

Marita Koivunen ja Aina-Liina Partanen

Parecho- ja enterovirusten osoittaminen reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä sekä parecho- ja enteroviruspositiivisten näytteiden virustyyppien tunnistus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

27.01.2015

Tekijä(t) Otsikko	Marita Koivunen, Aina-Liina Partanen Parecho- ja enterovirusten osoittaminen reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä sekä parecho- ja enteroviruspositiivisten näytteiden virustyyppien tunnistus
Sivumäärä Aika	50 sivua + 9 liitettä
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Dosentti, FT Anne Jääskeläinen FT Teemu Smura Lehtori Irma Niittymäki
<p><i>Parecho- ja enterovirus-</i>suvut kuuluvat <i>Picornaviridae</i>-heimoon. Pikornavirukset ovat yksinkertaisia ja vaipattomia RNA-virusia. Suurin osa parecho- ja enterovirusinfektioista ovat oireettomia. Ne voivat aiheuttaa kuitenkin akuutteja ja vakavia infektioita, etenkin lapsilla. Parechoviruksen aiheuttamat lasten keskushermostoinfektiot jäävät usein tunnistamatta ja diagnosoimatta. Parechovirusinfektiota ei voida erottaa enterovirusinfektiosta pelkästään kliinisten oireiden perusteella. Infektioihin ei ole lääkehoitoa, joten hoito on tällä hetkellä oireenmukaista. Enterovirusten lisäksi parechoviruksen rutiininomainen tutkiminen on välttämätöntä, koska parechovirusten nopea tunnistaminen PCR-menetelmin voi vähentää muun muassa potilaan antibioottilääkityksen määrää. Tunnistamalla taudinaiheuttaja voidaan ennakoida sekä taudin oireet että eteneminen helpommin. Uusien viruslääkkeiden kehittäminen parecho- ja enterovirusia vastaan on tärkeää.</p> <p>Toteutimme opinnäytetyön Helsingin yliopiston virologian osastolla. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää parechoviruksen olemassaolo reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä aiemmin enterovirusnegatiivisiksi todetuista näytteistä (n=90). Näytteistä varmensimme myös enterovirusnegatiivisuuden. Aiemmin parecho- ja enteroviruspositiivisiksi todetuista näytteistä tarkoituksemme oli selvittää virustyyppit (n=24). Suoritimme tämän monistamalla viruskantojen tyypitykseen käytettävän genomialueen nested-RT-PCR:llä. PCR-tuotteet sekvensoitiin toisaalla ja sekvenssitulosten perusteella tyypitimme virukset.</p> <p>Otoksessamme (n=90) ei esiintynyt parechovirusta. Saimme tyypitettyä lähes kaikki tutkimamme (n=24) virukset, joten tulosta voidaan pitää hyvänä. Löytämämme virustyyppit kuuluivat <i>human parechovirus-</i>, <i>enterovirus A-</i> ja <i>B-</i>lajeihin. Opinnäytetyön tuloksilla voidaan</p>	

osoittaa, että virusten tyypittäminen on tärkeää. On välttämätöntä, että jatkossa parechovirustutkimuksia jatketaan ja tietoa niistä syvennetään.

Avainsanat

Parechovirus, Enterovirus, Reaaliaikainen-RT-PCR, nested-RT-PCR, virustyyppitys

Authors Title Number of Pages Date	Marita Koivunen, Aina-Liina Partanen Detecting Parecho and Enteroviruses by the Real-Time RT-PCR Method and Typing the Viruses in Parecho and Enterovirus Positive Samples 50 pages + 9 appendices 27 January 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Anne Jääskeläinen, Docent, PhD Teemu Smura, PhD Irma Niittymäki, Senior Lecturer

Parecho and *enteroviruses* are viral genera of the family *Picornaviridae*. Picornaviruses are simple non-enveloped RNA viruses. Most infections caused by parecho and enterovirus are asymptomatic. However, these viruses can cause acute and serious infections, especially in children. Infections of the central nervous system in children caused by parechovirus often remain unidentified and undiagnosed. It is not possible to distinguish between infections caused by parechoviruses and enteroviruses by clinical signs alone. As there is no known medical treatment for these infections the patients are currently only given supportive care. In addition to enteroviruses, it is necessary to detect parechovirus routinely, because their rapid detection by RT-PCR can reduce the unnecessary use of antibiotics. By correct identification of the pathogen it is possible to more easily anticipate the symptoms and progression of the disease. It is highly important to develop antiviral drugs against parecho and enteroviruses.

The research for our final project was carried out at the Department of Virology of the University of Helsinki. The purpose of our final project was to detect and analyse parechovirus in CSF and serum samples (n=90) by real-time RT-PCR. Previously, the samples were detected enterovirus negative. We also certified the negative results for these earlier tests. An additional purpose was to identify the types of viruses in the samples (n=24) earlier detected parecho and enteroviruspositive. We accomplished this by copying the genomic region used to type the virus strains using nested RT-PCR. The samples were sequenced elsewhere and we typed the viruses by analysing the sequence.

The results showed there were no parechoviruses in the samples (n=90). Since nearly all the viruses (n=24) were typed, the study can be considered a success. The viruses found belonged to the species *Human parechovirus*, *Enterovirus A* and *Enterovirus B*. The results of our final project indicate the importance of typing the viruses. More research on the parechoviruses is needed to deepen and spread the knowledge of them.

Keywords

parechovirus, enterovirus, real-time RT-PCR, nested RT-PCR, virus typing

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Parecho- ja enterovirukset	3
2.1	Virusten rakenne	4
2.2	Virusten genomi ja sen ilmentäminen	5
2.3	Virusten lisääntymiskierto	7
2.4	Virusten esiintyvyys aiemmissa tutkimuksissa	9
3	Parecho- ja enterovirusinfektiot	11
3.1	Hengitystieinfektiot	12
3.2	Ihoinfektiot	13
3.3	Lasten vakavat infektiot	13
3.4	Muita enterovirus sairauksia	15
3.5	Laboratoriotutkimusmenetelmiä	15
3.6	Infektiopotilaan hoito	17
4	Työssä käytetyt laboratoriomenetelmät	19
4.1	RNA-eristys	19
4.2	RT-PCR	21
4.2.1	Reaaliaikainen RT-PCR	22
4.2.2	PCR-työskentely	23
4.2.3	Nested-RT-PCR	24
4.2.4	Agaroosigeelielektroforeesi	24
4.3	Sekvensointi	26
4.4	Tietokantahaku	27
5	Työn tavoitteet ja tarkoitus	27
6	Työn suoritus	29
6.1	Näytteiden esikäsittely	29
6.2	RNA-eristys	31
6.3	Reaaliaikainen RT-PCR	32
6.4	Sekvensointia varten valmistettavat PCR-tuotteet	32
6.4.1	Nested-RT-PCR	33
6.4.2	Agaroosigeelielektroforeesi	34
6.5	Virustyyppitys	35

7	Tulokset	35
7.1	Parecho- ja enterovirusten osoittaminen sekä löydösten tyyppitys	35
7.2	Aiemmin parecho- ja enteroviruspositiiviksi todettujen näytteiden tyyppitys	36
8	Luotettavuuden arviointi	39
9	Pohdinta	40
	Lähteet	45

Liitteet

Liite 1. Reaaliaikainen RT-PCR, HPeV- ja EV-multiplex: reaktioseoksen ohje

Liite 2. Reaaliaikainen RT-PCR, HPeV- ja EV-multiplex: ohjelma

Liite 3. Reaaliaikainen RT-PCR, tulokset

Liite 4. Nested-RT-PCR 1. kierros HPeV ja EV: reaktioseosten ohje

Liite 5. Nested-RT-PCR 1. kierros HPeV ja EV: ohjelma

Liite 6. Nested-RT-PCR 2. kierros HPeV ja EV: reaktioseosten ohje

Liite 7. Nested-RT-PCR 2. kierros HPeV ja EV: ohjelma

Liite 8. AGE-kuva – parechovirus

Liite 9. AGE-kuva – enterovirus

1 Johdanto

Parecho- ja *enterovirus*-suvut kuuluvat *Picornaviridae*-heimoon (Knowles ym. 2012: 855; Adams – King – Carstens 2013: 2029–2030). Parechoviruslajeja on kaksi, *Human parechovirus* ja *Ljungan virus* (Picornastudygroup 2014a). HPeV-lajiin kuuluu 16 eri tyyppiä (Picornastudygroup 2014b). Enterovirusia on sen sijaan tunnistettu huomattavasti enemmän, pelkästään enteroviruslajeja on 12 (Pikornaviridae.com 2014b). Pikornavirukset ovat pieniä, yksinkertaisia ja vaipattomia viruksia. Niiden ikosahedraalinen proteiini-kuori suojaa genomia, joka on yksijuosteinen positiivissäikeinen RNA-molekyyli. (Racaniello 2001: 686–687; 690.)

