

Eeva-Kaarina Sivula

Suolistovirusten esiintyminen varhaislapsuudessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

5.5.13

Tekijä Otsikko	Eeva-Kaarina Sivula Suolistovirusten esiintyminen varhaislapsuudessa
Sivumäärä Aika	47 sivua 5.5.13
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Laadunvalvonta ja tuotekehitys
Ohjaajat	Dosentti Merja Roivainen Filosofian tohtori Annika Järviluoma
<p>Opinnäytetyön aiheena oli suolistovirusten esiintyminen varhaislapsuudessa. Tutkimus suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksella (THL) suolistovirusyksikössä. Tutkimuksessa selvitettiin varhaislapsuudessa esiintyviä suolistovirusinfektioita molekyylogeneettisin menetelmin. Työ tehtiin osana laajempaa tutkimusta, jossa selvitettiin suolistovirusinfektioiden vaikutusta tyypin 1 diabeteksen syntyyn.</p> <p>Tutkimusmateriaali saatiin lapsilta, joiden perheillä on geneettinen alttius sairastua tyypin 1 diabetekseen. Kerättäviä näytteitä olivat uloste- ja nenälimanäytteet. Tässä työssä keskityttiin ainoastaan ulostenäytteisiin. Saaduista näytteistä etsittiin rota-, noro-, sapo- ja astrovirusia. Tutkimusmenetelminä käytettiin RNA-eristystä sekä reaaliaikaista RT-PCR:ää. Ennen RNA-eristystä virukset erotettiin kloroformiekstraktimenetelmällä muusta näytemateriaalista. Tämän jälkeen hajotuspuskurin ja pesupuskureiden avulla näytteestä eristettiin viruksen RNA, jotta PCR-menetelmällä pystyttiin kopioimaan viruksen genomia.</p> <p>Hallitsevia virusinfektion aiheuttajia olivat norovirus GII, astrovirus sekä sapovirus. Työssä tutkitut virukset aiheuttavat infektioita talvi- ja kevätkausina. Tässä työssä infektioiden huippu oli helmi-huhtikuussa. Rotavirusta löytyi ainoastaan kahdesta näytteestä. Näissä lapset olivat alle vuoden ikäisiä. Rotaviruksen vähäisen esiintyvyyden yhtenä tekijänä ovat käytössä olevat rotavirusrokotteet. Opinnäytetyön yhteydessä tehdyssä tutkimuksessa saatiin yleiskäsitys varhaislapsuudessa esiintyvistä suolistoviruksista.</p>	
Avainsanat	rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, RNA-eristys, RT-PCR

Author Title	Eeva - Kaarina Sivula Intestinal Viral Infections in Early Childhood
Number of Pages Date	47 pages 5 May 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Product development and quality control
Instructor	Merja Roivainen, Adjunct professor, THL Annika Järviluoma PhD
<p>The topic of this thesis is Intestinal Viral Infections in Early Childhood. This study was conducted for Intestinal Virus section of the Health and Welfare on Institution (THL, Terveystieteiden tutkimuskeskus). The study examined intestinal virus infections in early childhood using occurring molecular genetic methods. The work was done as a part of larger study, which examined the effect of intestinal infections caused by viruses of type 1 diabetes.</p> <p>The research material was obtained from families of children with genetic susceptibility to type 1 type diabetes. Samples were collected from faces and nasal mucus samples. This work focused exclusively on the fecal samples. Rotavirus, norovirus, sapovirus and astrovirus were searched from the obtained samples. The research methods included RNA isolation and real-time RT-PCR. Fecal samples were pretreated with chloroform, followed by RNA isolation and viral genome amplification using real-time RT-PCR.</p> <p>The predominant virus infection was caused by to second genotype of norovirus, astrovirus, and sapovirus. The viruses used in the study cause infections in the winter and spring months. Infections peaked in February-April. Rotavirus was found only in two samples. These children were under one year of age. The thesis contained an overview of intestinal viruses occurring in early childhood.</p>	
Keywords	rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, RNA-isolation, real-time RT-PCR

Sisällysluettelo

Sanasto	3
1 Johdanto	4
2 Rotavirus	6
2.1 Rakenne	6
2.2 Epidemiologia	8
2.3 Diagnostiikka	8
2.4 Rotavirusrokote	9
3 Kalikvirukset	10
3.1 Yleistä	10
3.2 Lisääntyminen	11
3.3 Norovirus	12
3.3.1 Rakenne	12
3.3.2 Epidemiologia	13
3.3.3 Diagnostiikka	14
3.4 Sapovirus	14
3.4.1 Rakenne	14
3.4.2 Epidemiologia	15
3.4.3 Diagnostiikka	15
4 Astrovirukset	16
4.1 Rakenne	16
4.2 Epidemiologia	17
4.3 Diagnostiikka	18
5 Työn tavoitteet ja tarkoitus	19
6 Menetelmät	20
6.1 Ulostenäytteen esikäsittely	20
6.2 RNA-eristys	21
6.3 Reaaliaikainen RT-PCR	23
6.3.1 Astrovirusten reaaliaikainen RT-PCR	23
6.3.2 Sapoviruksen reaaliaikainen RT-PCR	27
6.3.3 Noroviruksen 1. genomiryhmän reaaliaikainen RT-PCR	28

	2
6.3.4 Noroviruksen 2. genoryhmän reaaliaikainen RT-PCR	28
6.4 Rotavirusten reaaliaikainen RT-PCR	29
7 Tulosten esitys ja pohdinta	35
8 Yhteenveto	40
Lähteet	41
9 Liitteet	45
9.1 Positiiviset näytteet taulukoituna	45
9.2 Infektioiden lukumäärä kuukausittain	46
9.3 Norovirus GII:sen Ct-arvot ja infektioiden lukumäärä	46
9.4 Astroviruksen Ct-arvot ja infektioiden lukumäärä	46
9.5 Tutkimustyön menetelmä kaavio	47

Sanasto

THL	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos
LATU	THL:n laboratorion tukiyksikkö
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction. Käänteis-transkriptaasi-PCR
pH	Kuvaa positiivisten vetyionien (H ⁺) määrää liuoksessa.
ELISA-menetelmä,	Entsyymi-immunologinen määrittely
PBS-liuos,	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PeStG,	Penisilliini, streptomysiini ja gentamysiini
cDNA	Complementary DNA. Komplementaarinen DNA
DEPC – H ₂ O	Dietyylikarbonaatilla RNAasi-vapaaksi käsitelty vesi
dRn-arvo	Mitta-arvo, joka kuvaa PCR-menetelmässä fluoresoivien rakenneosien määrää
Ct-arvo	Cycle threshold. Tarkoittaa sykliä, jossa fluoresenssi ylittää kynnysarvon. Mitä enemmän PCR-tuotetta näytteessä on, sitä pienempi Ct-arvo on. Vastaavasti mitä vähemmän PCR-tuotetta näytteessä on, sitä suurempi Ct-arvo on.
ORF	Open read frame. Avoin lukukehys.

1 Johdanto

Akuutti oksennus-ripulitauti on eräs yleisimmistä lapsilla esiintyvistä äkillisistä sairauksista. Taudin kuvaan kuuluu yleisesti voimakasta oksentelua, pahoinvointia sekä ripulointia. Taudin oireet aiheutuvat viruksen aiheuttamasta tulehduksesta suolistossa. Aiheuttajaviruksia on monia, mutta tässä työssä keskitytään niistä yleisimpiin. Tutkimuksessa mukana olleet virukset ovat rotavirus, norovirus, sapovirus sekä astrovirus.

Rotavirusta esiintyy harvoin alle puolen vuoden ikäisillä lapsilla, mutta melkein jokainen lapsi sairastaa sen jossain vaiheessa. Infektion oireita ovat raju oksentelu ja kuume. Oksennuksen seurauksena potilaan elimistö kuivuu, jolloin vakavimmissa tapauksissa on turvauduttava sairaalahoitoon. Rotavirusinfektiota on pidetty kertaluonteisena, mutta henkilö voi saada uudestaan rotavirusinfektion, jos virus on geneettisesti muuntunut. Rotaviruksen segmentointuneen genomien takia virusgenomi muuttuu helposti viruksen lisääntyessä. Rotavirusinfektiota vastaan on kehitetty rokotteita. Nykyisin käytössä olevat rokotteet ovat Rotarix (GlaxoSmithKline) ja Rota Teq (Merck).

Yleisin lapsilla akuuttia gastroenteriittiä eli oksennus-ripulia aiheuttaja on norovirus. Noroviruksen lyhyt itämisaika aiheuttaa äkillisen oksennus-ripulitaudin. Viruksen serotyyppi GII on yleisin. Tampereella tehdyn tutkimuksen tulokset osoittavat, että vakavista alle kaksivuotiaiden lasten ripulitaukeista 20 % on noroviruksen aiheuttamia. Samassa tutkimuksessa selvitettiin lasten vasta-aineita norovirusta kohtaan ja ilmeni, että 50 % lapsista on sairastanut norovirusinfektion kahteen ikävuoteen mennessä.

Tämä opinnäytetyö suoritettiin Helsingissä Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksella (THL) suolistovirusyksikössä. Opinnäytetyö käsittelee suolistovirusinfektioita varhaislapsuudessa. Kohderyhmänä ovat viisivuotiaat ja sitä nuoremmat lapset, joilla on geneettisen riskin sairastua tyypin 1 diabetekseen. Tämä työ tehtiin laajemman tutkimuksen rinnalla, ja tavoitteena oli selvittää suolistoinfektioita aiheuttavien virusten ja perinnöllisen tyypin 1 diabeteksen yhteyttä. Työssä näytteistä etsittäviä viruksia olivat rotavirus, ka-

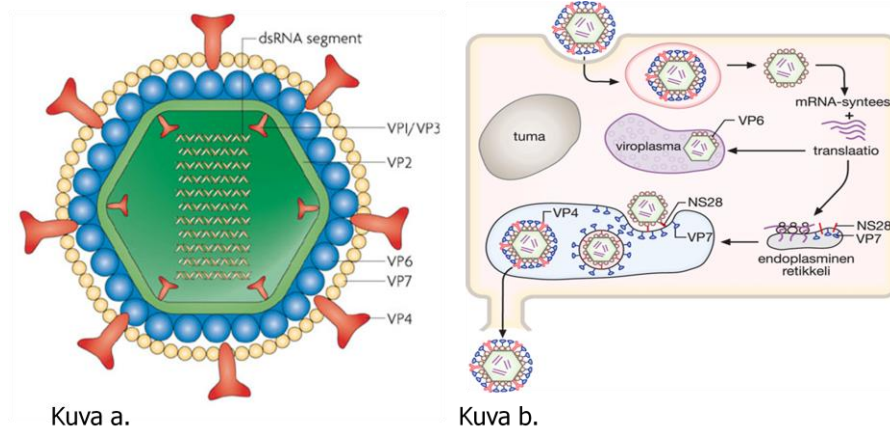
likiviruksista sapovirus ja norovirus (GI- ja GII-genotyypit) sekä astrovirus. Virusten tunnistukseen käytettiin reaaliaikaista RT-PCR-menetelmää.

2 Rotavirus

Rotavirusta on löydetty ripulipotilaiden ulosteesta ensimmäisen kerran vuonna 1974 elektronimikroskopian avulla. Löydön jälkeen rotavirukset osoittautuivat yleisimmiksi lasten akuutin gastroenteriitin (suolistotulehduksen) aiheuttajaksi kehittyneissä maissa, missä bakteeriripulit ovat harvinaisia. Aikaisemmin lasten ripulitautia aiheuttavan viruksen selvittäminen oli hankalaa, koska ihmisen rotavirus ei kasva soluviljelmässä ilman trypsiiniaktivaatiota. Trypsiiniaktivaatio on yksi haiman entsyymi, jolla pystytään muokkaamaan viruksen pintarakennetta niin, että se saadaan kasvamaan elatusmaljalla (1).

2.1 Rakenne

Rotavirus rakentuu kolmesta kerroksesta. Ulkokuorella on VP7-glykoproteiinia ja sen läpi meneviä VP4-dimeereitä, jotka kiinnittyvät sisempään proteiiniinikuoreen. On pystytty osoittamaan, että rotaviruksen neutraloiva vasta-aine tarttuu VP4-dimeereihin ja näin estää viruksen pääsyn isäntäsoluun. Tämä on pystytty osoittamaan immunoelektronimikroskopiolla. Viruksen sisempi kuori (kapsidi) on koostunut yhtenäisestä VP6:sta. Kapsidin sisäpinnan peittää yhtenäinen VP2-proteiinikerros, joka sulkee sisäänsä viruksen 11 kaksisäikeistä RNA-molekyyliä sekä VP1- ja VP3-proteiineja. (1) Kuva 1a selkeyttää rotaviruksen rakennetta.



