	11	12
A	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	NTC							
B	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21									
C	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21									
D	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21									
E	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21	NTC								
F	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21									
G	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21									
H	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.14	Unknown ROX2-16 SYBR 1.21									

Dissociation Curve

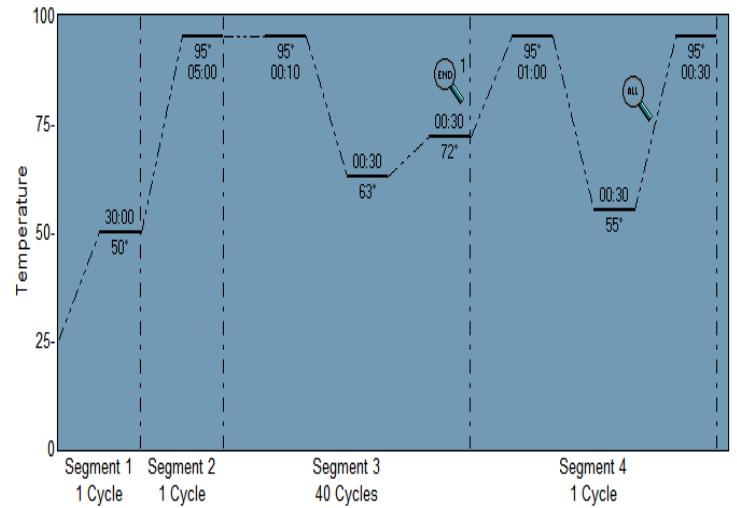


SYBR Green näyttöet N1-N20 uusinta-ajo

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
B	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
C	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
D	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
E	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
F	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
G	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								
H	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR	Unknown H2O SYBR								

Thermal Profile  
(Estimated Run Time: 02:15:34)

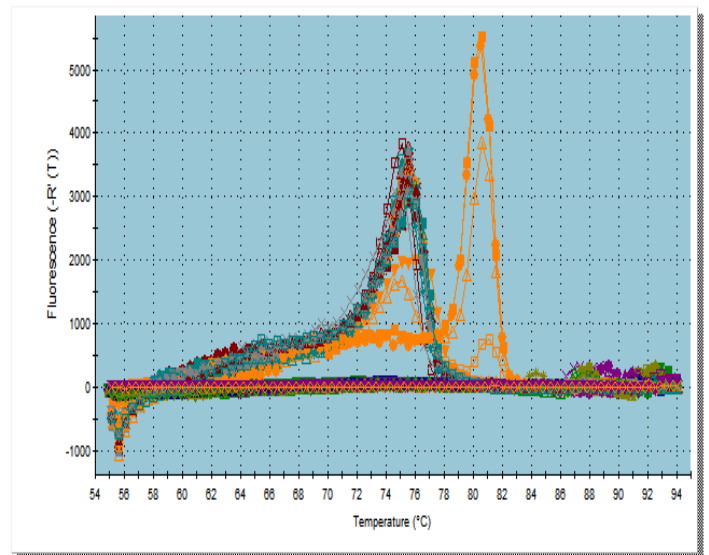


Analysis Sel./Setup-Term Settings View

Amplification-based threshold using search range of 5 to 60 percent.  
Moving average points for amplification = 3, dissociation = 3.  
Dissociation graphical temperature separation = 0.50.  
Baseline Settings Plate: \* indicates manual baseline cycle range settings.

	1	2	3	4	6	8	7	8	9	10	11	12
A	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
B	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
C	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
D	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
E	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
F	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
G	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								
H	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR	Unknown ROX2-16 SYBR								

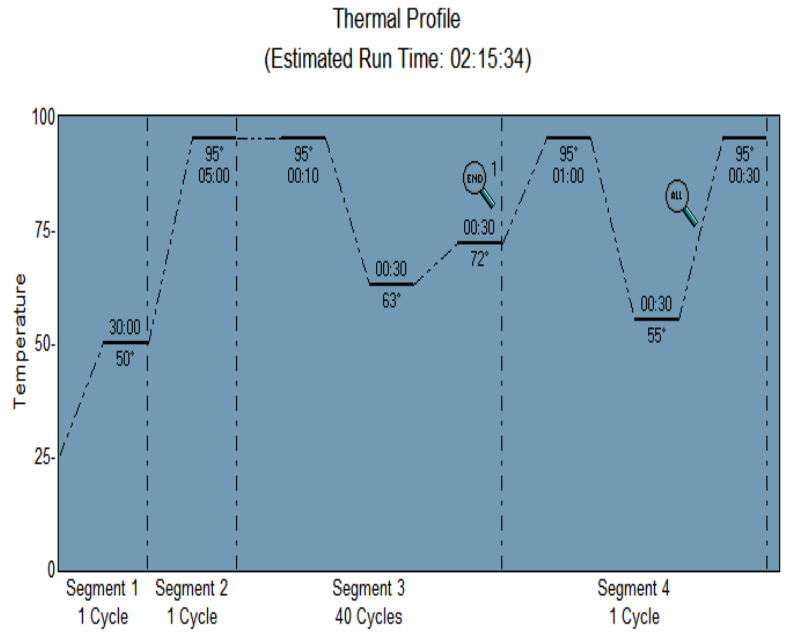
Dissociation Curve



### SYBR Green näyttöet T1-T20

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	NTC								
B	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR									
C	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR									
D	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR									
E	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	NTC								
F	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR									
G	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR									
H	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR	Unknown iC <sup>+</sup> SYBR									



### Analysis Sel./Setup-Term Settings View

Amplification-based threshold using search range of 5 to 60 percent.  
Moving average points for amplification = 3, dissociation = 3.  
Dissociation graphical temperature separation = 0.50.  
Baseline Settings Plate: \* indicates manual baseline cycle range settings.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ROX2-H 2582.232	ROX2-H 2582.232	ROX2-H 2582.232	ROX2-H 2582.232	NTC							
B	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232									
C	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232									
D	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232									
E	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	NTC								
F	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232									
G	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232									
H	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232	Unknown 2582.232									

### Dissociation Curve