Suurin osa parecho- ja enterovirusinfektioista ovat oireettomia (Pallansch – Roos 2001: 746; Harvala – Simmonds 2009: 5). Näiden virusten aiheuttamia infektiota sairastetaan yleisimmin lapsuusiässä (Pallansch – Roos 2001: 739; Harvala – Simmonds 2009: 5). Parecho- ja enterovirukset aiheuttavat muun muassa hengitystie- ja ruoansulatuskanavan infektiota (Pallansch – Roos 2001: 755; Wolthers ym. 2008: 360). Virukset aiheuttavat pienillä lapsilla, etenkin vastasyntyneillä, myös vakavia sairauksia, kuten yleisinfektioita, aivokalvontulehduksia ja aivotulehduksia (Harvala – Simmonds 2009: 6; Wolthers ym. 2008: 360; Pallansch – Roos 2001: 751).

Parechoviruksen aiheuttamat lapsien keskushermostoinfektiot jäävät usein tunnistamatta ja diagnosoimatta. Parechoviruksen aiheuttamia infektiota ei voida erottaa enteroviruksen aiheuttamasta infektiosta pelkästään kliinisten oireiden perusteella. (Verboon-Macielek ym. 2008a: 245.) Parecho- ja enterovirusten määrittämiseen käytetään halutun RNA-jakson monistamista RT-PCR-menetelmällä. Virustyyppi saadaan selville vertaamalla monistustuotteiden emäsjärjestyksiä. (Vainionpää – Hedman – Hyypiä 2000: 21–22.) Parecho- ja enterovirusinfektioihin ei ole tällä hetkellä läikehoitoa, joten hoito on oireenmukaista (Luoto ym. 2014: 2074). Enterovirusten lisäksi parechoviruksen tutkiminen on välttämätöntä, joten rutiinidiagnostiikka kuuluisi olla sen mukainen (Jääskeläinen ym. 2013: 330). Parechovirusten nopea tunnistaminen PCR-menetelmin voisi vähentää muun muassa potilaan antibioottilääkityksen määrää (Wolthers ym. 2008: 358). Uusien viruslääkkeiden kehittäminen parecho- ja enterovirusia vastaan on tärkeää (Jääskeläinen ym. 2013: 330).

Opinnäytetyön ensisijaisena tavoitteena oli tuottaa tietoa parechoviruksen esiintymisestä alle neljävuotiailla lapsilla. Lisäksi tavoitteena oli tuottaa tietoa Xpert® EV-testin luotettavuudesta. Kolmantena tavoitteena oli tuottaa tietoa, mitä parecho- ja enterovirustyyppejä on esiintynyt vuosien 2013 ja 2014 aikana. Tulosten perusteella voidaan saada aikaan parempi ymmärrys parechoviruksesta lasten keskushermostoinfektioiden taudinaiheuttajana sekä saada tarkempi tieto lasten sairastamien virusinfektioiden virustyypeistä.

Opinnäytetyömme tarkoitus oli selvittää löytyykö seerumi- ja selkäydinnestenäytteistä parechovirusta (n=90). Seerumi- ja selkäydinnestenäytteet oli kerätty vuosien 2013 ja 2014 aikana alle neljävuotiailta lapsilta ja ne oli todettu HUSLABissa enterovirusnegatiiviksi Cepheid'in Xpert® EV-testin avulla. Tarkoituksemme oli myös varmistaa Xpert® EV-testin luotettavuutta selvittämällä löytyykö näistä enterovirusnegatiivisista näytteistä enterovirusta. Tämän lisäksi aiemmin parecho- ja enteroviruspositiiviksi todetuista (n=24) ja kaikenikäisiltä otetuista näytteistä tarkoituksemme oli selvittää virustyyppit.

Suoritimme työn eristämällä ribonukleinihapot potilasnäytteistä sekä määrittämällä reaaliaikaisella RT-PCR:llä parecho- ja enterovirusten olemassaolo. Parecho- ja enteroviruspositiivisista näytteistä monistimme viruskantojen tyyppitykseen käytettävän genomi-alueen nested-RT-PCR:llä. Tästä saamamme tuotteet lähetimme sekvensoitavaksi ja saatujen sekvenssitulosten perusteella virustyyppi määritettiin genomipankkien avulla.

Teimme opinnäytetyön Helsingin yliopiston Haartman Instituutin virologian osastolla, jossa opinnäytetyötämme ohjasivat dosentti, FT Anne Jääskeläinen ja FT Teemu Smura. Ohjaavana opettajana toimi Irma Niittymäki.

2 Parecho- ja enterovirukset

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) mukaan virukset luokitellaan lahkoihin (-*virales*), heimoihin (-*viridae*), alaheimoihin (-*virinae*), sukuihin (-*virus*) ja lajeihin. Sukulaisuudet on määritelty genomityypin sekä sekvenssin eli emäsjärjestyksen samankaltaisuuden perusteella. (ICTV 2014.) ICTV:n luokittelun mukaan parecho- ja enterovirus-suvut kuuluvat *Picornaviridae*-heimoon, johon kuuluu näiden lisäksi 24 muuta sukua (Knowles ym. 2012: 855; Adams ym. 2013: 2029–2030). *Picornaviridae*-heimo kuuluu *Picornavirales*-lahkoon (Le Gall ym. 2008: 719).

Parechovirus-sukuun kuuluu kaksi lajia; *Human parechovirus* (HPeV) ja *Ljungan virus* (LV). HPeV hyväksyttiin vuonna 1996 ja LV vuonna 2002 kuuluvaksi parechovirusiin. (Picornastudygroup 2014a). HPeV-lajiin kuuluu tällä hetkellä 16 eri tyyppiä, HPeV1–16. (Picornastudygroup 2014b.) Human parechovirus 1 ja 2 (HPeV1 ja HPeV2) ovat alun perin luokiteltu enterovirusiin (echovirus 22 ja 23), jotka tunnistettiin Yhdysvalloissa riipulia sairastavilta pikkulapsilta. (Wigand – Sabin 1961: 224). Myöhemmin todettiin suuri eroavaisuus virusten kuorialueen sekvenssissä, etenkin genomien alueella VP1, joten ne luokiteltiin omaksi suvukseen (Stanway ym. 1994: 8234; Joki-Korpela – Hyypiä 1998: 134). Ljungan virus eristettiin alun perin metsämyyrästä. Lisäksi uusi virus, *Sebokele virus 1*, voisi kuulua suvun kolmanteen lajiin. Hiljattain on kuvattu myös uusi virus nimeltään ferret parechovirus (Pikornaviridae.com 2014a).

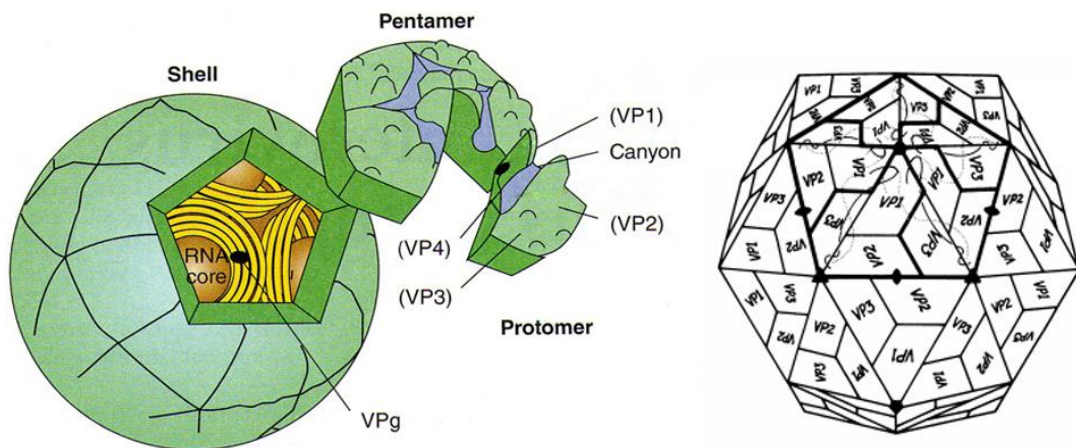
Geneettisen jaottelun perusteella enterovirukset, jotka aiheuttavat ihmiselle infektoita, jaetaan seitsemään lajiin; *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*, *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* ja *Rhinovirus C*. Entisen nimeämisen mukaan nämä enterovirukset olivat *Human enterovirus A–D* ja *Human rhinovirus A–C*. Lisäksi on viisi muita eläimiä infektoivaa enteroviruslajia; *Enterovirus E–H* ja *J* (Nimeä enterovirus I ei käytetä, koska se sekottuisi numeroon 1). *Enterovirus A*-laji käsittää 25 (sero)tyyppiä, *Enterovirus B* 61, *Enterovirus C* 23 (sero)tyyppiä, *Enterovirus D* viisi (sero)tyyppiä, *Enterovirus E* neljä tyyppiä, *Enterovirus F* kuusi tyyppiä, *Enterovirus H* yhden serotyypin, *Enterovirus J* kuusi tyyppiä sekä *Rhinovirus A* 80 serotyyppeä, *Rhinovirus B* 32 tyyppiä ja *Rhinovirus C* 54 tyyppiä (Pikornaviridae.com 2014b).