Kuva 1. a. Rotaviruksen rakennekuva. b. Rotaviruksen lisääntymissykli kaavakuvana. (Muokattu lähteistä 14 ja 13)

Rotaviruksen lisääntyminen isäntäsolussa alkaa viruksen pintaproteiinin tarttumisella isäntäsolun pinnalla oleviin reseptorimolekyyleihin. Viruksen tunkeutuessa soluun viruksen ympärille muodostuu endoplasmainen retikkeli (RER). Tunkeutumisen jälkeen viruksen kapsidi hajoaa ja viruksen sisältämä RNA-genomi vapautuu sytoplasmaan. Vapautunut viruksen RNA toimii replikaatiossa mRNA:na. mRNA-synteesissä valmistetaan viruksen positiiviselle RNA-genomille komplementaarinen negatiivinen vastinsäijä, jota käytetään mallina positiivisille RNA-juosteille. Translaatiossa ilmenee geenien tuoma tieto ja alkaa proteiinien valmistus. Geenien 9 ja 10 tuottamat proteiinit VP7 ja NS28 kiinnittyvät RER:lle. Uusien virusten järjestäytyessä nukleokapsidit kiinnittyvät RER:lle NS28-proteiinin karboksiterminaalisen osan välityksellä, tämä proteiini toimii jonkinlaisena ”järjestäjänä” nukleokapsidin silmikoituessa RER-kalvon läpi. Viruksen ympärille muodostuu väliaikainen vaippa. RER-vakuolissa partikkeli läpikäy metamorfoosin eli kypsymisen, jonka aikana pintaproteiinit VP7 ja VP4 muodostavat viruksen lopullisen ulkokuoren. Virus vapautuu solusta joko solun lysosoituessa tai RER-vakuolin fuusioituessa solukalvoon (kuva 1b). (1, s. 592–598)

2.2 Epidemiologia

Rotavirusten esiintyminen on kytköksissä vuodenaikoihin. Epidemiakausi alkaa vuoden vaihteen aikoihin ja jatkuu aina kesäkuuhun asti. Rotavirusta esiintyy ympäri vuoden, mutta epidemiakausien ulkopuolella esiintyminen on vähäisempää, lokakuussa harvinaisimmillaan. (1)

Rotavirusripuli on harvinainen alle puolen vuoden ikäisillä lapsilla, mutta alle 2-vuotiailta lapsista 20 % sairastaa kliinisen rotavirusripulin ja 70 % saa tartunnan. Oireet alkavat rajulla oksentelulla sekä vetisellä ripulilla, ja siihen liittyy usein kuumeilua. Raju oireilu voi johtaa potilaan kuivumiseen, jos riittävästä nesteytyksestä ei huolehdita. Oireet kestävät keskimäärin 3 – 8 vrk, mutta virusta erittyy ulosteeseen myös oireiden loputtua vielä viikkoja. (3) Perussääntönä on pidetty, että jos lapsi sairastaa kerran rotavirusripulin, sairastettu tauti antaa ainakin osittaisen immuniteetin. Henkilö voi kuitenkin saada rotavirusinfektion uudestaan, jos kyseessä on toisen serotyypin rotavirus. (1)

Rotavirus leviää pisara- ja kosketustartunnan välityksellä ulosteesta. Ruoansulatuskanavassa oleva trypsiini muokkaa viruksen pintaproteiineja niin, että virus pystyy tarttumaan suolistossa isäntäsoluun, jonka kautta virus pääsee lisääntymään. Ripulipotilaan ulosteessa voi olla jopa $> 10^{11}$ infektiokykyistä virusta ulostegrammaa kohden. Korkean viruspitoisuuden takia tartunnan estäminen on erittäin hankalaa (1).

2.3 Diagnostiikka

Rotaviruksen osoitus potilasnäytteestä on helpointa ulostenäytteestä, jossa on viruksen pitoisuus suurin. Osoitusmenetelmiä on useampia, mutta luotettavimmaksi on osoittautunut PCR-menetelmä. Tässä rotaviruksen RNA:n osoitus tapahtuu suoraan potilasnäytteestä, jolloin havaittujen rotavirusten määrä on suurempi kuin muissa käytetyissä menetelmissä. Näytteiden diagnostiikassa käytetään myös elektronimikroskooppia, jonka etuna on näytteessä esiintyvien muidenkin virusten havaitseminen (1,12). Nykyisin

käytössä on pikatesti, jolla pystytään osoittamaan virus nopeasti näytteestä ja antamaan oikeanlaista hoitoa. Muita rotavirukselle soveltuvia menetelmiä ovat entsyymi-immunomenetelmä (EIA), lateksiagglunaatiomenetelmä sekä akryyliamidielektroforeesi. (1)

2.4 Rotavirusrokote

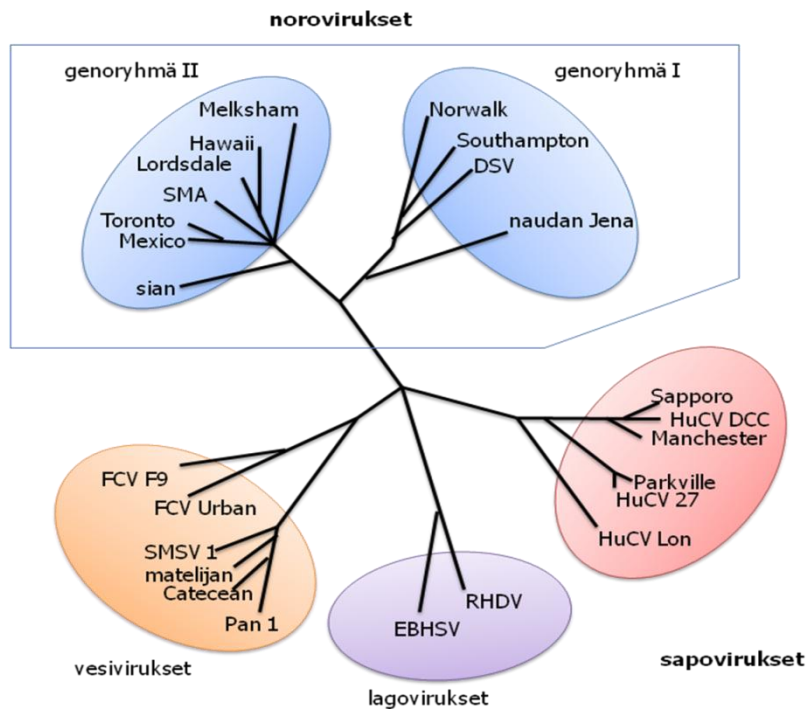
Rotavirusrokotteen tehtävänä on estää rotaviruksen aiheuttamat infektiot ja taudit. Ensimmäistä heikennettyä rotavirusta testattiin 1980-luvun alussa, ja ensimmäinen virallinen rokote otettiin Yhdysvalloissa käyttöön vuonna 1998. Rokotusten seurauksena kuitenkin ilmeni suolentuppeumatapauksia noin yhdellä 10 000 rokotetulla, minkä seurauksena rokote jouduttiin vetämään pois markkinoilta. Vuonna 2006 otettiin käyttöön kaksi heikennettyä oraalirokotetta, Rotarix (GlaxoSmithKline) ja Rota Teq (Merck) eli rokote, joka sisältää eläviä viruksia. (10) Nykyiset rekisteröidyt rokotteet antavat ristisuojaan eri rotavirustyyppien aiheuttamaa vakavaa rotavirusripulia vastaan riippumatta rokotteiden sisältämistä serotyypeistä. (1) Rotarix sisältää yhtä ihmisen rotaviruskantaa, mutta Rota Teq muodostuu viidestä eri rotaviruksen resortantista eli yhdistelmäviruksista. Rokote sisältää sekä ihmisen että vasikan rotaviruksia. Vaikka näiden kahden rokotteen rakenne on erilainen, niiden vaikutusmekanismit ovat samanlaisia. (10)

Rotavirusrokoteohjelma toteutetaan kolmessa jaksossa. Lapsi rokotetaan 2, 4 ja 6 kuukauden ikäisenä. 2000-luvun alussa Tampereella tehdyn tutkimuksen perusteella pystyttiin osoittamaan rotavirusrokotteiden teho infektion synnyn estämiseksi. Tutkimuksessa oli yhteensä 63 000 lasta, joista 20 000 oli suomalaista. Tutkimuksessa käytettiin oikeaa rokotetta sekä lumerokotetta. Tällä tutkimuksella pystyttiin todistamaan rokotteen teho, sillä rokotteella pystyttiin estämään 93 % lapsista joutumasta sairaalahoitoon rotaviruksen aiheuttaman sairauden takia. (7) Suomessa rotavirusrokotus otettiin viralliseen rokotusohjelmaan vasta vuonna 2009. Syynä hitaaseen käyttöön ottoon on pidetty alhaista kuolleisuutta suolistoinfektion yhteydessä. (10)

3 Kalikivirukset

3.1 Yleistä

Kalikiviruksiin kuuluvat norovirukset, sapovirukset, vesivirukset ja lagovirukset (kuva 3). Tässä työssä keskityttiin kahteen ensimmäiseen ryhmään edellä mainituista.



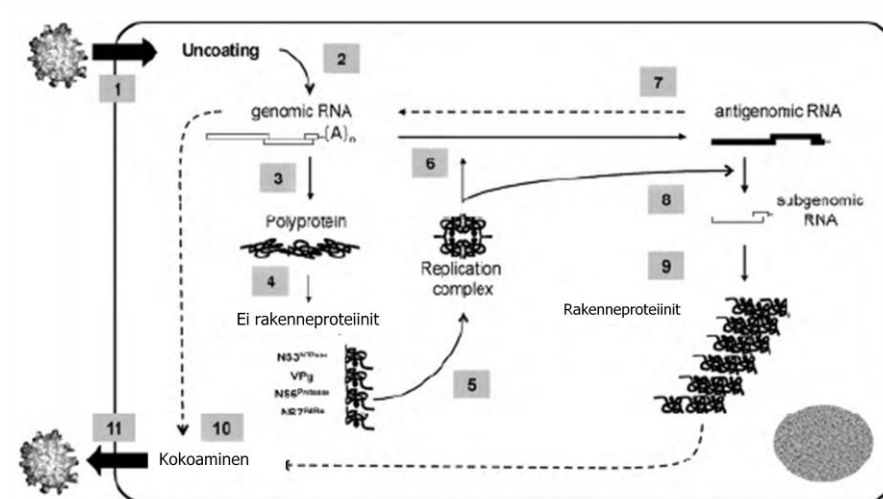
Kuva 2. Kalikivirusten fylogeeninen puu. (Kuva on muokattu lähteestä 15.)

Tavallisimpia virusgastroenteriittejä aiheuttavia viruksia ovat noro- ja sapovirukset. Norovirus-infektion oireena usein on oksennus-ripulitauti, kun taas sapoviruksen hallitseva taudinkuva on lievä ripuli. Kalikivirusten itämisaika on 12 – 48 tuntia ja taudin kesto on yhdestä vuorokaudesta kahteen viikkoon. Oireiden loputtua virusta voi erittyä ulosteen mukana vielä useita viikkoja. Kalikivirusten aiheuttamat infektiot ovat yleisiä kevättalvella. (3)

3.2 Lisääntyminen

Kalikivirusten lisääntyminen solussa alkaa, kun viruksen pintaproteiinit tarttuvat solun reseptorimolekyyleihin ja tunkeutuvat isäntäsoluun. Tunkeutumisen jälkeen viruksen kapsidi hajoaa ja yksijuosteinen RNA-genomi vapautuu solun sytoplasmaan (uncoating-tapahtuma). Jotta viruksen genomia pystytään tuottamaan, tuotetaan RNA-polymeraasia (replikaatiokompleksi) heti infektion alkuvaiheessa. RNA-polymeraasin tuotannossa viruksen positiivinen RNA-juoste toimii mRNA:na. Genomin replikaatiossa RNA-polymeraasi syntetisoi yksijuosteisille positiivisille RNA-genomille komplementaarisen negatiivisen vastinsäikeen (antigenomic RNA), jotta viruksen positiivista RNA-juostetta pystytään tuottamaan. Kun viruksen genomia on kopioitu, virus valmistaa jälkeläisvirusten rakenneproteiineja ja lisääntymissyklissä tarvittavia entsyymejä.

Proteiinisynteesissä viruksen genomien ORF-alueet koodaavat viruksen rakenneproteiineja sekä viruksen maturaatiossa tarvittavia entsyymejä. Noroviruksella ORF2-alue koodaa viruksen rakenneproteiineja VP1 ja VP2. Sapoviruksella ORF1-alue koodaa rakenneproteiini VP1:tä. Virusten rakenneosien kokoaminen yhteen tapahtuu sytoplasmassa, minkä jälkeen alkaa viruksen maturaatio eli kypsyminen. Lisääntymissyklin päätteeksi isäntäsolu hajoaa ja virukset vapautuvat. Alla lisääntymissykli kaavakuvana (kuva 3) (32, 33.)



Kuva 3. Kalikivirusten lisääntymissykli kaavakuvana. (Kuva on muokattu lähteestä 33.)

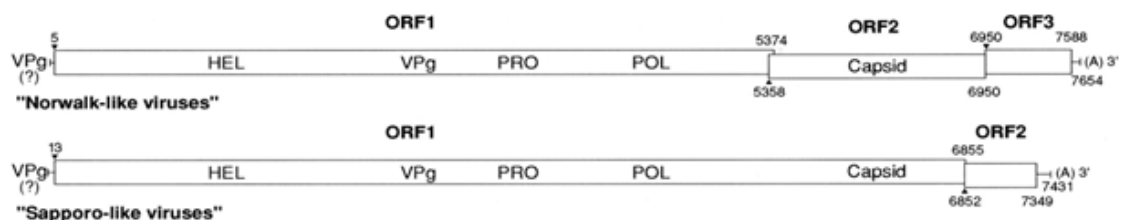
3.3 Norovirus

Norovirusta ei ole pystytty kasvattamaan soluviljelmillä, sillä ei ole tietoa, mikä entsyymi pystyisi muokkaamaan viruksen pintaproteiineja niin, että virus pystyisi tarttumaan isäntäsolun pintaproteiineihin ja sitä kautta lisääntymissykli pystyisi alkamaan.

Norovirukset luokitellaan viiteen genoryhmään niiden perimän mukaan. Ihmisissä esiintyviä ovat GI-, GII- ja GIV-genoryhmän viruksia. Ryhmän GII ja GV viruksia esiintyy ainoastaan eläimillä (lehmillä ja hiirillä). Genoryhmät sisältävät useita genotyyppisiä, joista on löydetty tällä hetkellä 29 kpl. Tällä hetkellä on pidetty kriteerinä yli 10 %:n eroavuutta viruksen polymeeraasi- ja kapsidigeenin emäsvetäilussa. Ihmiselle patogeenisiä genotyyppisiä on löydetty yhteensä 23 erilaista (7 ryhmään GI, 15 ryhmään GII ja 1 ryhmään GIV). Tämänhetkinen tilanne näyttää, että viruksen genotyyppi muistuttaa hyvin paljon enterovirusta. (1, 19)

3.3.1 Rakenne

Norovirukset ovat pieniä (halkaisija 37 nm) ja vaipattomia viruksia. Noroviruksen perimä on positiivista yksijuosteista RNA:ta. Viruksen genomi on noin 7,5 kiloemästä pitkä, ja se koostuu kolmesta avoimesta lukukohdasta, ORF1 - ORF3 (kuva 5, kohdasta Norwalk-like viruses). ORF1 koodaa proteiineja, joita tarvitaan viruksen replikaatiossa. ORF2 koodaa kapsidiproteiinia VP1 ja ORF3 pienempää rakenneproteiinia VP2. (19)



Kuva 4. Kalikivirusten genomikuvat, joista näkee avoimet lukukohdat (ORFs). (Kuva on muokattu lähteestä 25.)

3.3.2 Epidemiologia

Norovirusinfektion syntyyn riittää hyvin vähäinen määrä viruspartikkeleita, vain noin 10 - 100 viruspartikkelia. Viruksen inkubointiaika on erittäin lyhyt, viruskannasta ja viruspartikkeleiden määrästä riippuen 10 - 48 tuntiin. Taudin kuvaan kuuluu erittäin voimakas pahoinvointi, oksentelu, vatsakrampit ja ripuli. Lievempiä oireita ovat matala kuumelämpö, päänsärky ja viluntunne sekä lihaskivut. Taudin oireet häviävät usein jo 12 - 24 tunnin kuluessa. Tämä ei kuitenkaan tarkoita taudinaiheuttajan poistumista elimistöstä. Virusta erittyä elimistöstä ulosteen välityksellä vielä jopa 8 viikkoa oireiden jälkeen (18). Oireiden aikana viruspartikkeleita erittyy erittäin paljon ympäristöön. Ulosteesta mitatut virusmäärät ovat korkeimmillaan vasta oireiden jälkeen. Noroviruksen tartuntateitä ovat pisara, ja kosketustartunnat. Virukset voivat säilyttää infektiokykynsä kuivilla pinoilla viikkoja ja vedessä kuukausia (2;18). Viruksen kestävyys takia tartunnan voi saada myös vesi- ja ruokavälitteisenä. Syynä useasti ovatkin keittiöhenkilökunnan pettänyt hygienia tai saastuneet raaka-aineet. Juomaveden virus pääsee helposti ympäristöstä, jos puhdistamolla ei ole riittävän tehokasta vedenpuhdistusta (18).

Oksennus-ripulitaudin yleinen aiheuttaja on genoryhmän II virus. Tampereella tehdyn tutkimuksen tulokset osoittavat, että vakavista alle kaksivuotiaiden lasten ripulitaudeista 20 % on noroviruksen aiheuttamia. Samassa tutkimuksessa selvitettiin lasten vasta-aineita norovirusta kohtaan, ja selvisi, että 50 % lapsista on sairastanut norovirusinfektion kahteen ikävuoteen mennessä. (1) Noroviruksen aiheuttamia epidemioita esiintyy usein verrattuna muihin suolistovirusten aiheuttamiin epidemioihin. Vuonna 2006 alkoi voimakas maailmanlaajuinen epidemia. Viruksen kaksi serotyyppiä pääsi leviämään samanaikaisesti ihmisiin, ja näin moni sairastui helposti uudestaan. (6) Viimeisin epidemia oli vuonna 2012. Virus GII.4 tunnistettiin ensimmäisenä Australiassa, Sydneyssä. (35)

Norovirus on hyvin nopeasti muuntuva virus, joten infektion aikaansaama immuniteetti norovirukselle on hyvin lyhyt. Tämän takia norovirus pystyykin helposti synnyttämään voimakkaampia epidemioita (1). Noroviruksen epidemiakausi ajoittuu talvikuukausiin (20).

3.3.3 Diagnostiikka

Oireiden lyhyen keston vuoksi taudinmääritys tehdään oireiden ja infektion etenemisen perusteella. Tarkempia menetelmiä ovat RT-PCR- ja ELISA-menetelmät, joita käytetään epidemioiden yhteydessä.(6)

Yleisimpänä enteristen virusten tunnistuskeinona on ollut antigeeniosoitus, mutta kalikivirukset tekevät siinä poikkeuksen. Johtuen kalikivirusten suurista antigeenisista eroista antigeeniosoitusmenetelmän kehittäminen on vaikeaa. Norovirusten tunnistukseen käytetään usein elektronimikroskopiaa. Tällä menetelmällä harjaantunut tutkija pystyy tunnistamaan viruksen sukua myöten, menetelmän heikkoutena on kuitenkin puuttuva spesifisyys (1).

Nykyisin noroviruksille on käytettävissä herkät ja luotettavat osoitusmenetelmät. Paras menetelmä noroviruksen toteamiseksi on käänteistranskriptaasi-PCR eli RT-PCR, jolla norovirus pystytään tunnistamaan luotettavasti. Käytössä on herkkä ja kattava reaaliaikainen geenimonistustesti, joka perustuu detektoidun polymeraasi- ja/tai kapsidigeeniin saumassa olevaan konsentroituneeseen sekvenssikohtaan. Nämä menetelmät mahdollistavat nopean ja monipuolisen genotyyppitunnistuksen (2). Genotyypin määrittäminen suositellaan aloitettavan kapsidisekvenssin analysoinnista. Tämä helpottaa viruksen tartuntalähteen selvittämisessä silloin, kuin virus on voitu eristää myös ympäristönäytteestä (esim. vesi tai ruoka). (1) Vaikka uuden sukupolven immunologisilla ELISA-menetelmillä voidaan tunnistaa aiempaa kattavammin eri noroviruskantoja, eivät ne kuitenkaan tunnista kaikkia genotyyppisiä, ja parhaimmillaankin niiden herkkyys jää alle 60 %:n PCR-testiin verrattuna.(2)

3.4 Sapovirus

3.4.1 Rakenne

Sapovirus on vaipaton RNA-virus. Sapovirus on yksi gastroentriitin aiheuttajista ihmisille ja sioille (22). Viruksen genomi on positiivista yksijuosteista RNA:ta ja noin 7,5 kilobästä pitkä. Sapovirukset ovat lähempänä perinteistä kalikivirusta kuin norovirukset.

Sapovirukset jaetaan viiteen genoryhmään (GI, GII, GIII, GIV ja GV), joista GI, GII, GIV ja GV infektoivat ihmisiä, kun taas GIII esiintyy sioilla (21). Viruksen genomi jakautuu kolmeen tai kahteen lukukohtaan, ORF1 ja ORF2 tai ORF3. (Kuvassa 4 on Sapporon kaltaisten virusten genomien rakenne, joka sisältää kaksi ORF-aluetta.) ORF1 koodaa kuutta ei-rakenneproteiinia ja yhtä kapsidiproteiinia VP1:tä (22). Vielä ei ole selvitetty tarkemmin, mitä proteiineja ORF2 ja ORF3 tuottavat (23).

3.4.2 Epidemiologia

Sapovirusinfektioita esiintyy harvemmin kuin norovirusinfektioita. Virus aiheuttaa infektoita lähinnä lapsilla, mutta viime aikoina on infektoita todettu yhä enemmän nuorilla aikuisilla ja vanhuksilla.

Taudin kliinisinä oireina ovat yleensä ripuli, myös kuumetta ja oksentelua voi esiintyä. Oireet ilmaantuvat 24 – 48 tunnin kuluttua tartunnasta. Lasten ripulitaudeista sapovirusinfektio aiheuttaa noin 10 %. Suomen tartuntatautirekisterin mukaan vuosina 2007 – 2009 ei kirjattu ainuttakaan sapovirusinfektiota.(5) Todennäköisesti pidempiaikaisen immuniteetin kehittymisen vuoksi niitä tavataan harvemmin kuin norovirusia veden ja ruoan välityksellä leviävissä epidemioissa (1).

3.4.3 Diagnostiikka

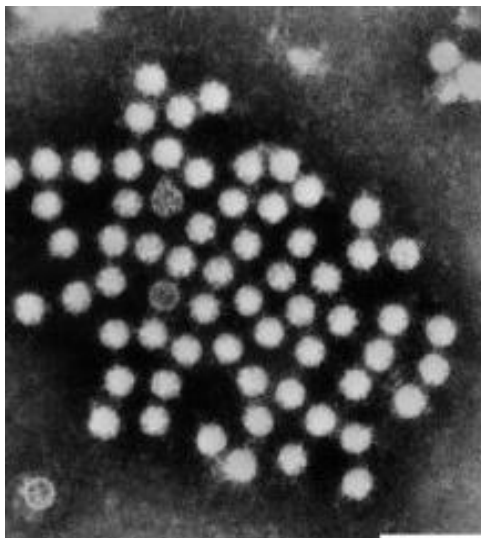
Ensimmäistä kertaa vuonna 1977 Japanissa tutkijat tunnistivat sapoviruksen elektronimikroskoopilla. Tunnistus silmämääräisesti on kuitenkin epäspesifinen menetelmä, jossa tuloksen oikeellisuutta ei pystytä todistamaan. Viruksen osoitukseen näytteestä on käytetty myös ELISA-menetelmää. Analyysi perustuu antigeenien määrittämiseen näytteestä. Luotettavimmaksi menetelmäksi on todettu PCR-menetelmät. Reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä pystytään tunnistamaan näytteessä oleva virus, mutta viruksen genotyypin selvittämiseen käytetään RT-PCR-tekniikkaa (24).

4 Astrovirukset

Ihmisen astrovirusia on kuvattu ensimmäistä kertaa vuonna 1975 elektronimikroskoopilla. Astrovirusten sukuun kuuluvat sekä ihmisten että eläinten astrovirukset. Tällä hetkellä on löydetty 8 eri serotyyppiä, jotka esiintyvät ihmisessä. Astroviruksen tunnistaa elektronimikroskoopilla tähtimäisestä ulkokuorestaan (kuva 5). Viruksen eri serotyyppiä on löydetty vain gastroentriitien yhteydessä. Vuonna 1984 tutkijat löysivät viisi serotyyppiä, jotka pystyttiin 1980-luvulla todistamaan ELISA-menetelmällä. Viruksen genomi saatiin selville vuonna 1991 (11).