Serotyypit ovat virustyyppejä, jotka ovat antigeenirakenteeltaan samankaltaisia. Serotyypit selvitetään virusspesifisillä vasta-aineilla. Tiettyä virusserotyyppiä vastaan kehitty-

neet vasta-aineet suojaavat saman serotyypin infektiolta, mutta eivät eri serotyypin infektiolta. Tietyt serotyypit voidaan jakaa edelleen genotyypeiksi. Ihmisille tautia aiheuttavista pikornaviruksista, hepato- perecho- ja kobuviruksista, tunnetaan vain muutamia tyyppisiä, kun taas enterovirustyyppisiä noin sata. Nykyään tunnistus ja luokitus tehdään usein vasta-aineisiin perustuvan serotyypityksen sijasta sekvensoimalla VP1-kuoriproteiinia koodaava geeni. Tällöin puhutaan serotyyppien sijasta tyypeistä. (Hyypiä – Roivainen – Ruuskanen 2010: 514.)

2.1 Virusten rakenne

Parecho- ja enterovirusten, kuten yleensä pikornavirusten, rakenne tunnetaan hyvin. Ne ovat pieniä ja pyöreitä, noin 30 nm halkaisijaltaan olevia yksinkertaisia viruksia. Niiden ikosahedraalisen kapsidi eli proteiinikuori suojaaa genomia (ks. kuvio 1). Viruksella ei ole lipidikalvoa eli vaippaa kuorensa päällä. (Racaniello 2001: 686–687.)



Kuvio 1. Tyypillinen pikornaviruksen rakenne ja kuoren proteiinien järjestäytyminen. Kuoriproteiini VP4 ei näy, koska se sijaitsee kuoren sisäpinnalla (mukaillen: Butel 2013: 528; Arnold 1987: 22).

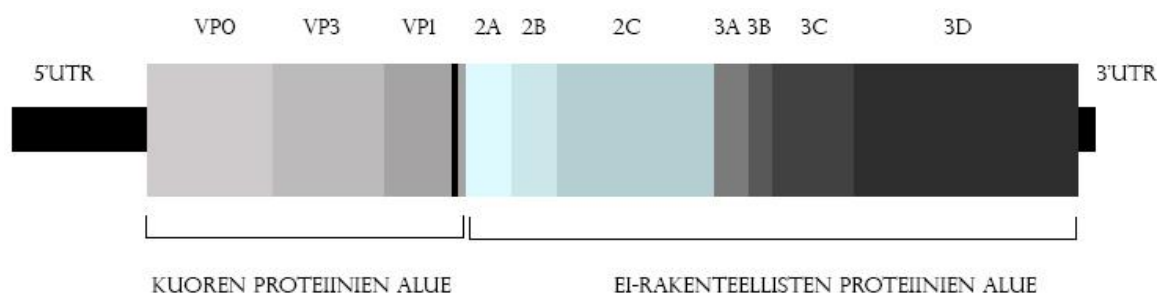
Pikornavirusten kuori muodostuu 60 rakennealaysiköstä eli protomeerista. Protomeerissa on neljä proteiinia, joista VP1, VP2 ja VP3 ovat kuoren ulkopinnan proteiineja ja VP4 sijaitsee kuoren sisäpinnalla. (Racaniello 2001: 687.) Parechoviruksilla kuoriproteiini VP0 ei jakaannu VP2:ksi ja VP4:ksi, joten niillä on kuorensa vain kolme proteiinia

(Stanway ym. 1994: 8236). Koska proteiini ei hajoa, saattaa parechovirusilla olla kuorressaan rakenteellisia eroa muihin pikornaviruksiin nähden (Harvala – Simmonds 2009: 2). Protomeerit muodostavat pentameerin, jonka kohoumakohdassa on painauma eli kanjoni. Kanjonissa on sitoutumispaikka viruksen reseptoreille ja vasta-aineille (ks. kuvio 1). (Racaniello 2001: 689.)

2.2 Virusten genomi ja sen ilmentäminen

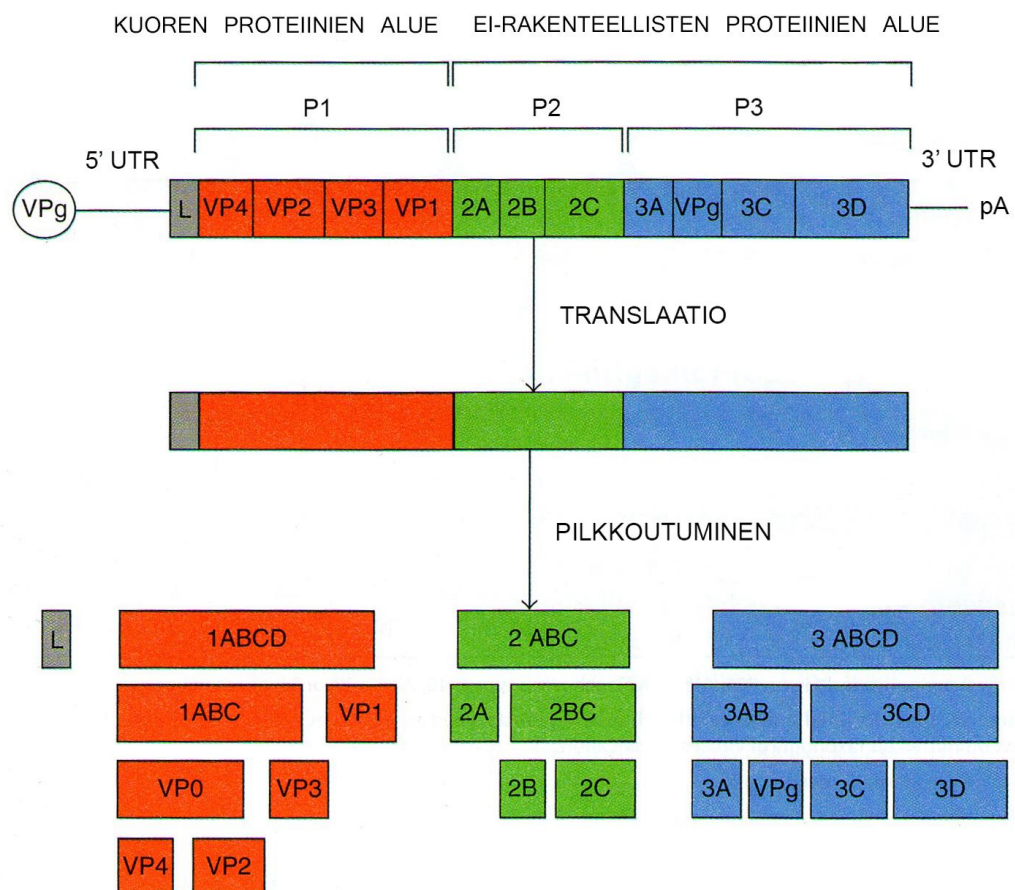
Pikornavirusten, kuten parecho- ja enterovirusten, genomi on yksijuosteinen positiivisäikeinen RNA-molekyyli. Genomi on infektiivinen, koska solussa tapahtuvassa translaatiossa siitä tuotetaan kaikki viruksen replikaatioon tarvittavat virusproteiinit. Enterovirusgenomi on pituudeltaan noin 7200–8500 emäksen pituinen. (Racaniello 2001:690.) Parechoviruksen genomi on samanpituinen, noin 7100–8500 emästä (Stanway – Hyypiä 1999: 5249).

Genomin 5'-päähän on kovalenttisesti sitoutunut pieni proteiini, VPg, joka on pituudeltaan 22–25 aminohapon pituinen. VPg tuotetaan yhdestä virusgeenistä ja toimii alukkeena RNA-synteesissä. Genomi koostuu neljästä erillisestä alueesta (ks. kuvio 2). 5'UTR (untranslated region) eli proteiineja koodaamaton alue on pitkä, 600–1100 emäksen pituinen. Tämä alue ohjaa genomin replikaatiota ja translaatiota. 5'UTR:ssä sijaitseva IRES (internal ribosomal entry site) ohjaa ribosomin sitoutumista kohtaan mistä translaatio voi alkaa. Genomin toisessa päässä on lyhyt, noin 50–125 emästä pitkä, 3'UTR. Tätä aluetta seuraa vielä poly-A-häntä. 5'UTR:n ja 3'UTR:n väliin jää yksijuosteinen avoin lukukehys, josta tuotetaan viruksen proteiinit. (Racaniello 2001: 690; 692.)



Kuvio 2. Human parechovirusgenomin rakenne (mukaiillen: Harvala – Simmonds 2009: 3).