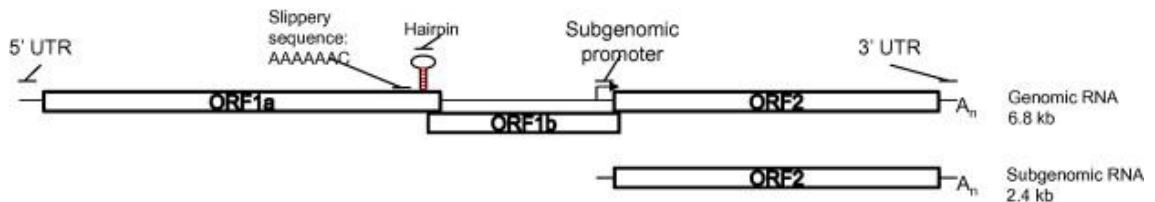
4.1 Rakenne

Astrovirukset ovat vaipattomia positiivisäikeisiä RNA-virusia. Elektronimikroskoopin avulla on pystytty kuvaamaan viruksen rakennetta. Virukset ovat halkaisijaltaan n. 28 - 30 nm pyöreitä partikkeleita, joiden pintarakenne on säännöllinen ja muodostaa "Davidin tähti" -kuvion (kuva 5) (11 s. 875–890).



Kuva 5. Elektronimikroskooppikuva astroviruksesta, josta näkee viruksen tähtimäistä rakennetta. (Kuva on muokattu lähteestä 17.)

Virusen genomi-RNA on 6,8 kiloemästä, ja sen subgenomi-RNA on 2,4 kiloemästä. Genomi-RNA koostuu kolmesta ORFs-lukukohdasta. ORF1a ja ORF1b sijaitsevat RNA:n 5'-päässä ja koodaavat rakenteellisia proteiineja. ORF2 sijaitsee RNA:n 3'-päässä, ja se koodaa viruksen rakenneproteiineja (kuva 6). Ihmisen astrovirusen serotyypeissä 1, 6 ja 8 esiintyy alagenomi-RNA:ta (11 s. 875–890).



Kuva 6. Astrovirusen genomi. (Kuva on muokattu lähteestä 26.)

Astrovirusen lisääntyminen tapahtuu samalla tavalla kuin kalikivirustenkin. Virusgenomin ORF1a- ja ORF1b-alueet koodaavat translaatiossa sekä replikaatiossa tarvittavia proteiineja. Nämä proteiinit valmistetaan heti infektion alkuvaiheessa, jolloin syklin edetessä ORF2-alueen sisältämän tiedon avulla pystytään valmistamaan viruksen rakenneproteiineja (luku 3.1.1).

4.2 Epidemiologia

Astrovirus on suurin aiheuttaja alle 2-vuotiaiden lasten, vanhusten ja heikon immuniiteetin omaavien henkilöiden ripulitaudeissa. Virus aiheuttamia infektioita esiintyy eniten talvikuukausina, vaikkakin astrovirusta tavataan myös keväällä ja kesällä (26). Yleisimmin tavattu tyyppi on ollut virustyyppiä 1. Astrovirusten osuus lasten ripulitaudeissa vaihtelee 1 ja 9 %:n välillä. Englannissa on arvioitu astrovirusen osuudeksi noin 4-5 %, kun taas Suomessa sama osuus on 10 %:n luokkaa. Sairastuneen oireet ovat kuitenkin useasti niin lieviä, etteivät ne vaadi sairaalahoitoa lainkaan. Astrovirukset aiheuttavat harvoin aikuisille ihmisille infektioita, mutta saastuneen veden tai ruoan välityksellä aikuinen ihminen voi sairastua. (1)

Astrovirusen inkubaatioaika on 1-3 vrk. Tartunnat saadaan usein kalikiviruksen tapaan kosketustartuntana. Infektion pääasiallinen oire on ripuli, joka on yleensä kestoaltaan

hyvin lyhyt. Pisimmällään oireet voivat jatkua jopa pari viikkoa, jolloin oireilu viittaa serotyypin 3-infektioihin. Immunosuppressoiduilla potilailla virusinfektio voi jatkua vuosia. Virusinfektion seurauksena ei synny immuniteettia, eikä immuniteetti näin ollen suojaa toiselta serotyypin infektiolta.(1)

4.3 Diagnostiikka

Astrovirus pystytään tunnistamaan elektronimikroskoopilla ulostenäytteestä, käyttäen värjäystekniikkaa. Elektronimikroskopiolla pystytään tunnistamaan virus tähtimäisen ulkokuoren avulla, mutta tarkempaan tunnistukseen menetelmällä ei pystytä. Entsyymi-immuunianalyysejä ja RT-PCR-menetelmää käyttäen näytteessä oleva virus pystytään tunnistamaan ja tyyppittämään viruksen genotyyppi. EIA-menetelmän herkkyys on 91 % ja spesifisyys on 98 %. Menetelmässä tutkitaan elimistössä muodostuneen vasta-aineen ja viruksen antigeenin välistä reaktiota. Jos tämä reaktio toteutuu, voidaan todeta näyte positiiviseksi viruksen suhteen. EIA-menetelmään riittää ulostenäytteessä 10^5 - 10^6 viruspartikkelia/g. RT-PCR-menetelmä on menetelmistä spesifisin. Menetelmällä pystytään tunnistamaan virus hyvin pienissä pitoisuuksissa. RT-PCR-menetelmällä riittää 10 - 100 viruspartikkelia/g (11, s.887-888).

5 Työn tavoitteet ja tarkoitus

Työn tarkoituksena oli selvittää varhaislapsuudessa ilmeneviä suolistoinfektioita. Työ pohjautui THL:n ja Turun yliopistollisen keskussairaalan toteuttamaan Turun seudun lapsiin pohjautuvaan tutkimukseen, jossa selvitetään lapsuusajan diabeteksen ja suolistoinfektioiden yhteyttä. Työssä käytetyt näytteet saatiin turkulaisilta lapsilta, joiden vanhemmat olivat suostuneet tutkimukseen. Ohjeena tutkimushenkilöiden vanhemmille oli ottaa näyte, jos lapsella ilmenee infektioauteihin viittaavia oireita. Näytteet otettiin sekä ulosteesta (2 putkea) että nenä-nielueritteestä. Työssäni keskityin ainoastaan ulostenäytteiden tutkimiseen.

Työssäni käsittelen virusten tunnistamista näytteistä. Kun sairastuneelta henkilöltä otetut näytteet saapuivat tutkimuslaitokselle, näytteet koodattiin ja aloitettiin näytteen esikäsitteily. Toisesta näytteestä valmistettiin kloroformiekstraktilla suspensio, jossa pyrittiin erottamaan mahdollinen viruspartikkeli erilleen kiinteästä tavarasta. Tämä suspensio jaettiin kolmeen eppendorfputkeen, käyttöeriin. Valmiista suspensiosta eristettiin RNA:ta PCR-menetelmiä varten. RNA eristettiin näyte-suspensiosta ensin irrottamalla RNA soluista TRK-hajoituspuskurilla. Liitteessä 4 on esitelty työn vaiheiden kulku kaaviokuvana.

6 Menetelmät

6.1 Ulostenäytteen esikäsittely

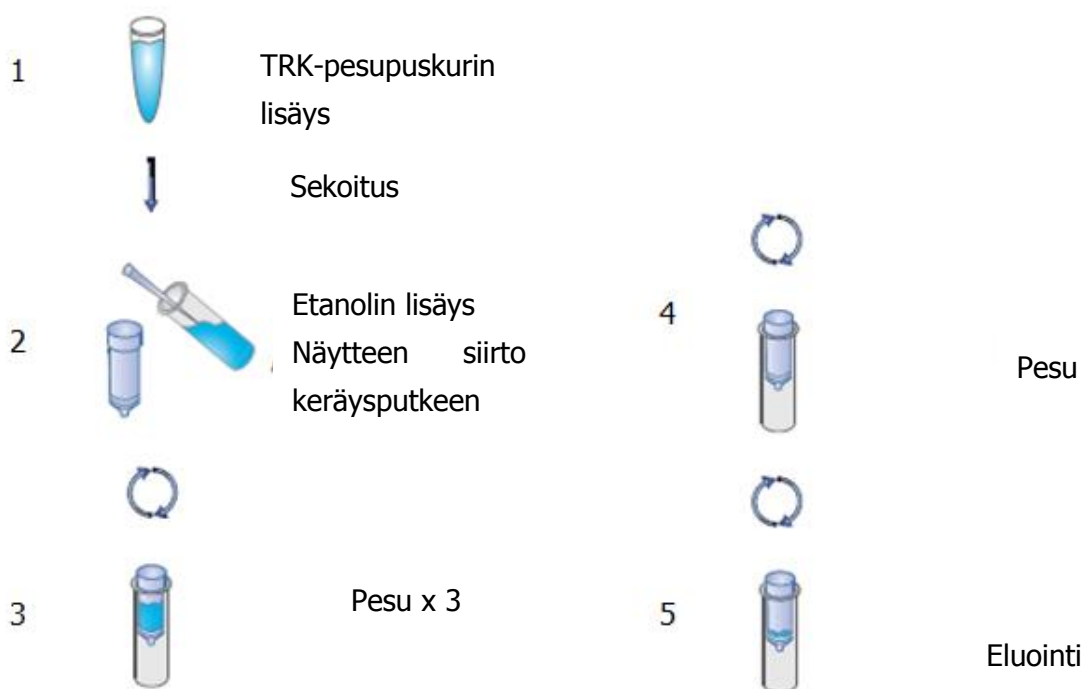
Ulostenäytteen esikäsittely tarkoittaa näytteen saamista nestemuotoon eli ravisteeksi, jotta siinä olevat taudinaiheuttajat saataisiin erilleen muusta materiaalista. Magnesiumia ja kalsiumia sisältävään fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS-liuos, THL:n laboratorioyksikkö, Latu) lisätty penisilliini, streptomysiini ja gentamysiini (PeStG, Latu) estää bakteerien ja homeiden lisääntyminen näytteessä. Liuokseen lisättävä kloroformi inaktivoi myös bakteereja ja homeita, mutta varsinainen päätehtävä on poistaa sytotoksisia eli solulle myrkyllisiä lipidejä ja hajottaa virusagregaatteja.

15 ml:n kloroformia kestäviin putkiin laitettiin 5-10 steriiliä lasihelmeä. Putkeen pipetoi-
tiin lasipipetillä 5 ml (tai 2 ml mikäli näytettä oli todella vähän) kylmää (+2 - +8 °C)
liuosta PBS (Ca + Mg) – PeStG. Putki merkittiin näytekoodin mukaisesti. Putkeen lisät-
tiin lasipipetillä 0,5 ml (tai 0,2 ml) kloroformia. Samaan putkeen lisättiin siirrostussau-
valla 1,0 g (tai 0,4 g mikäli näytemäärä oli erittäin pieni) ulostenokare. Näyte ravistel-
tiin ensin voimakkaasti käsin, jolloin saatiin esivaikutelma näytteen riittävästä määrästä.
Määrää arvioitiin ravisteen värin mukaan. Jotta näytteestä saataisiin mahdollisim-
man hyvin irrotettua virukset kiinteästä materiaalista, vorteksoitiin näytettä 20 min noin
1200 rpm nopeudella. Näytteet sentrifugoitiin lopuksi 20 min noin 2500 rpm (revolu-
tions per minute eli kierrosta minuutissa) jäädytetyssä sentrifugissa (+7,5 °C). Sent-
rifugissa erotetuista faaseista ylin faasi pipetoitiin kertakäyttöisillä pasteurpipetillä kol-
meen kierrekorkkiseen putkeen. Putket oli merkitty koodatulla näytekoodilla sekä kir-
jaintunnuksella (A, B tai C). Kirjaintunnuksilla merkatut putket toimivat varastoputkina,
jolloin virustunnistuksia tehdessä ei koko näytemäärää sulatettu. Lopuksi putkesta A
otettiin 100 µl puhtaaseen eppendorffputkeen RNA-eristystä varten. Käsitellyt näytteet
säilytettiin -70 °C:ssa. (27)

6.2 RNA-eristys

Tutkimusmenetelmän periaate

Nukleiinihappojen puhdistukseen käytetään monia eri tapoja. Pääasiana on saada puhdas nukleiinihappo erilleen muusta materiaalista. RNA-eristys alkaa viruksen isäntäsolun hajottamisella TRK-hajoituspuskurilla, jotta virus-RNA:ta pystytään käsittelemään. RNA-eristyksessä saostetaan nukleiinihapot esimerkiksi etanolilla, jolloin sentrifugoitaessa näytteen epäpuhtaudet jäävät liuokseen ja saostetut nukleiinihapot voidaan liuottaa uuteen puskuriliuokseen. Eristettävää RNA:ta on puhdistettava useaan kertaan pesemällä, jotta näytteessä olleet epäpuhtaudet saadaan erilleen RNA:sta, kuten proteiinit (28).



Kuva 7. Kaavakuva RNA-eristyksestä, jossa on käytetty silikaattipylväitä. (Kuva on muokattu lähteestä 34.)

Tässä työssä tutkittavana materiaalina käytettiin esikäsiteltyjä potilasnäytteitä. Käytetty näytetilavuus oli 100 µl ja RNA-eristyksessä käytettiin kaupallista kittiä (E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit, Omega Bio- Tek, Doraville, GA, USA).

Reagenssit

1. E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit (Omega Bio-tek, Donrville, GA, USA)

Kitin sisältö:

- HiBind[™] RNA-eristyspylväitä
- 2 ml:n keräysputkia
- TRK-hajotuspuskuri
- RNA-pesupuskuri I
- RNA-pesupuskuri II
- DEPC-H₂O eli dietyylipyrokarbonaatilla RNAasi-vapaaksi käsitelty vesi, käytetään negatiivisena kontrollina ja eluoinnissa

2. β-merkaptotoetanol

3. Etanoli 99,5 % (puhtausaste Aa)

4. DEPC- H₂O eli dietyylikarbonaatilla RNAasi- vapaaksi käsitelty vesi, LATU, tuotenumero 778 (käytetään etanolin laimentamiseen).

Laitteet ja välineet

- Koeputkisekoittaja, Vortex Genie, Prolab, Oriola Oy
- Pöytäseentrifuugi, MIKRO 12.24, Hettich

Työn suoritus

RNA-eristyksessä näytteiden lisäksi mukaan otettiin negatiivinen kontrolli (100 µl DEPC-H₂O:ta). Eppendorffputkiin lisättiin 350 µl TRK-hajotuspuskuria ja sekoitettiin koeputkisekoittajalla. Näyte pipetoitiin HiBind[®] RNA-pylvääseen ja sentrifugoitiin n. 15 s n. 12 000 rpm, jolloin näyte-RNA kiinnittyi pylvään kalvoon.

Pylväät siirrettiin uusiin keräysputkiin ja pipetoitiin 300 µl pesupuskuri I:tä. Pylvästä sentrifugoitiin 15 s n. 12 000 rpm ja kaadettiin läpitullut neste jäteastiaan. Pesu uusittiin pipetoimalla 500 µl pesupuskuri I:tä pylvääseen ja sentrifugoitiin 15 s 12 000 rpm.

Kun läpituullut neste oli kaadettu pois, jatkettiin pesua pipetoimalla 500 µl pesupuskuri II:ta pylvääseen ja sentrifugoitiin. Pesu uusittiin pipetoimalla 500 µl pesupuskuri II:ta pylvääseen, joka sentrifugoitiin. Läpituullut neste kaadettiin keräysputkesta jäteastiaan. Tyhjää pylvästä sentrifugoitiin 1 min 12 000 prm, minkä jälkeen pylväs siirrettiin 1,5 ml:n eppendorffputken. Erotettu RNA eluoiitiin pipetoimalla 50 µl DEPC-H₂O:ta (E.Z.N.A[®] Total RNA Kit) membraanin keskelle. Pylvästä sentrifugoitiin 1 min 12 000 rpm. Eristetyt RNA:t säilytettiin -70 °C:ssa.

6.3 Reaaliaikainen RT-PCR

Reaaliaikaisessa RT-PCR-menetelmässä virus-RNA kopioidaan komplementaariseksi DNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien ja reverse-alukkeen avulla. Komplementaarista DNA:sta monistetaan spesifisten forward- ja reverse-alukkeiden välinen jakso moninkertaiseksi ns. real-time RT-PCR -menetelmään soveltuvalla laitteella, jossa DNA:n monistumista voidaan seurata reaaliaikaisesti.

Reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä käytettiin kahta menetelmää. Yksijuosteiset RNA-virukset tunnistettiin yhdenputken menetelmällä ja kaksijuosteiset RNA-virukset kahden putken menetelmällä. Kahden putken menetelmän erona yhden putken menetelmään oli genomien denaturointi, jolloin viruksen genomi saatiin yksijuosteiseksi ja komplementaarisen DNA:n valmistus onnistui PTC-200-laitteella.

6.3.1 Astrovirusten reaaliaikainen RT-PCR

Tutkimusmenetelmän periaate

Astrovirus-RNA:n kopiointiin käytettiin yhden putken menetelmää. Monistettava alue on 90 bp pitkä ja sijaitsee astrovirus genomien 3'-päässä. Monistuvan DNA:n detektio perustuu kaksoisleimattujen fluorogeenisten koettimien käyttöön. Toinen leimoista (FAM) toimii fluoresenssisignaalin reportterina eli valoa vapauttavana ryhmänä ja toinen (BHQ-1) sen vaimentajana. Kun uutta DNA-juostetta rakennetaan, vapautuu reportteri, sen etäisyys vaimentajasta kasvaa, vaimentajan vaikutus lakkaa ja reportterin valoa

voidaan mitata. Näytteen fluoresenssi lisääntyy PCR:ssä sykli sykliltä, ja sen intensiteetti mitataan reaaliaikaiseen PCR:ään soveltuvalla laitteella (Mx3005P, Stratagene)

Näytteet

Näyte-RNA:t saatiin RNA-eristyksestä, joka on suoritettu enteroviruslaboratorion ohjeiden mukaisesti (RNA-eristys Omega-kitillä/ENVI-MO.20). Positiivisena kontrollina käytettiin puhtaasta virusnäytteestä eristettyä astrovirus-RNA:ta. Real-time RT-PCR:n jälkeen PCR-tuotteet hävitetään autoklavoimalla.

Reagenssit

1. Alukkeet (Cann et al. 2003)

Genoryhmä II

Reverse-alue:

AV1 5' CCG AGT AGG ATC GAG GGT 3'

Forward-alue:

AV2 5' GCT TCT GAT TAA ATC AAT TTT AA 3'

(R = G/A, W = A/T, Y = A/S)

Kantaliuokset säilytettiin alle -18 °C lämpötilassa PCR-reagenssilaboratoriossa. Sigma-H₂O:hon tehdyt 10 µM käyttölaimekset säilytettiin alle -18 °C lämpötilassa PCR-reagenssilaboratoriossa.

2. Koetin

Genoryhmä II

AVs 5' Fam – CTT TTC TGT CTC TGT TTA GAT TAT TTT AAT CAC C – BHQ- 1-3'

Kantaliuokset säilytetään alle -18 °C lämpötilassa PCR-reagenssilaboratoriossa. RT-PCR:ssä käytettävä 10 µM:n käyttölaimekset tehtiin Sigma-H₂O:hon. Käyttölaimekset säilytetään valolta suojattuna alle -18 °C lämpötilassa. Käyttölaimekset saa sulattaa ja jäädyttää korkeintaan 10 kertaa.

3. QIAGEN® QuantiTect™ Probe RT-PCR -kitti

Kitin sisältö:

2X QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	3 x 1,7 ml
HotStarTaq® DNA Polymerase	
QuantiTect Probe RT-PCR Buffer	
dNTP mix including dUTP	
ROX (passiivinen referenssiväri)	
8 mM MgCl ₂	
QuantiTect RT Mix	0,1 ml
Omniscript™ Reverse Transcriptase	
Sensiscript® Reverse Transcriptase	
RNAasi- vapaa vesi	2 x 2,0 ml

Kittiä säilytetään valmistajan ohjeiden mukaisesti valolta suojattuna alle -18 °C lämpötilassa.

4. Sigma-H₂O

Laitteet ja välineet

- Koeputkisekoittaja, Vortex Genie, Prolab, Oriola Oy
- Pöytäseentrifugi, Biofuge pico, Haraeus
- Pöytäseentrifugi stripeille, Apollo instrumentation
- Säädetäviä ja ainoastaan real-time RT-PCR -töihin tarkoitettuja mikropipettejä, ThermoElectron Finnpipette
- Real-time PCR:ään soveltuvia liuskoja ja niiden kansia, Stratagene
- Real-time PCR-laite, Stratagene Mx3005P

Työtilat

RT-PCR-reaktioseos tehtiin PCR-reagenssilaboratorion laminaarikaapissa. RNA-näyte lisättiin reaktioseokseen PCR-näytelaboratoriossa laminaarikaapissa.

Työn suoritus

Näytteet siirrettiin pakastimesta (-70 °C) jääkaappiin (+8 °C). PCR-reagenssilaboratorion laminaarikaapin työtaso pyyhittiin ensin 0,4 % hypokloriittiliuoksella ja Desinfektol-P-liuoksella.

Reagenssien valmistaminen

Sigma-H₂O jaettiin käyttöeriin 1,5 ml:n eppendorffputkiin sekä valmistettiin alukkeiden ja koettimien laimennoksen, 10 µM, Sigma-H₂O:hon.

RT-PCR:n pipetointiohje

Reaktioseoksen ohje yhdelle reaktiolle:

2 x QuantiTect Master Mix	10 µl
10 µM forward-aluke (AV2)	2 µl
10 µM reverse-aluke (AV1)	2 µl
10 µM koetin (A _{vs})	0,4 µl
QuantiTect RT Mix	0,2 µl
RNaasi-vapaa H ₂ O (QIAGEN)	0,4 µl

Jäässä olleet reagenssit otettiin sulamaan laminaarikaappiin telineeseen, mutta neste-mäisenä olleet pidettiin kylmäblokkissa koko työskentelyn ajan.

Positiivikontrollin laimennossarjaa varten pipetoitiin RNase-vapaata vettä (Sigma) 45 µl kolmeen eppendorffputkeen positiivisen kontrollin laimennossarjaa varten.

Reaktioseosta varten pipetoitiin tarvittavalle reaktiomäärälle reagenssit ja sekoitettiin koeputkisekoittajalla. Valmista reaktioseosta pipetoitiin 15 µl PCR-liuskan kuoppaan,

jota pidettiin kylmäblokillä. Yhteen PCR-liuskan kuoppaan pipetoitiin negatiivista kontrollia (Sigma-H₂O) 15 µl.

Näytteet sekoitettiin hyvin ja kutakin näytettä pipetoitiin 5 µl PCR-liuskalle. Viimeiseksi valmistettiin positiivinen kontrollilaimennossarja. Laimennossarjan 10⁻¹ ja 10⁻³ laimennoksista pipetoitiin 5 µl PCR-liuskan kuoppiin. Liuskat suljettiin huolella ja sekoitettiin vorteksoimalla. PCR-reaktiot sentrifugoitiin nopeasti putkien pohjalle.

Valmiit PCR-reaktiot vietiin PCR-laitteeseen. Laitteessa käytettiin norovirus-ohjelmaa. Alla olevassa taulukossa on PCR-reaktiosyklin lämpötilat ja ajat.

Taulukko 1. PCR-reaktiosyklin lämpötilat ja ajat

50 °C	25 min	50 sykliä
95 °C	15 min	
95 °C	15 s	
54 °C	45 s	
72 °C	45 s	

Ajo tallennettiin ja tarkasteltiin tuloksia. Jos positiivinen ja negatiivinen kontrolli täyttivät niille asetetut rajat, voitiin työ itse hyväksyä. Poikkeavat tulokset katsottiin menetelmävastaavan kanssa. (29)

6.3.2 Sapoviruksen reaaliaikainen RT-PCR

Työssä käytettiin samaa kittiä kuin astrovirus rRT-PCR:ssä ja sapovirukselle sopivia alukkeita ja koettinta. PCR-ajossa käytettiin samaa ohjelmaa kuin astroviruksen PCR-ajossa

Alukkeet:

SLVCF (SaV-FO)	5'- GAY CWG GCY CTC GCC ACC T – 3'
SLVCR (SaV-RE)	5'- GCC CTC CAT YTC AAA CAC TA -3'

Koetin:

SLVCP (SaV-PR)	5' FAM – TGY ACC ACC TAT RAA CCA VG – BHQ1 3'
----------------	---

Vaihtelevat koodit: R = A tai G, W = A tai T, Y = T tai C ja V = A tai C tai G.

Positiivisesta kontrollista tehtiin laimennossarja $10^{-1} - 10^{-7}$, ja kaikki laimennokset otettiin mukaan työhön.

6.3.3 Noroviruksen 1. genomiryhmän reaaliaikainen RT-PCR

Työssä käytettiin samaa kittiä kuin astrovirus rRT-PCR:ssä käyttäen norovirukselle (NoV GI) sopivia alukkeita ja koetinta.

Alukkeet:

NoV-QNIF4	5' – CGC TGG ATG CGN TTC CAT – 3'
NoV-QNIF3	5' – GTC CTT AGA CGC CAT CAT CAT TT – 3'

Koetin:

JTMG1	5' FAM – TGT GGA CAG GAG ATC GCA ATC TC – BHQ-1 3'
-------	--

Vaihtelevat koodit: N = G tai A tai T tai C.

Positiivisista kontrollin laimennoksista otettiin työhön mukaan 10^{-1} ja 10^{-3} .

6.3.4 Noroviruksen 2. genoryhmän reaaliaikainen RT-PCR

Työssä käytettiin samaa kittiä kuin astrovirus rRT-PCR:ssä käyttäen norovirukselle (NoV GII) sopivia alukkeita ja koetinta.

Alukkeet:

NoV-QNIF2D	5' – ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA – 3'
NoV-COG2R	5' – TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA – 3'

Koetin:

QNIFS	5' FAM – AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG – BHQ-1 3'
-------	--

Vaihtelevat koodit: R = A tai G ja W = A tai T.

Positiivisista kontrollin laimennoksista otettiin työhön mukaan 10^{-1} ja 10^{-3} .