Polyproteiini pilkkoutuu viruksen tuottamien entsyymien avulla 11–12 hajoamistuotteeksi (ks. kuvio 3) (Racaniello 2001: 692). Parechovirusgenomista muodostuu lopulta kymmenen proteiinia (Stanway – Hyypiä 1999: 5249). Hajoaminen tapahtuu translaation aikana, joten polyproteiinia ei voida havaita kokonaisena. Polyproteiini jaetaan kolmeen alueeseen; P1, P2 ja P3. Viruksen kuoriproteiinit tuotetaan P1-alueesta, kun taas P2- ja P3-alueen proteiinit ovat replikaatiota ja proteiinisynteesiä varten. Joillakin proteiinien esiasteilla on omia toimintojaan ennen hajoamista lopulliseksi tuotteeksi. (Racaniello 2001: 692.)



Kuvio 3. Pikornavirusgenomin rakenne ja ilmentäminen. VPg sijaitsee genomin 5'-päässä. L, leader-proteiinia ei ole parecho- tai enteroviruksilla. Positiivissäikeisestä yksijuosteisesta RNA:sta muodostuu yksi polyproteiini, joka pilkkoutuu virusproteiineiksi. 3'-päässä sijaitsee poly-A-häntä. (mukaiillen: Butel 2013: 529).

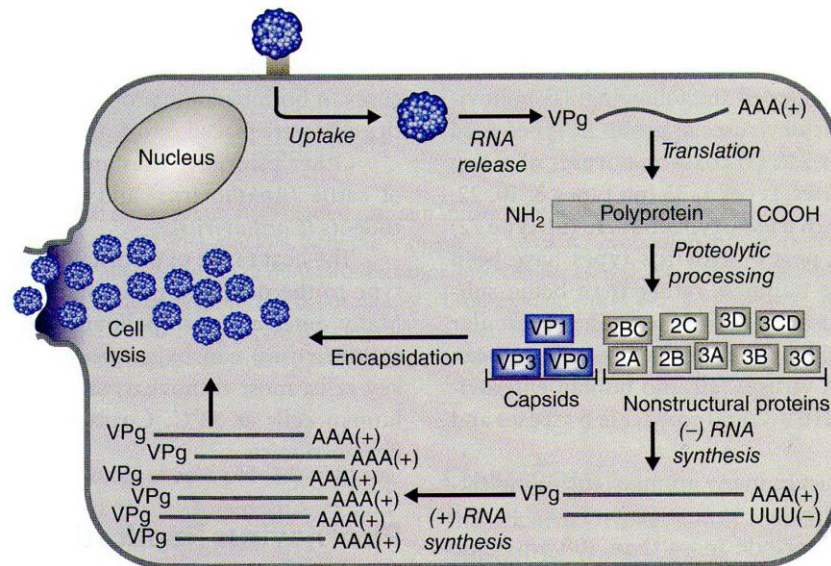
Enteroviruksilla 3C-entsyymi hajottaa polyproteiinin P2- ja P3-alueiden ja 2A-entsyymi P1- ja P2- alueiden välistä. Parechoviruksen 3C-entsyymi pilkkoo P2- ja P3-alueiden lisäksi myös P2-alueella sijaitsevat 2A:n ja 2B:n. Enteroviruksen 2A-proteiinaasi pysyy hajottamaan myös isäntäsolun proteiineja sekä estämään sen lähetti-RNA:n translaatiota. (Racaniello 2001: 703–705.) Parechoviruksen 2A:lla ei ole proteiineja hajottavaa aktiivisuutta (Stanway ym. 1994: 8234). Parechoviruksen 2A-proteiini kiinnittyy virusgenomin 3'-päähen, joten se viittaisi sen rooliin viruksen replikaatiossa (Harvala – Simmonds 2009: 2). 2A ja 3C vapautuvat polyproteiinista itsenäisesti. Polyproteiinin kaskadimainen hajoaminen jatkuu tästä eri pikornaviruksilla eritavoin. (Racaniello 2001: 705.)

Polyproteiinista vapautuu RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi, 3D. Tätä tarvitaan genomien kopioimisessa valmistettaessa RNA-templaatile (+) vastinjuoste (-), josta tuotetaan genomien ja lähetti-RNA:n kopioita. Se on myös templaattispesifinen, jolloin se kopioi vain viruksen RNA:ta, ei solun lähetti-RNA:ta, infektoituneessa solussa. (Racaniello 2001: 692; 706; 710.) 2B-proteiini lisää mahdollisesti solukalvon läpäisevyyttä, jolla voi olla merkitystä virusten vapautumiseen solusta. 3A-proteiinin lisäksi myös 2B osaltaan vastaa viruksen RNA:n replikaatiopaikkojen eli vesikkelien tuottamisesta. Kaksijuosteinen RNA avautuu ennen replikaatiota 2C-proteiinin avulla sen helikaasiaktiivisuuden vuoksi. (Racaniello 2001: 707–708.)

2.3 Virusten lisääntymiskierto

Pikornavirus tunnistaa kohdesolusta virusreseptorin, kiinnittyy siihen ja pääsee näin tunkeutumaan kohdesoluun (ks. kuvio 4). Pikornavirukset voivat käyttää solureseptoreinaan monenlaisia solupinnan molekyylejä. Eri virustyyppit voivat käyttää joko samoja tai vain sitoutua tietynlaisiin reseptoreihin. Jotkut virustyyppit tarvitsevat kiinnittymiseensä lisäksi koreseptorin. (Racaniello 2001: 692.) Pikornavirus voi päästä soluun endosytoosilla, jolloin se vapauttaa RNA:n endosomin kalvon läpi solulimaan. RNA:n vapauttaminen voi tapahtua myös solukalvolla ilman, että viruksen rakenneproteiinit siirtyvät solun sisälle. (Racaniello 2001: 698.) Esimerkiksi HPeV1 tunnistaa solupinnan integriinin ja käyttää mahdollisesti yhtä tai kahta eri solupinnan molekyyliä päästääkseen soluun klatriinivä-

litteistä endosytoosireittiä käyttäen. Tällöin virus proteiinkuorineen on päässyt sisälle soluun ja se vapauttaa genominsa hyvin pian tämän jälkeen. (Joki-Korpela – Marjomäki – Krogerus – Heino – Hyypiä 2001: 1963–1964; 1966.)



Kuvio 4. Pikornaviruksen lisääntymiskierto (Butel 2013: 530).

Pikornavirusten replikaatio tapahtuu solun sytoplasmassa. Solun entsyymien avulla RNA:sta irtoaa VPg-proteiini ja positiivissäikeinen RNA voi toimia suoraan lähetti-RNA:na. Translaatiossa muodostuu suuri polyproteiini, joka hajoaa viruksen omien entsyymien avulla (ks. luku 2.2). Näin virus tuottaa rakenne- että replikaatioproteiineja. Näiden proteiinien joukossa on RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi sekä muut välttämättömät proteiinit, jotta genomien replikoituminen ja lähetti-RNA-synteesi voivat tapahtua. (Racaniello 2001: 692; 700.)

Replikaatiossa positiivissäikeinen RNA kopioidaan RNA-polymeraasin avulla negatiivissäikeiseksi RNA:ksi. Tätä komplementaarista RNA:ta virus käyttää mallina genominsa kopioimiseen. Osa genomien kopioista tarvitaan viruksen rakenneproteiinien tuotannossa sekä replikaatiossa. Osa genomien kopioista käytetään uusien viruspartikkeleiden genomiksi. Kuoren proteiinit muodostavat protomeerin, jotka kerääntyvät pentameeriksi muodostaen provirionin. Genomin kopiot pääsevät provirioniin ja näin kehitty uusi positiivissäikeinen RNA virus. Uudet partikkelit vapautuvat solusta sen

hajotessa. Prosessi kestää 5–10 tuntia riippuen virustyyppistä, lämpötilasta, pH:sta ja isäntäsolusta. (Racaniello 2001: 692.) Parechovirusten replikaatiosykli kestää noin 6–8 tuntia (Joki-Korpela ym. 2001. 1960).

2.4 Virusten esiintyvyys aiemmissä tutkimuksissa

Kerromme tässä luvussa parechovirustutkimuksista kiinnittäen huomiota parechoviruksen esiintyvyyteen erilaisissa tutkimusotoksissa. Luvussa tuomme esille myös tutkimuksia, joissa on selvitetty parecho- ja enterovirustyyppien esiintyvyys. Valitsimme lukuun tutkimuksia, jotka ovat samankaltaisia meidän työmme kanssa. Nämä tutkimukset on tehty Euroopassa että Suomessa.

Alankomaissa vuonna 2004–2006 tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin parechoviruksen esiintymistä alle viisivuotiaiden selkäydinnestenäytteissä. Näytteet tutkittiin reaaliaikaista RT-PCR:ää käyttäen. Tutkimuksessa oli aiemmin tutkittu enterovirukset 761 selkäydinnestenäytteestä, joista enteroviruspositiiviseksi oli todettu 108 lapsen näytteet. Näistä näytteistä 716 tutkittiin parechoviruksen osalta, joista 33 näytettä oli parechoviruspositiivisia (4,6 %). Tutkimuksessa ei ilmennyt päällekkäisinfektioita. Parechovirusinfektioita tavattiin kevästä syksyyn, kun taas enterovirusinfektioita esiintyi läpi vuoden niiden painottuen kesään ja syksyyn. (Wolthers ym. 2008: 359–361.)