6.4 Rotavirusten reaaliaikainen RT-PCR

Tutkimusmenetelmänä oli rotavirusgenomin detektio näytteestä reaaliaikaisella RT-PCR:llä. (30)

Tutkimusmenetelmän periaate

Kahden putken menetelmällä rotavirus-RNA kopioidaan ensin komplementaariseksi DNA:ksi käänteiskopioija-entsyymien ja random-alukkeen avulla. Komplementaarisesta DNA:sta monistetaan spesifisten forward- ja reverse-alukkeiden välinen jakso moninkertaiseksi reaaliaikaiselle RT-PCR-menetelmällä eli menetelmällä, jossa pystytään seuraamaan reaaliaikaisesti DNA:n monistumista. Monistettava alue on noin 80 dp pitkä ja sijaitsee rotavirusgenomin VP2-geenin 3'-päässä. Monistuvan DNA:n detektio perustuu kaksoisleimatus fluorogeenisen koettimen käyttöön. Toinen leimoista (FAM) toimii fluoresenssisignaalin reportterina eli valoa vapauttavana ryhmänä ja toinen (MGB ja ei-fluoresoiva NFQ) sen vaimentajana. Kun uutta DNA:ta rakennetaan, vapautuu reportteria. Sen etäisyys vaimentajasta kasvaa, vaimentajan vaikutus lakkaa ja reportterin valoa voidaan mitata. Näytteen fluoresenssi lisääntyy PCR:ssä syklisykliltä, ja sen intensiteetti mitataan reaaliaikaiseen PCR:ään soveltuvalla laitteella.

Näyte

Näytteet ovat peräisin RNA-eristyksestä. Reaaliaikaisen RT-PCR:n jälkeen PCR-tuotteet hävitettiin autoklavoimalla.

Reagenssit

1. Alukkeet

Forward-alukkeet:

Vp2-F1	5'- TCT GCA GAC AGT TGA ACC TAT TAA -3'
Vp2-F2	5'- CAG ACA CGG TTG AAC CCA TTA A -3'
Vp2-F3	5'- TCG GCT GAT ACA GTA GAA CTT ATA AAT G -3'
Vp2-F4	5'- TGT CAG CTG ATA AG TAC AAC CTA TAA ATG -3'
Vp2-F5	5'- TCA GCT GAC ACA GTA GAA CCT ATA AAT G -3'

Reverse-alukkeet:

Vp2-R1	5'- GTT GGC GTT TAC AGT TCG TTC AT -3'
Vp2-R2	5'- GTT GGC GTC TAC AAT TCG TTC AT -3'

Kantaliuokset säilytettiin alle -18 °C:ssa PCR-reagenssilaboratoriossa. Kantaliuoksista tehtiin 25 µM käyttölaimekset sigma-H₂O:hon ja säilytettiin alle -18 °C:ssa PCR-reagenssilaboratoriossa.

2. Koetin

Vp2-P 5' FAM – ATG CGC ATR TTR TCA AAH GCA A – MGBNFQ 3'

Vaihtuvat koodit: H = T tai C tai A ja R = A tai G

Kantaliuokset säilytetään alle -18 °C:ssa PCR-reagenssilaboratoriossa. RT-PCR:ssä koettimien 5,3 µM käyttölaimekset valmistettiin sigma-H₂O:hon. Käyttölaimekset säilytetään valolta suojattuna alle -18 °C:ssa.

3. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with Rnase Inhibitor (Applied Biosystems, Cat. No.: 4374967, 1000 reactions)

Kitin sisältö:

10X RT-puskuri	2 x 1 ml
10X RT Random aluke	2 x 1 ml
25X dNTP Mix (100 mM)	1 ml
MultiScribe™ Reverse Transcritase	50 U/μl

4. Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Cat. No.: 4364340, 1000 reactions)

Taqman® Universal PCR Master Mix 5 x 5 ml

5. Sigma-H₂O, Sigma Water for Molecular Biology (Sigma)

Referenssimateriaalit, standardit ja kontrollit

Negatiivisena kontrollina käytettiin vesikontrollia (Sigma-H₂O). Positiivisena kontrollina käytettiin tunnettua vahvasti positiivista näytettä, josta tehtiin yhdellä kerralla monta RNA-eristystä. Positiiviset kontrolli-RNA säilytetään alle -65 °C lämpötilassa. Tunnetuista positiivisista kontrolli-RNA:sta kopioitiin joka työssä cDNA, joista tehtiin PCR-vaiheessa yksi laimennos (1:10) kontrolliseuranta varten.

Laitteet ja välineet

1. Koeputkisekoittaja
2. Pöytäseentrifugi
3. Pöytäseentrifugi stripeille
4. PTC-200-pelttier Thermal cycler

Esivalmistelut

Sigma-H₂O jaettiin käyttöeriin ja valmistettiin alukkeiden (25 μM) ja koettimen (5,2 μM) käyttölaimekset. Käyttölaimekset tehtiin Sigma-H₂O:hon.

cDNA:n valmistus

Pipetoitiin kutakin näytettä 10 µl eppendorffputkiin ja näytteet denaturoitiin 5 min 97 °C:ssa, jonka jälkeen niitä pidettiin 5 min jäällä. Näytteiden denaturointi tehtiin PTC-200-laitteeseen ohjelmoidulla ohjelmalla.

Valmistettiin 2X RT master mix -seos. Jäässä olleiden reagenssien annettiin sulaa, mutta nestemäisinä olleet reagenssit pidettiin kylmäblokissa työskentelyn ajan.

Reaktioseoksen ohje yhdelle reaktiolle

10x RT-puskuri	2 µl
25x dNT Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random aluke	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl

Reaktioseos valmistettiin eppendorffputkeen. Valmis seos sekoitettiin koeputkisekoittajalla hyvin ja pipetoitiin 10 µl reaktioseosta kuhunkin eppendorffputkeen, denaturoidun RNA:n joukkoon. Näytteet sentrifugoitiin nopeasti putken pohjalle. Valmiit putket asetettiin PTC-200-laitteeseen ja käynnistettiin ROTA-ohjelma.

Taulukko 2. PTC-200-laitteessa käytetyn laitteen syklit ja ajat

Vaihe	1	2	3	4
Lämpötila (°C)	25	37	85	4
Aika	10 min	120 min	5 sek	∞
Tilavuus	20 µl			

Valmiit cDNA:t säilytettiin -70 °C:ssa RT-PCR:n tekoon saakka.

Reaaliaikainen RT-PCR

Valmistettiin PCR-reaktioseos seuraavista reagensseista. Reaktioseoksen ohje on yhdelle reaktiolle:

Taqman Universal PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Aluke Vp2-F1 (25 µM)	0,9 µl
Aluke Vp2-F2 (25 µM)	0,9 µl
Aluke Vp2-F3 (25 µM)	0,9 µl
Aluke Vp2-F4 (25 µM)	0,9 µl
Aluke Vp2-F5 (25 µM)	0,9 µl
Aluke Vp2-R1 (25 µM)	0,9 µl
Aluke Vp2-R2 (25 µM)	0,9 µl
Koetin Vp2-P (5,2 µM)	1,20 µl
yhteensä	20 µl

Reagenssit pidettiin kylmäblokillä PCR-reaktioseoksen valmistuksen ajan. Kaikki reagenssit pipetoitiin eppendorffputkeen ja sekoitettiin hyvin koeputkisekoittajalla. Reaktioseosta pipetoitiin 20 µl kuhunkin PCR-stripin kuoppaan. Negatiivista kontrollia varten pipetoitiin yhteen kuoppaan Sigma-H₂O:ta 20 µl.

Kutakin cDNA:ta pipetoitiin 5 µl PCR-liuskan kuoppiin. Kontrolli RNA:sta valmistetusta cDNA:sta tehtiin laimennokset (1:3 ja 1:30) ja pipetoitiin 5 µl kutakin laimennosta PCR-stripin kuoppiin.

Stripit suljettiin ja vietiin PCR-laitteeseen. PCR-laitteeseen on valmiiksi ohjelmoitu Rota-ohjelma, jolla ajo suoritettiin. Alla olevasta taulukosta 3 näkee Rota-ohjelman kulun PCR-laitteessa.

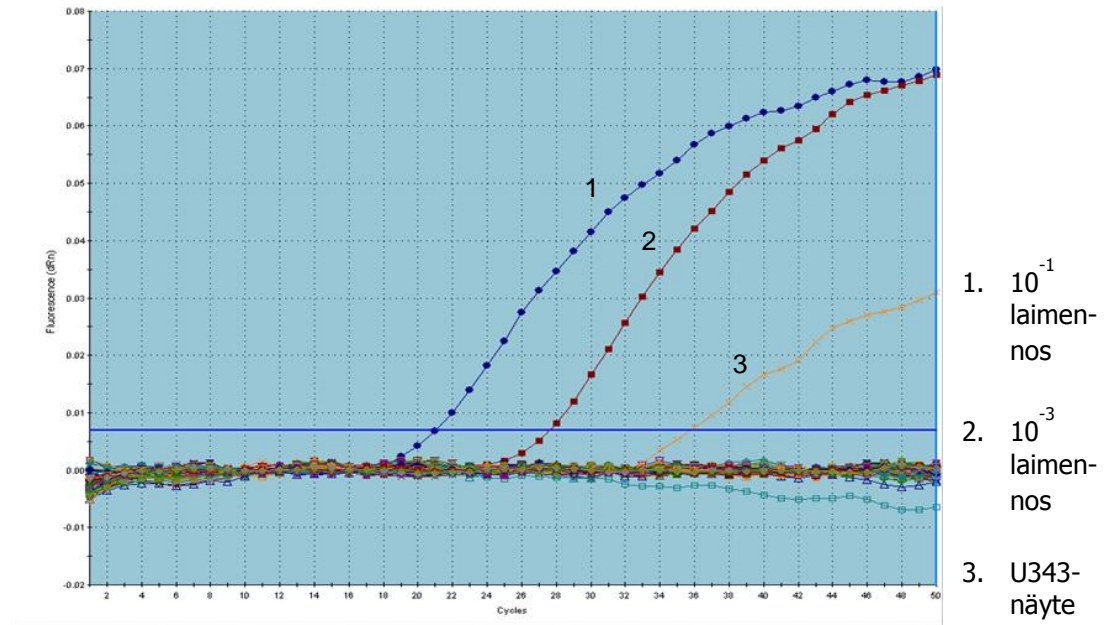
Taulukko 3. Rotaviruksen RT-PCR-ajon syklit ja ajat

	UNG incubati- on	AmpliTaq Gold Activati- on		
Vaihe	HOLD	HOLD	CYCLE (45 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Lämpötila	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Aika	2 min	10 min	15 sec	1 min
Tilavuus	25 µl			

Ajon jälkeen PCR-tuotteet hävitettiin autoklavoimalla.

PCR-tuloksen tulkinta ja kirjaus

Työ hyväksyttiin, mikäli negatiivinen kontrolli on negatiivinen ja positiivinen kontrollilaimennus 1:3 on positiivinen ja $\pm 10\%$ kontrolliseurannan keskiarvosta. Mikäli tulos oli negatiivinen, uusittiin RT-PCR. Jos näytteen dRn-arvo kohosi yli treshold-arvon (eli kynnysarvon, joka oli noin 10 % positiivisen kontrollin 1:3 dRn-arvosta), näyte tulkittiin positiiviseksi. Mikäli näytteelle ei tullut Ct-arvoa, mutta positiivinen kontrolli oli positiivinen, näyte tulkittiin negatiiviseksi. Mikäli negatiivinen kontrolli oli positiivinen, kontaminaatiosta tuli ilmoittaa välittömästi menetelmän yhdyshenkilölle. (31) Kuvassa 8 on esimerkki RT-PCR-ajon kuvaajasta. Kuvaajassa nousevina käyrinä yksi ja kaksi ovat positiivikontrollin laimennoksia ja kolmas käyrä on löytynyt positiivinen näyte. Positiivikontrollin Ct-arvot ovat 21 ja 27,5.



Kuva 8. Noroviruksen GII-tyyppin RT-PCR-ajo, jossa mukana oli positiivikontrolli laimennokset 10^{-1} ja 10^{-3} .

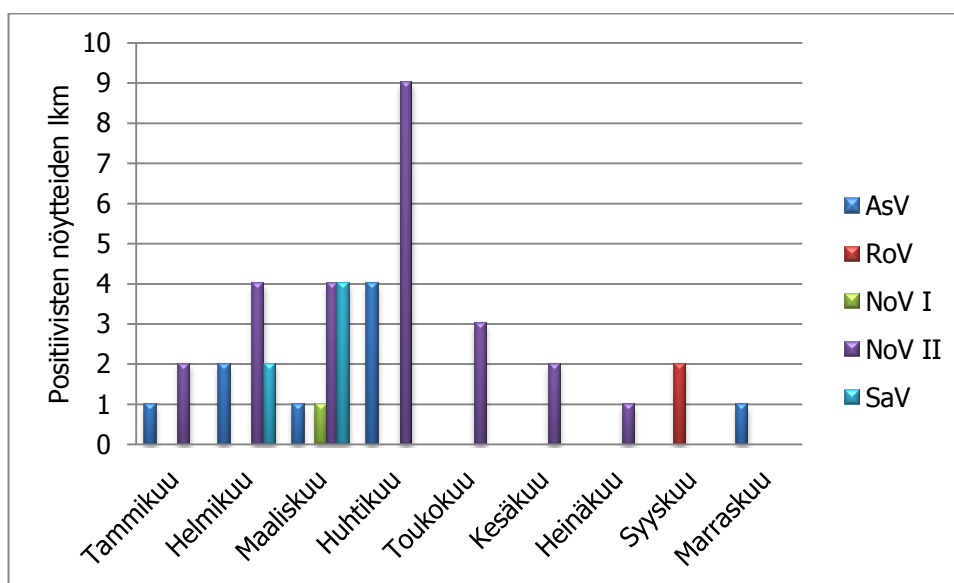
7 Tulosten esitys ja pohdinta

Opinnäytetyön yhteydessä suoritetussa tutkimuksessa selvitettiin varhaislapsuudessa esiintyviä suolistoviruksien esiintyvyyttä. Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 103 lasta, joilta saatiin yhteensä 388 näytettä. Saaduista näytteistä positiivisia oli yhteensä 43. Tutkimuksessa mukana olleiden lasten iät vaihtelivat 4 kuukauden ja 7,5 vuoden välillä. Taulukosta 4 näkee, että infektiot keskittyivät alle kaksivuotiaisiin lapsiin. Rotaviruksen aiheuttamat infektiot esiintyivät noin puolen vuoden ikäisillä lapsilla.

Taulukko 4. Tutkimuksessa havaittujen positiivisten näytteiden lukumäärä sekä sairastuneiden lasten keski-ikä

	Astrovi- rus	Rotavi- rus	Norovi- rus GI	Norovi- rus GII	Sapovi- rus
Sairastuneiden keski-ikä	1,95	0,51	1,99	1,92	1,78
Sairastuneiden lukumäärä 388 näytteestä	9	2	1	25	6
Infektioiden %-osuus	2,32	0,52	0,26	6,44	1,55

Tutkimuksessa saadut tulokset nojautuvat vahvasti ennakkotietoihin. Rotaviruksen määrästä huomaa viruksen aiheuttamien infektioiden harvinaisuuden. Vuonna 2009 rokotusohjelmaan otetun rotavirusrokotteen teho näkyy selkeästi tuloksissa. Syyskuussa ilmenneet rotavirusinfektiot ovat epänormaaleja taudin vuosisykliin verrattuna, sillä lokakuun aikoihin rotavirusinfektiot ovat harvinaisimmillaan. (Kuva 9.) Tässä tapauksessa joko lapset ovat jääneet ilman rokotusta jostakin syystä tai lapsi on saanut infektion annetusta rokotteesta.

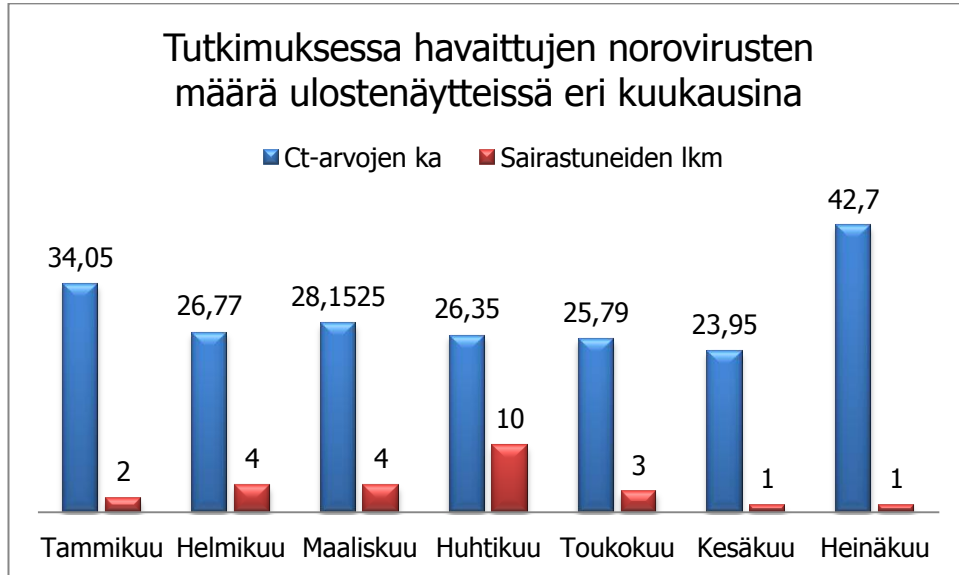


Kuva 9. Virusten esiintyminen kuukausittain

Norovirus

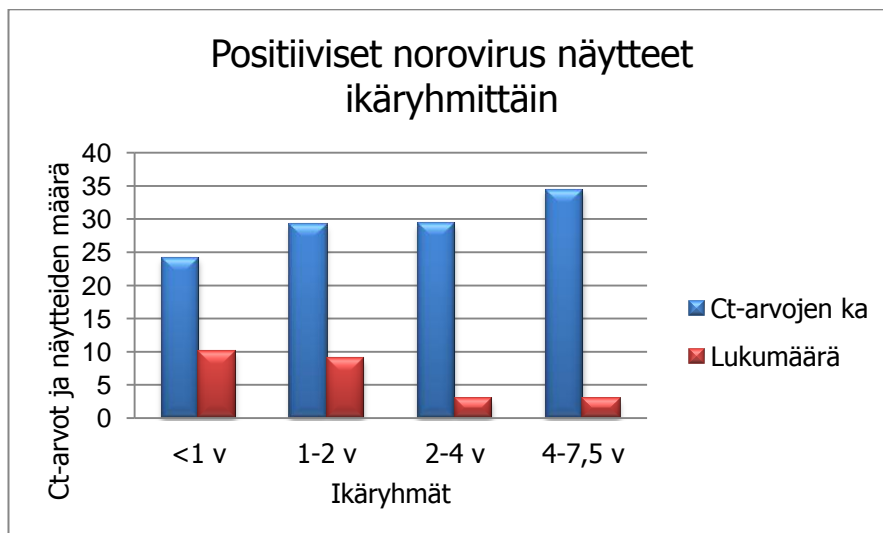
Noroviruksen genotyyppin II esiintyvyys oli yleisintä. Nov GII -viruksen aiheuttamia infektiota esiintyi tammi-heinäkuun välisenä aikana. Noroviruksen 2. genotyyppiä esiintyi yhteensä 25 lapsella. Tulosten perusteella huomataan, että viruksen määrä näytteessä sekä sairastuneiden määrä laskee infektiokauden loppua kohti. Kuvaajassa esitetyt Ct-arvot kuvaavat RT-PCR:n sitä sykliä, jossa näytteen fluoresenssi ylittää asetetun kynnyksen. Mitä suurempi Ct-arvo oli, sitä vähemmän näytteessä esiintyy virusta. Norovirusinfektiokauden huippu asettui huhtikuulle, jolloin sairastuneita oli yhteensä 10 ja näiden näytteiden viruspitoisuus oli suurta, Ct-arvojen keskiarvo oli 26,35. Touko- ja kesäkuussa saatujen näytteiden viruspitoisuudet olivat korkeampia kuin huhtikuussa, mutta näytteiden määrä oli jo selkeästi pienempiä. Touko-heinäkuun näytteiden virus-

määrään vaikuttaa mahdollisesti lomakausi, jolloin näytettä ei välttämättä ole otettu heti oireiden alettua, vaan on voinut kulua aikaa, ennen kuin näyte on saatu otettua. (Kuva 10)



Kuva 10. Norovirus GII:n Ct-arvojen suhde sairastuneiden lukumäärään (katso liite 3.)

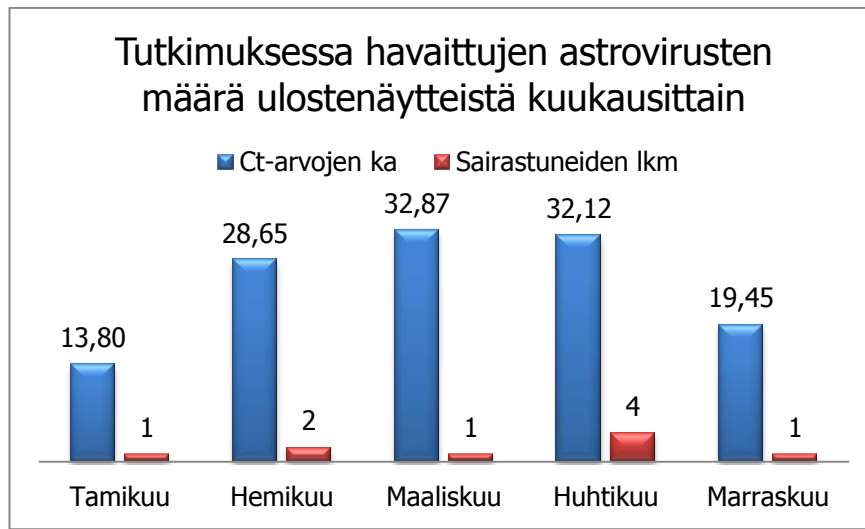
Norovirusinfektiota havaittiin eniten alle 2 vuotiailla lapsilla. Tutkituista näytteistä norovirus GII-serotyyppiä löytyi 10 alle vuoden ikäiseltä lapselta ja yhdeksän 1–2-vuotialta. Kahden ikävuoden jälkeen infektiot alkoivat selkeästi laskea. (Kuva 11.)



Kuva 11. Nov GII -infektioiden suhde lapsen ikään

Astrovirus

Astrovirusta esiintyi yhdeksällä lapsella. Tutkituista näytteistä löytyi yhteensä yhdeksän positiivista. Vahvimmat positiiviset näytteet olivat tammi- ja marraskuussa. (Kuva 12.) Vaikka saaduissa näytteissä ei lukumäärällisesti esiintynyt virusinfektioita merkittäviä määriä, RT-PCR:stä saadut Ct-arvot kertovat infektiokauden olevan kevättalvella. Sillä mitä pienempi Ct-arvo on, sitä suurempi on näytteessä ollut virusmäärä.



Kuva 12. Astroviruksen Ct-arvojen suhde sairastuneiden lukumäärään. (Liite 3)

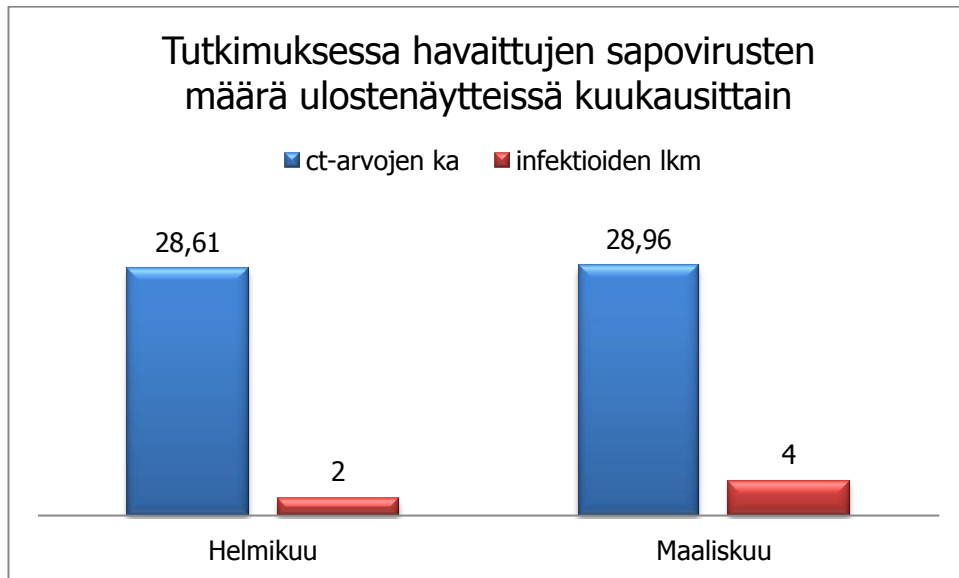
Ikäjakaumaa astroviruksen aiheuttamissa infektioiden ei pystytty osoittamaan. Kaikki viruksen aiheuttamat infektiot ilmenivät alle viiden vuoden iässä. Taulukosta 5 näkee astrovirusinfektioiden jakautuneen tasaisesti alle viisivuotiaille.

Taulukko 5. Astrovirusten esiintyminen ikäluokittain.