Parechoviruksen esiintyvyyttä selvitettiin Iso-Britanniassa selkäydinnestenäytteistä vuosina 2006–2008. Tutkimuksessa oli mukana 1575 selkäydinnestenäytettä 1480 lapselta, joista suurin osa oli alle kolmen kuukainen ikäisiä. Tutkittavana oli myös näytteitä aikuisilta. Selkäydinnestenäytteissä esiintyi herpes simplex virus 1 (HSV1) 14:ssa ja herpes simplex virus 2 (HSV2) seitsemässä näytteessä. Varizella-zoster virus (VZV) todettiin viidessä ja enterovirus 93 näytteessä. Parechovirusta löytyi 14 näytteestä 14 eri henkilöltä (0,9 %). Parechovirus osoitettiin käyttämällä nested-RT-PCR-menetelmää ja viruksen tyypit selvitettiin monistamalla genomien aluetta VP3/VP1. Tyypityksen perusteella virus oli HPeV3 kaikissa parechoviruspositiivisissa näytteissä. Kaikki 14 parechovirusta olivat alle kolmen kuukauden ikäisiltä, kun taas enterovirusia esiintyi laajasti eri-ikäisillä henkilöillä. Enterovirusta tavattiin eniten 20–36-vuotiailla. Yli 65-vuotiailla keskushermostoinfektioita aiheuttivat pääosin VZV ja HSV1 ja 21–36-vuotiailla HSV2. Enterovirusinfektioita esiintyi suunnilleen sama määrä eri vuosien aikana. Parechovirusinfektioilla

oli selkeitä eroja vuotuisissa esiintymisissä, esiintyminen on tämän mukaan joka toisvuotista. (Harvala ym. 2009: 1754–1755.)

Isossa-Britanniassa vuonna 2007 suoritettiin menetelmäkehitystutkimus, jonka tarkoituksena oli saada havaittua parechovirus nopeammin uutta RT-PCR-menetelmää käyttäen. Tutkitut selkäydinnestenäytteet olivat vuosilta 2000–2005 ja niitä oli yhteensä 522 kappaletta. Kaikki näytteet olivat alle viisi vuotiailta lapsilta. Parechoviruspositiivisia näytteitä löytyi 20 kappaletta (3,8 %). Tutkimuksessa käytettiin tunnettuja parechoviruskantoja; HPeV1-6. Parechoviruskannoilla saatiin osoitettua positiiviset näytteet. (Benschop – Molenkamp – van der Ham – Wolthers – Beld 2007: 69–74.)

Suomalaisessa tutkimuksessa selvitettiin osatutkimuksena vuosina 2011–2012 parechoviruksen esiintymistä seerumi- ja selkäydinnestenäytteistä. Näytteet olivat 0–13 kuukauden ikäisiltä lapsilta, joilla oli esiintynyt neurologia oireita. 85 seerumi- ja selkäydinnestenäytettä tutkittiin RT-qPCR-menetelmällä. Parechoviruspositiivisiksi osoitettiin seitsemän näytettä (8,2 %) ja ne olivat kaikki alle kolmikuisilta lapsilta. Positiiviset näytteet lisäksi tyypitettiin. Parechovirustyyppit olivat HPeV4 ja HPeV3. Infektiot esiintyivät keväällä ja syksyllä. (Kolehmainen ym. 2014: 1109–1112.)

Vuosien 2000–2007 aikana Suomessa tyypitettiin 1121 enteroviruspositiivista näytettä. Näytteet olivat potilas- ja ympäristönäytteitä. Potilasnäytteet olivat muun muassa uloste-, iho- ja rakkulanäytteitä. Tutkimuksessa monistettiin RT-PCR-menetelmällä genomin VP1-aluetta ja sekvenssin perusteella virukset tyypitettiin. Enterovirustyyppinä löytyi neljästä eri enteroviruslajista. Enterovirus B-lajin tyyppinä oli 70,4 %, enterovirus A-lajin 16,6 %, enterovirus C-lajin 12,1 % ja enterovirus D-lajin 0,9 %. Enterovirus B-lajin tyyppinä olivat muun muassa echovirus 11 (E-11), E-6, coxsackievirus B5 (CBV-5) ja CBV-4 ja E-30. Enterovirus A-lajin tyyppinä olivat muun muassa EV-71 ja EV-16. Enterovirus C-lajin tyypeistä CVA-24 tavattiin eniten. Myös vuosina 1971–1992 esiintyi E-6, E-11, CBV-4 ja CBV-5 virustyyppinä jätevesi- ja potilasnäytteissä. Tämän tutkimuksen kaikki 1121 näytettä saatiin tyypitettyä. (Blomqvist – Paananen – Savolainen-Kopra – Hovi – Roivainen 2008: 2410–2411.)

Iso-Britanniassa vuosina 2007–2008 tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin enterovirus A- ja B-lajien osoittamisessa käytettävän menetelmän luotettavuutta ja herkkyyttä. Menetelmänä oli nested-RT-PCR. Tutkimuksessa oli tyypitettävänä 66 selkäydinnestenäytettä kaikenikäisiltä, joista enterovirustyyppit saatiin 64 näytteestä (97 %). 62 näytettä sisälsi

enterovirus B-lajin tyyppejä; pääosin echovirus-6 (E-6), E-9 ja E-30. Enterovirus A-lajin virustyyppejä oli kaksi; coxsackievirus A-6 (CVA-6) ja enterovirus 71 (EV-71). (McWilliam Leitch ym. 2008: 119; 122.)

3 Parecho- ja enterovirusinfektiot

Suurin osa parecho- ja enterovirusinfektioista ovat oireettomia (Pallansch – Roos 2001: 746; Harvala – Simmonds 2009: 5). Ne aiheuttavat kuitenkin oireiltaan hyvinkin erilaisia sairauksia. Esimerkiksi yksittäinen enterovirustyyppi voi aiheuttaa vaihtelevan määrän erilaisia oireita tai sairauksia, kun taas yksi sairaus tai oire voi johtua monesta eri enterovirustyyppistä. Kuitenkin on enterovirustyyppejä, jotka aiheuttavat vain tietyn tyyppisiä oirekuvia. (Pallansch – Roos 2001: 746.) Ikä vaikuttaa alttiuteen sairastua niin parecho- että enterovirusinfektioihin. Kuten parechovirusinfektioita, niin myös enterovirusinfektioita sairastetaan yleisimmin lapsuusiässä. (Pallansch – Roos 2001: 739; Harvala – Simmonds 2009: 5.) Lapset ovat tärkein viruksen välittäjä. Infektioiden vakavuusaste, oireet ja taudin ennustettavuus vaihtelevat. Jotkut infektiot ovat vakavampia vastasyntyneillä kuin vähän vanhemmilla lapsilla. Kliiniset oireet ovat usein selkeämmät lapsilla kuin aikuisilla. (Pallansch – Roos 2001: 739–740.) HPeV1-infektioiden sairastettavuus nousee puolivuotiaana ja viidennes lapsista on sairastanut infektion vuoden ikään mennessä. Lähes kaikilta sairastaneiden äideiltä löytyy HPeV1-vasta-aineita. (Tauriainen ym. 2007. 457.) Suomalaisilla aikuisilla on tavattu HPeV1-vasta-aineita 95 prosentilla, kun taas alle kaksikuisilla lapsilla vasta-aineita on vain 22 prosentilla. Toisaalta kaksivuotiailla HPeV1-vasta-aineita on jo 88 prosentilla. Lapset sairastuvat HPeV3-infektioihin usein alle kolmen kuukauden ikäisinä. (Harvala – Simmonds 2009: 5.) Kummankaan viruksen kohdalla ei ole havaittu eroa poikien ja tyttöjen infektoitumisessa (Wolthers ym. 2008: 359; Kolehmainen ym. 2012: 158). Parecho- ja enterovirusinfektioita esiintyy läpi vuoden, eniten myöhäiskesästä alkaen jatkuen aina talveen asti (Pallansch – Roos 2001: 745; Harvala – Simmonds 2009: 5; Kolehmainen ym. 2012: 158).

Elimistöön parecho- ja enterovirukset pääsevät ylemmän ja alemman ruoansulatuskanavan tai hengityselinten kautta (Pallansch – Roos 2001: 741; Harvala – Simmonds 2009: 5). Usein tartunta tapahtuu eritteiden välityksellä käsistä ihmisestä toiseen tai henkilön itsensä koskiessa suuhunsa, nenäänsä tai silmiinsä (Pallansch – Roos 2001: 741).

Mahalaukun matala pH ei anna suojaa infektiolta, koska parecho- ja enterovirukset kestävät hyvin happamia olosuhteita (Hyypiä ym. 2010: 515; Stanway ym. 1994: 8233). Enterovirus voi elää erilaisilla pinnoilla kuukausia suotuisissa olosuhteissa, kuten neutraalissa pH:ssa, kosteudessa ja matalassa lämpötilassa (Pallansch – Roos 2001: 742).

Nenänielun kautta infektio voi edetä välikorvaan, nenän sivuonteloihin tai joskus alempiin hengitysteihin. Ylemmistä hengitysteistä tai ravinnon mukana infektio voi levitä ruoansulatuskanavaan. Enterovirusten aiheuttamien infektioiden itämisaika voi olla 1–15 vuorokautta. Virusta voi erittyä ulosteeseen vielä pitkäänkin taudin akuutin vaiheen jälkeen, koska virus voi lisääntyä edelleen suoliston limakalvolla. (Hyypiä ym. 2010: 515.)

Parechovirusinfektiot ovat usein ruoansulatuskanavaninfektioita ja hallitsevin oire on kuume ja ripuli (Harvala – Simmonds 2009: 5; Wolthers ym. 2008: 360). Suomalaisista terveistä lapsista tehdyn tutkimuksen mukaan HPeV1 oli vallitsevin parechovirustyyppi ulostenäytteissä (Kolehmainen ym. 2012: 156).

3.1 Hengitystieinfektiot

Parecho- ja enterovirukset aiheuttavat hengitystieinfektioita (Pallansch – Roos 2001: 755; Wolthers ym. 2008: 360). Infektiot voivat kohdistua niin ylempiin kuin alempiinkin hengitysteihin aiheuttaen esimerkiksi keuhkoputkentulehdusta tai keuhkokuumetta (Harvala – Simmonds 2009: 6; Pallansch – Roos 2001: 755–756). Tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että parechovirusta esiintyy hengitystienäytteissä myös ilman kliinisiä oireita, joten viruksen yhteyttä sairauteen ei voida aina taata (Harvala – Simmonds 2009: 6; Kolehmainen ym. 2014: 1112). Yleisimmin enterovirusten aiheuttamat ylemmät hengitystieinfektiot ovat flunssaa, mutta ne voi aiheuttaa myös muun muassa kurkkurentulehdusta. Enterovirusinfektiot saattavat olla piileviä, jolloin oireita ei esiinny. Jos oireita ilmenee, ne ovat yleensä itsestäänrajoittuvia ja lieviä. Oireet alkavat muutamien päivien jälkeen tartunnasta. Vakavimmat alahengitystieinfektiot voivat johtua suuremmista virusmääristä tartunnan aikana. (Pallansch – Roos 2001: 756.) Parechovirusten aiheuttamat hengitystieinfektiot on liitetty muun muassa HPeV1:een (Harvala – Simmonds 2009: 6). Parechoviruksista HPeV1 voi aiheuttaa myös korvatulehduksia (Taurainen ym 2008: 38).

3.2 Ihoinfektiot

Enterorokko on yleisimmin lapsilla tavattu enteroviruksen aiheuttama rokkotauti. Sen pääsääntöisinä oireina ovat kuume ja rakkulamainen ihottuma suun alueen limakalvoilla, käsissä ja jaloissa, mikä erottaa sen muista suun virustaudeista. Enterorokkoa esiintyy muidenkin enterovirusinfektioiden ohella enimmäkseen loppukesästä ja syksystä. Enterorokko on yleisimmin enterovirus A-lajin virusten aiheuttama tauti, joiden joukossa on useita enterovirusia. (Vuorinen 2011: 175.) Coxsackievirus A16 (CVA-16) on yleisin enterorokon aiheuttaja enterovirus 71:n (EV-71) ohella. Näiden lisäksi CVA-6, CVA-9 ja CVA-10 voivat aiheuttaa enterorokkoa. CVA-6:n on todettu aiheuttavan lapsien lisäksi enterorokkoa myös aikuisilla. (Ramirez-Fort ym. 2014: 381.) Jos coxsackie A-viruksen aiheuttamat rakkulat esiintyvät vain suun alueen takaosassa tauti on herpangina. Tämän taudinkuva on hyvin samankaltainen kuin herpesin aiheuttaman suutulehduksen. (Ruuskanen – Heikkinen 2011: 433.)

Tartunta leviää uloste-suuteitse ja pisaratartuntana hengityseritteestä. Tartunta on mahdollista saada rikkoutuneista rakkuloista, jotka sisältävät viruksia. Itämisaika on 3–6 vuorokautta, jonka jälkeen ilmaantuu lämpöilyä ja vaaleita suuriakin rakkuloita. Rakkulat paranevat noin viikossa. Muutamien kuukausien jälkeen akuutista infektiosta voidaan tavata kynsien irtoamista. Yleensä enterorokon oireet ovat lieviä ja tauti paranee itsestään hyvin. Infektioon ei ole spesifistä hoitoa eikä tehoavaa rokotetta. (Vuorinen 2011: 175–176.)

Parechovirukset voivat aiheuttaa myös iho-oireita (Wolthers ym. 2008: 360; Jääskeläinen ym. 2013: 330). HPeV3:n on todettu aiheuttavan lapsilla raajojen ääriosiin keskittyvää punoittavaa kämmenten ja jalkapohjien ihottumaa. Ihottumaa voi olla raajojen lisäksi myös vartalolla tai kasvoilla. (Shoji – Komuro – Miyata – Miyairi – Saitoh 2013: 235). Useat enterovirus A- ja B-lajin tyypit aiheuttavat rakkulamaisia ihottumia ja eksanteemaa (Vuorinen 2011: 176).

3.3 Lasten vakavat infektiot

Parechovirukset aiheuttavat pienillä lapsilla, etenkin vastasyntyneillä, vakavia infektiota. Vastasyntyneiden ja pienten lasten parechoviruksen aiheuttamat yleisinfektiot oireilevat enterovirusten tapaan. Oireet ovat tyypillisesti kuumeilua, ärtyneisyyttä, ihottumaa ja

syömättömyyttä. (Verboon-Maciolek ym. 2008a: 243; Wolthers ym. 2008: 360.) Kuume infektion aikana voi olla korkeaa tai pitkittynyttä sekä sen ohella voi esiintyä neurologia oireita. CRP-arvo on yleensä normaali, mutta koholla oleva arvo ei sulje pois virusinfektiota. Infektio voi aiheuttaa myös leukopeniaa. (Kolehmainen ym. 2014: 1111–1112.) Parechovirusista HPeV3:n ja HPeV4:n on todettu aiheuttavan vastasyntyneiden yleisinfektioita (Jääskeläinen ym. 2013: 328; Kolehmainen ym. 2014: 1112). Enteroviruksen aiheuttamat yleisinfektiot ovat yleisempiä kuin bakteerin aiheuttamat infektiot ja esiintyvät kesäisin ja syksyisin (Pallansch – Roos 2001: 756).

Aseptisella meningiitillä tarkoitetaan bakteeritonta aivokalvontulehdusta. Sen oireita ovat muun muassa kuumeilu, päänsärky sekä valonarkuus ja se on yleisin keskushermostoinfektio. Aivokalvontulehduksen esiintyminen on todennäköisempää pienillä lapsilla ja sairastettavuus vähenee iän myötä. (Pallansch – Roos 2001: 750.) Parechovirukset aiheuttavat enterovirusten tapaan aivokalvontulehduksia lapsilla. Pääasiassa HPeV3:n on todettu aiheuttavan aivokalvontulehduksia, mutta niitä voivat aiheuttaa esimerkiksi myös HPeV1 tai HPeV2. (Harvala – Simmonds 2009: 6; Wolthers ym. 2008: 360.) Aseptisistä meningiiteistä juuri enteroviruksen aiheuttama infektio on yleisin syy hakeutua lääkärin vastaanotolle. Tiettyjen B-ryhmän coxsackievirusten on todettu aiheuttavan alle kolmikuisilla vauvoilla aseptista meningiittiä. Esimerkiksi echovirus 4 (E-4)-, E-6-, E-9-, E-11- ja E-30-tartunta voi johtaa aivokalvontulehdukseen. Aseptisen meningiitin oireisiin voi kuulua myös ihottuma, joka on yhdistetty coxsackievirus A5:n (CVA-5), CVA-9:n ja CVA-16:n sekä E-4:n, E-6:n, E-9:n ja E-16:n aiheuttamiin keskushermostoinfektioihin. (Pallansch – Roos 2001: 750–751.)

Enkefaliitti eli aivotulehdus on aivokudokseen levinnyt infektio, johon liittyy mahdollisesti aivot toimintojen häiriöitä, kuten tajunnuntason laskua ja kohtauksia. Enkefaliitti liittyy usein aseptiseen meningiittiin. Aseptisessä meningiitissa tila on kuitenkin vakaampi ja taudin ennuste parempi. Ataksiaan johtava akuutti meningiitti voi johtua esimerkiksi eräistä echo- tai coxsackievirusista. (Pallansch – Roos 2001: 751.) Niinikään parechovirukset voivat aiheuttaa enkefaliittia (Wolthers ym. 2008: 360). Parecho- tai enteroviruksen aiheuttamat enkefaliitit voivat johtaa aivojen valkean aineen vaurioihin (Verboon-Maciolek 2008b: 272).