	<1 v	1-2 v	2-5 v
Ct-arvojen ka	32,26	25,50	28,46
Lukumäärä	2	4	3

Sapovirus

Sapovirusta esiintyi kuudella lapsella. Viruksen aiheuttamaa infektiota esiintyy kevättalvella. Sapovirusta tavataan nykyään harvemmin, mikä nähtiin myös tässä tutkimuksessa. Sapoviruksen aiheuttamia infektiota oli 13,95 % kaikista positiivisista näytteistä ja 1,55 % kaikista näytteistä. (Kuva 13.)



Kuva 13. Sapovirusten Ct-arvojen suhde sairastuneiden lukumäärään.

Tulosten verrattavuus muihin tehtyihin tutkimuksiin on hyvin heikko, sillä tässä tutkimuksessa saatujen näytteiden määrä oli pieni. Nämä tulokset antavat kuitenkin suuntaa varhaislapsuudessa esiintyvistä virusinfektioista sekä niiden infektiokausista. Selvää epidemiaa ei havaittu tutkittavien näytteiden perusteella.

8 Yhteenveto

Tutkittuja näytteitä oli yhteensä 388 ja positiivisia näytteitä oli 43. Virusten aiheuttamat infektiot keskittyivät selkeästi kevääseen. Noroviruksen GI- ja GII-tyyppiä esiintyi selkeästi eniten, sillä positiivisia näytteitä oli 26. Norovirusinfektiot ajoittuivat tammi-heinäkuulle. Astrovirusta esiintyi yhdeksässä näytteessä tammi-helmikuun aikana. Sapovirusta esiintyi kuudessa näytteessä, ja nämä infektiot olivat helmi-maaliskuussa. Vähiten esiintyi rotavirusta, ainoastaan kahdessa näytteessä, ja nämä olivat syyskuussa. Tutkimuksesta saatujen tulosten perusteella voidaan todeta kevään olevan infektiotaikaa suomalaisille.

Positiivisten näytteiden löytämiseen saattoi vaikuttaa treshold-arvon asetukseen sovittu sääntö, jonka mukaan treshold asetettiin pisteeseen, joka oli positiivisen kontrollilaimennuksen 1:3 dRn-arvosta 10 %. Tällä haluttiin varmistaa, että kaikki positiiviset näytteet olivat varmasti positiivisia. Samalla saattoivat jäädä huomioimatta näytteet, joissa virusmäärä oli erittäin alhainen.

Tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella ei pystytä yleistämään varhaislapsuudessa esiintyvien suolistovirusinfektioiden määrää, koska tutkimuksessa mukana olleet lapset oli rajattu geneettisen perimän mukaan. Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan selvitetty, onko lapsen sairastumisella suolistoviruksen aiheuttamaan infektiin ja ensimmäisen tyypin diabeteksen geneettisellä riskillä mitään yhteyttä. Tutkimuksen hyötynä oli suolistovirusten aiheuttamien infektioiden esiintymisen selvittäminen geneettisen riskin omaavilla lapsilla. Jos tutkimusta olisi jatkanut useamman vuoden, olisi voinut löytyä enemmän varmuutta infektioiden ja diabeteksen välisille yhteyksille.

Lähteet

1. Carl-Henrik von Bonsdorff, Timo Vesikari, Leena Maunula. 2010. Gastroenteriit-
tia aiheuttavat virukset. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, Duo-
decim. s. 591-603
2. Merja Roivainen, Leena Maunula, Markku Kuusi. 2009., Norovirusepidemiat ovat
haaste terveydenhoitojärjestelmälle. Suomen Lääkärilehti. 64(14):1343–1345
3. Tea Niemelä, Jussi Mertsola. Lasten infektiosairaudet. Verkkodokumentti;
http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Lasten_infektiosairauksia#Rotavirus;
Luettu 26.6.2011
4. Gastroenteriittiä aiheuttavat kalikivirukset. 2006. Verkkodokumentti.
<http://www.virology.utu.fi/teaching/opetusmater/calici.patog.html>.
Luettu 13.6.2011
5. Jonna Prekiömäki, Hanne Koivunen, Pirkko Tuominen. Kirjallisuuskatsaus virus-
riskeistä elintarviketeollisuudessa. Evira. http://www.evira.fi/files/attachments/fi/riskinarviointi/20110406_virusraporttiluonnos.pdf. s. 6-9 Luettu 22.6.2011
6. Jukka Lumio. Norovirus. Verkkodokumentti; 2010
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00738;
Luettu 22.6.2011
7. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P. 2006. Rotavirusrokotteiden
tutkimustulokset, The New England Journal of Medicine, ym. Safety and effica-
cy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine;
354(1):23-33
8. THL. Rotavirus. Verkkodokumentti. [http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-
fi/rotavirus](http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/rotavirus). Luettu 20.3.2012
9. THL. Infektiaudit. http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiaudit-fi/norovirus. Luet-
tu 21.3.2012
10. Vesikari T. Rotavirus vaccination. Tampereen Rokotetutkimuslaitos,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882248>
Luettu 10.12.2012

11. David M. Kinpe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb, Marcom A. Martin, Bernard Roizman, Stephen E. Straus. 2001. Fields Virology. osa 1, 4.painos
12. David M. Kinpe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb, Marcom A. Martin, Bernard Roizman, Stephen E. Straus. 2001. Fields Virology, 2.osa, 4.painos
13. Juana Angel, Manual A. Franco, Harry B. Greenberg. 2007. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations, Nature Reviews Microbiology 5. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1692_F1.html
Luettu 9.2.2012
14. Carl-Henrik von Bonsdorff, Timo Vesikari, Leena Maunula. 2010. Rotavirukset, Mikrobiologia. Duodecim
15. Hedman C., Heikkinen T., Huovinen P., Vaara M. Kalikivirukset, Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet; Duodecim. s. 598.
16. Janne Suvisaari. Norovirus. nukleinihappo. HUS lab. http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4940&terms=sapoviru
luettu 9.2.2013
17. Family – Astroviridea, Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012, s. 953 -959
18. Carl-Henrik von Bonsdorff, Leena Maunula. 2003 Norovirukset - hygienian haaste?; Lääkärilehti, 25 - 26 vsk 58, s. 2855 - 2859
19. Zheng D-P, Ando T, Fankhauer RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 2006. 346:312-23
20. Yan H, Yangy F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. 2003. Detektion of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal sample using reverse transcription single-round multiplex PCR. Journal of Virological Methods. 114. s. 37-44
21. Martin C.W. Chan, Joseph J.Y. Sung, Rebecca K.Y. Lam, Paul K.S. Chan, Raymond W.M. Lai, Waik K.Leung. 2006. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. Journal of Virological Methods. 134. s. 146-153
22. Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tadahito Kanda, Hironori Sato. 2012. Structural Basis for Specific Recognition of Substrates by Sapovirus Protease. Frontiers in Microbiology. 3. s. 312

23. Tomoichiro Oka, Mami Yamamoto, Kazuhiko Katayama, Grant S. Hansman, Satoko Ogawa, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. 2005. Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *Journal of General Virology*
24. Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Grant S. Hansman, Tsutomu Kageyama, Satoko Ogawa, Fang-Tzy Wu, Peter A. White, and Naokazu Takeda. 2006. Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; *Journal of Medical Virology*. 78. s. 1347–1353
25. K. Y. Green, T. Ando, M. S. Balayan, T. Berke, I. N. Clarke, M. K. Estes, D. O. Matson, S. Nakata, J. D. Neill, M. J. Studdert and H-J. Thiel. 2000. Taxonomy of the Caliciviruses, *The Journal of Infectious Diseases*. 181. s.322-S330
26. Paolo De Benedictis, Stacey Schultz-Cherry, Andrew Burham, Giovanni Cattoli. 2011. Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution*. 11. osa. s.1529–1544
27. Ohje on modifioitu TATO/TAVI/työohje/INDIS- ULOSTEKÄSITTELY. 15.5.2011
28. Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus; *Solunetti*; 2006
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2
29. Työohje on modifioitu THL/TATO/TAVI/Menetelmäohje/ENVI-MO.xxx/ Astrovirusten real-time RT-PCR. 15.5.2011
30. Menetelmä perustuu tieteelliseen julkaisuun (Gutiérrez-Auguirre, I., Steuer, A., Boben, J., Gruben, K., Poljsak-Prijatelj, M., & Ravnikar, M. 2008. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single RT-qPCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(8). s. 2547 – 2554.
31. Työohje on modifioitu THL/TATO/TAVI/Menetelmäohje/ENVI-MO.27/ Rotavirusten real-time RT-PCR. 15.5.2011
32. Virustenlisääntyminen. *Solunetti*. 2006.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virusten_lisaantyminen_1/
luettu 7.3.2013
33. Rohayem J, Bergmann M, Gebhardt J, Gould E, Tucker P, Mattevi A, Unge T, Hilgenfeld R, Neyts J. 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections, *Antiviral research*. s. 164
34. E.Z.N.A Total RNA Kit 1; Manual Revision; Omega Bio-tek, 2009
35. L. Barclay, M. Wikswo, MPH, N. Gregorius, MSPH, J.Vinje, PhD, B. Lopman, PhD, U. Patashar, MBBS, A. Hali, DVM, Div of Viral Diseases. 2012 National Cen-

ter For Ommunization and Respiratory Diseases; Eyal Leshem, MD, EIS officer,
CDC; Emergence of New Norovirus Strain GII.4 Sydney – United States

9 Liitteet

9.1 Positiiviset näytteet taulukoituna

Näytteenot-topvm	Näytteenot-toikä (y)	AsV	RoV	NoV I	NoV II	SaV
25.1.2010	7,49	-	-	-	+	-
17.2.2010	2,62	-	-	-	-	+
23.2.2010	0,59	+	-	-	-	-
24.2.2010	0,91	-	-	-	+	-
24.2.2010	0,57	-	-	-	+	-
2.3.2010	2,65	-	-	-	+	+
2.3.2010	1,40	-	-	-	+	-
15.3.2010	0,76	-	-	-	-	+
22.3.2010	0,57	-	-	-	+	-
25.3.2010	1,56	-	-	-	-	+
5.4.2010	5,22	-	-	-	+	-
10.4.2010	3,15	-	-	-	+	-
16.4.2010	1,82	-	-	-	+	-
19.4.2010	0,65	-	-	-	+	-
19.4.2010	0,37	+	-	-	-	-
27.4.2010	0,88	-	-	-	+	-
29.4.2010	1,09	-	-	-	-	-
16.5.2010	0,44	-	-	-	+	-
18.5.2010	0,94	-	-	-	+	-
7.6.2010	1,19	-	-	-	+	-
20.7.2010	1,31	-	-	-	+	-
8.9.2010	0,45	-	+	-	-	-
23.9.2010	0,56	-	+	-	-	-
30.11.2010	1,38	+	-	-	-	-
3.1.2011	1,94	+	-	-	-	-
19.1.2011	1,98	-	-	-	+	-
9.2.2011	0,58	-	-	-	+	-
12.2.2011	6,93	-	-	-	+	-
23.2.2011	1,71	+	-	-	-	-
6.3.2011	1,33	-	-	-	-	+
20.3.2011	0,98	-	-	-	+	-
22.3.2011	1,99	-	-	+	-	-
28.3.2011	2,17	+	-	-	-	-
7.4.2011	1,42	-	-	-	+	-
7.4.2011	1,22	-	-	-	+	-
14.4.2011	3,84	+	-	-	-	-
15.4.2011	1,35	-	-	-	+	-

16.4.2011	4,18	+	-	-	-	-
18.4.2011	1,35	+	-	-	-	-
26.4.2011	0,94	-	-	-	+	-
16.5.2011	1,93	-	-	-	-	-
30.5.2011	2,18	-	-	-	+	-
4.6.2011	1,14	-	-	-	+	-

9.2 Infektioiden lukumäärä kuukausittain

	astrovirus	rotavirus	norovirus GI	norovirus GII	sapovirus
Tammikuu	1	0	0	2	0
Helmikuu	2	0	0	4	2
Maaliskuu	1	0	1	4	4
Huhtikuu	4	0	0	9	0
Toukokuu	0	0	0	3	0
Kesäkuu	0	0	0	2	0
Heinäkuu	0	0	0	1	0
Syyskuu	0	2	0	0	0
Lokakuu	1	0	0	0	0
yht	9	2	1	25	6
%-osuus	20,93	4,65	2,33	58,14	13,95

9.3 Norovirus GII:sen Ct-arvot ja infektioiden lukumäärä

	Tammikuu	Helmikuu	Maaliskuu	Huhtikuu	Toukokuu	Kesäkuu	Heinäkuu
Ct-arvojen ka	34,05	26,77	28,1525	26,35	25,79	23,95	42,7
Sairastuneiden lkm	2	4	4	10	3	1	1

9.4 Astrovirusen Ct-arvot ja infektioiden lukumäärä

	Tamikuu	Hemikuu	Maaliskuu	Huhtikuu	Marraskuu
Ct-arvojen ka	13,80	28,65	32,87	32,12	19,45
Sairastuneiden lkm	1	2	1	4	1

9.5 Tutkimustyön menetelmä kaavio