Keskushermostoinfektiot ovat usein itsestään rajoittuvia. Infektioiden kesto on muutamista päivistä viikkoon. Kuolemaan johtavia infektoita on todettu muun muassa coxs-

ackievirus B1:n (CBV-1) ja E-9:n, E-17:n ja E-21:n aiheuttamissa infektioidissa. Vastasyntyneiden sairastavuus ja kuolleisuus on korkeampaa ja sitä vakavampaa, mitä nopeammin infektio kehittyy syntymän jälkeen esimerkiksi viruksen tarttuessa äidiltä lapseen synnytyksen aikana. (Pallansch – Roos 2001: 751.) Parechoviruksen aiheuttamaa infektiota ei voi erottaa enteroviruksen aiheuttamasta infektiosta pelkästään kliinisten oireiden perusteella (Verboon-Maciolek ym. 2008a: 245).

3.4 Muita enterovirussairauksia

Enterovirukset aiheuttavat edellä mainittujen lisäksi monia muitakin akuutteja ja kroonisia sairauksia. Enterovirusiin kuuluvan polioviruksen aiheuttama poliomyelitis on usein lievästi kuumeinen tauti ruoansulatuskanavanoireineen. Keskushermostossa virus voi johtaa lihaksien surkastumiseen ja lopulta halvausoireisiin. Enterovirusten aiheuttamat sydänlihastulehdukset (myokardiitit) ovat usein itsestään rajoittuvia tai piileviä, mutta voivat johtaa myös vakavampiin komplikaatioihin. Cocksackie B- ja A-virus, kuten myös echovirus on tavattu akuuteissa sydänlihastulehduksissa. Tulehdus voi myös kroonistua. Tällöin ilmenee laajentava, dilatoiva, sydänlihassairaus, joka johtaa mahdollisesti sydämen vajaatoimintaan. Enterovirukset aiheuttavat myös lihastulehduksia, jotka voivat muodostua kroonisiksi. Näiden lisäksi enterovirusilla on todettu olevan jonkintasoinen yhteys tyypin 1 diabeteksen kehittymiseen. Ympäristötekijöillä ja geneettisellä alttiudella on suuri rooli taudin kehittämisessä. Silmätulehdukset, kuten äkillinen verenvuotoinen sidekalvontulehdus, voi olla enteroviruksen aiheuttama. Oireet muodostuvat lyhyen itämisaikojen sisällä, parin vuorokauden kuluttua tartunnan saamisesta. (Pallansch – Roos 2001: 746; 749; 753–755.)

3.5 Laboratoriotutkimusmenetelmiä

Virusdiagnoosi on kehittynyt viime vuosina merkittävästi. Menetelmät ovat laajentuneet entistä nopeammiksi, herkemmiä ja tarkemmiksi. Joissain tapauksissa on mahdollista saada virusdiagnoosi jo muutaman tunnin sisällä. Virusdiagnoosia hyödynnetään akuutin infektion virusetiologian erotusdiagnoosissa, virusten aktiivisuuden palautumisen osoittamisessa ja immuniteettitutkimuksissa. (Vainionpää ym. 2000: 17–18.)

Virusinfektioiden laboriodiagnostiikassa on käytössä useita menetelmiä. Potilasnäytteistä osoitetaan tartuttamiskykyisiä viruksia, kuten proteiineja tai nukleiinihappoja. Menetelmillä on omat etunsa ja rajoituksensa. Niiden valintaan vaikuttavat virustyyppi ja menetelmien käyttömahdollisuus. (Vainionpää ym. 2000: 17–18.)

Virusviljely on tärkeä ja herkkä menetelmä virusten diagnostiikassa. Yhden viruspartikkelin esiintyminen riittää aloittamaan infektion soluviljelmässä ja siitä saadaan virusmateriaalia, josta voidaan yrittää viruksen tyyppitystä. Useimmiten viljelty virus on taudinaiheuttajana, mutta esimerkiksi enteroviruksilla on mahdollisuus erittyä ulosteeseen pidemmän aikaa akuutin infektion jälkeen. Työlään ja hitaan virusviljelyn etuna on kuitenkin sen mahdollisuus tunnistaa viruksia, joita ei etukäteen osata epäillä. Positiivisen viljelytuloksen saaminen on mahdollista vuorokaudessa viljelyn aloittamisesta. Negatiivisen viljelytuloksen ilmoittaminen kestää useita viikkoja. Edellytys virusviljelyn onnistumiselle on, että näytemateriaalissa on infektiokykyisiä partikkeleita, jotka on istutettava oikeantyyppisille soluille. Näyte tulee ottaa oikeasta paikasta oikeaan aikaan ja toimituksen on tapahduttava oikeaoppisesti laboratorioon. (Vainionpää ym. 2000: 19.)

Elektronimikroskopia (EM)-menetelmällä tarkastellaan näytettä. Identifiointi perustuu näytteessä olevien virusten muodon ja koon määrittämiseen virusheimojen tasolla. EM-tutkimus on nopea ja mahdollistaa diagnoosiin tapauksissa, joissa taudinaiheuttaja on tuntematon. Menetelmän onnistumiseksi tutkittavassa näytteessä tulee olla runsaasti viruspartikkeleita. EM-menetelmän käyttöä rajoittaa virusdiagnostiikassa sen kallis hinta ja osaavien asiantuntijoiden puute. (Vainionpää ym. 2000: 19.)

Virusantigeenien määrittäminen perustuu virusproteiinien osoittamiseen immunokemiallisesti potilasnäytteestä. Näytelaadut voivat olla infektioituneita soluja sisältävät limakalvo-, iho- ja kudoksenäytteet. Antigeeninosoitumenetelmällä proteiinantigeeni osoitetaan merkityllä vasta-aineella. Merkkiaineet toimivat eri menetelmissä omalla halutulla tavalla, esimerkiksi immunofluoresenssitekniikassa se säteilee valoa. Antigeeninosoitumenetelmä on nopea, joten se soveltuu hyvin päivystyskäyttöön. Valmiit tulokset saadaan muutamissa tunneissa. Markkinoilla on useita pikatestejä, joilla saadaan vain suuntaa-antava tulos, koska ne eivät ole menetelminä niin herkkiä ja tarkkoja. (Vainionpää ym. 2000: 19–21.)

Virusnukleiinihappojen osoitus perustuu kohdemolekyylin entsyymaattiseen monistamiseen ja saadun monistustuotteen osoittamiseen. Menetelmän etuina on herkkyys ja

mahdollisuus tutkia viruksia, joita ei voida viljellä. Tutkittavan näytteen nukleiinihaposta, monistetaan haluttu DNA-jakso toistetuilla entsyymireaktioilla. Jos kyseessä on RNA, se tulee kääntää komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä voidaan osoittaa nukleiinihappojen olemassaolo monistusreaktion aikana. Monistustuotteiden emäsjärjestyksiä vertailemalla saadaan selville eri viruskantojen sukulaisuhteet. (Vainionpää ym. 2000: 21–22.) Useita eri taudinaiheuttajia vastaan on kehitetty kaupallisia pikatestejä. Näistä esimerkkinä on Cepheid'in Xpert® EV-testi, jonka avulla valmistaja lupaa nopean ja tarkan enteroviruksen tunnistamisen muun muassa selkäydinnestenäytteestä. Menetelmänä testissä on reaaliaikainen RT-PCR ja tulos saadaan muutamassa tunnissa. (Cepheid 2014.)

Menetelmien luotettavuutta eli reliabiliteettiä voidaan mitata rinnakkaismittauksilla, toistomittauksilla ja sisäisellä yhteneväisyydellä. Luotettavaksi mittauksen tekee, kun sama tai eri henkilö saa samalla mittarilla eri mittauskerroilla samat tulokset. Rinnakkaismittauksessa suoritetaan mittaus samaan aikaan eri mittarilla. Toistomittaukset tehdään eri aikaan samalla mittarilla. Sisäisen yhteneväisyyden mittaaminen tapahtuu samaan aikaan samalla mittarilla. (Metsämuuronen 2006: 58.)

3.6 Infektiopotilaan hoito

Alle kolmen kuukauden ikäisen lapsen yli 38-asteen kuume arvioidaan aina päivystysluonteisesti ja tämä otetaan herkästi sairaalaan. Alle kuukauden ikäinen kuumeinen lapsi otetaan sairaalaan aina. Lapsilta tutkitaan virtsanäyte, verokuva ja CRP. Riski vakavaan infektiin on vähäinen, mikäli lapsi on ollut täysiaikainen eikä peruslaboratoriotuloksissa ole poikkeavuuksia. Kuitenkin antibioottihoito aloitetaan herkästi esimerkiksi kefuroksiimilla tai ampicilliinin ja aminoglykosidin yhdistelmällä epäiltäessä bakteeri-infektiota. (Qvist – Korppi 2009: 2373–2374.)

Viruksen aiheuttamaa yleistynyttä infektiota tai aseptista meningiittiä on vaikea erottaa bakteeri-infektiosta, joten virusinfektioita hoidetaan usein antibiootein (Qvist – Korppi 2009: 2374; Luoto ym. 2014: 2074; 2076). Herpes-simplex viruksen aiheuttamaa vakavaa keskushermostoinfektiota voidaan hoitaa lääkkein. Epäiltäessä HSV-infektiota aloitetaan suonensisäinen asikloviirilääkitys. Lopulliseen HSV-diagnosiin päästään tutkimalla selkäydinneste sekä tekemällä EEG ja magneettitutkimus. (Qvist – Korppi 2009: 2374.) Muita merkittäviä vastasyntyneen virusinfektioita ovat varicella-zoster virus, B- ja

C-hepatiittivirukset sekä HI-virus. Parecho- ja enterovirusinfektioihin ei ole lääkehoitoa, joten hoito on oireenmukaista. (Luoto ym. 2014: 2071; 2074.)

Infektiota epäiltäessä sairaalta lapselta tutkitaan veriviljely, selkäydinneste, virtsanäytteet sekä otetaan keuhkokuva. Virusinfektion mahdollisuus on poissuljettava viimeistään, kun bakteerinäytteet ovat jääneet negatiiviseksi. (Luoto ym. 2014: 2076.) Viruksia tutkittaessa on huomioitava myös parechovirusinfektion mahdollisuus. Pikornavirusten tutkiminen monissa kliinisissä laboratorioissa on rajoittunut pelkästään enterovirusten tutkimiseen. (Kolehmainen 2014: 1111.) Virusinfektion varmistuttua antibioottihoito voidaan lopettaa, mikäli potilaalla ei todeta samanaikaista bakteeri-infektiota (Luoto ym. 2014: 2076).

Tieto taudinaiheuttajasta on tärkeä. Enterovirusten lisäksi parechoviruksen tutkiminen on välttämätöntä, koska kummatkin ovat yleisiä taudinaiheuttajia samanlaisine oireineen. (Kolehmainen ym. 2014: 1112.) Virusten tutkiminen on useasta syystä tarpeellista. HSV-infektiossa voidaan aloittaa antiviraalinen lääkitys. Virusinfektion varmistuttua voidaan lopettaa mahdollinen turha mikrobilääkehoito. Virusdiagnoosin tärkeyttä puoltaa myös se, että näin sairaalaoiloissa on mahdollista toteuttaa potilaiden ja henkilökunnan kohortointi. Tällöin samaa virusinfektiota sairastavat potilaat voivat olla samassa hoituhuoneessa ja mahdollisuuksien mukaan heitä hoitaa eri henkilökunta kuin toisia sairauksia sairastavia. Näin voidaan pyrkiä estämään sairaalaepidemioiden synty. Tuntemalla taudinaiheuttaja voidaan ennakoida taudin oireet ja eteneminen helpommin. On todettu myös, että virusinfektiot, joita sairastetaan varhaislapsuudessa voivat vaikuttaa lapsen myöhäisempään terveydentilaan. Hengityselinten virusinfektioiden jälkeen myöhemmällä iällä voi kehittyä hengitystieoireita tai astmaa. Muista mahdollisista virusinfektioiden vaikutuksista myöhempään terveyteen on vielä vähän tietoa. Myöhemmän sairastumisen syyshdettä voidaan selvittää, mikäli virus on määritetty varhaislapsuuden infektiassa. (Luoto ym. 2014: 2075–2076.)

Suonensisäistä immunoglobuliinia eli intravenous immunoglobulin (IVIg) on käytetty vakavissa enterovirusinfektioissa vastasyntyneillä ja immuunipuutteisilla potilailla. Molemissa ryhmissä on todettu spesifisten vasta-aineiden puutteen johtavan vakaviin tai kroonisiin infektioihin. IVIg:iä on käytetty vastasyntyneiden vakavissa meningo-entsefalitiiden (aivokalvo/aivotulehdus), yleistyneiden infektioiden, hepatiittien ja sydänlihastulehdusten hoidossa. Lääkityksen on todettu auttavan jossain määrin, mutta lääkkeen tehosta ei ole todisteita. (Wildenbeest – Harvala – Pajkrt – Wolthers 2010: 1423–1424.)

Rokotetta ei ole parecho- tai enterovirusten aiheuttamiin infektioidiin, lukuunottamatta enterovirusiin kuuluvia poliovirustyypppejä. Rokotteiden kehittäminen kaikkia enterovirusia vastaan on vaikeaa niiden suuren määrän vuoksi. (Hyypiä ym. 2010: 522.) Enterovirus 71:n aiheuttamaa infektiota vastaan on kehitelty rokotetta. Tämä enterovirustyyppi aiheuttaa maailmalla enterorokkoepidemioita ja infektio voi johtaa muun muassa vakaaviin neurologisiin komplikaatioihin. (Li ym. 2014: 829; 831.)

Sekä parecho- että enterovirusia vastaan tarvitaan lääkkeitä. Koska vastasyntyneiden enterovirusinfektioita on kyetty helpottamaan IVlg:n avulla, sen pitäisi olla mahdollista myös parechovirusinfektioiden kohdalla. Monoklonaalisten vasta-aineiden käyttömahdollisuuksia olisi myös tutkittava. Vasta-aineet näyttävät tällä hetkellä olevan tulevaisuuden ainoa lääkevaihtoehto parechovirusten kohdalla. (Wildenbeest ym. 2010: 1424.)

4 Työssä käytetyt laboratorimenetelmät

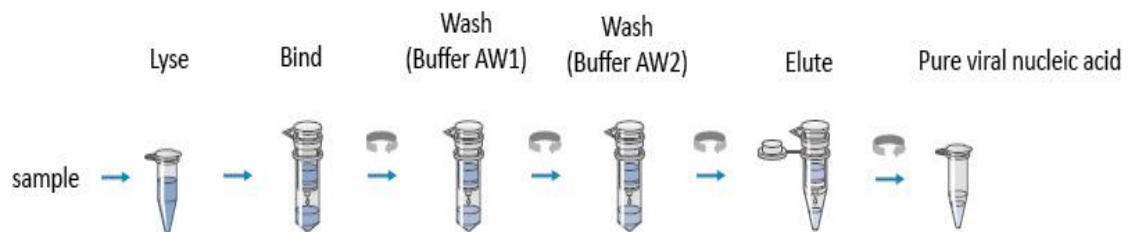
Tuomme luvussa esille niiden menetelmien periaatteet, joita käytimme työssämme. Eristimme ribonukleiinihapot potilasnäytteistä sekä tutkimme parecho- ja enterovirukset reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä. Parecho- ja enteroviruspositiivisista näytteistä monistimme viruskantojen tyypitykseen käytettävän genomialueen nested-RT-PCR:llä. Tästä saadut tuotteet lähetimme sekvensoitavaksi, jonka jälkeen määritimme virustyyppit saamamme sekvenssitulosten perusteella.

4.1 RNA-eristys

RNA:n eristys ja puhdistus suoritetaan nykyisin hankalien uuttojen sijasta silikakantajaperusteisilla menetelmillä. Kaupallisilta valmistajilta on saatavilla niiden omia hajotusmenetelmiä ja erikoisreagensseja. Lisäksi saatavilla on spin-kolonneja, vakuumi-imuja ja kuoppalevyformaatteja. RNA-eristysten ja puhdistusten automatisointi on mahdollistettu liuostenkäsittelyasemilla, jossa työskentely tapahtuu samalla tavalla kuin DNA-työskentelyssä. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 108.)

RNA on erittäin herkkä ribonukleasientsyymien (RNAasi) vaikutukselle ja kontaminoitumista niiden kanssa on vältettävä. RNA:ta eristettäessä RNA:ta ja niitä on kaikkialla, kuten ihmisen iholla ja ilmassa. (Suominen 2010: 108; Qiagen 2010: 10.) PCR-työskentelyn tulee laboratoriossa tapahtua hyvien käytäntöjen mukaisesti. Näin ollen laboratoriossa reagenssien valmistus, näytteiden käsittely ja PCR-monistaminen sekä dekteointi tapahtuvat eri tiloissa. On erittäin tärkeää, että reagenssit pysyvät puhtaina ja kontaminoitumattomina. Työskentelyssä käytetään filteerillisiä pipetinkärkiä ja ne vaihdetaan jokaisen liuoksen siirron jälkeen. Koko työskentelyn ajan pidetään suojakäsineitä ja ne vaihdettava välittömästi, mikäli näyte kontaminoi käsineen. (Qiagen 2010: 10; 18.)

Silikamenetelmä perustuu nukleiinihappojen sitoutumiseen silikaan eli piidioksidiin. Silika on yleensä pienessä spin-pylväässä. Tässä työssä kerromme mikrosentrifuugin avulla suoritettavasta puhdistuksesta (ks. kuvio 5). Myös vakuumi-imulaiteen käyttö on mahdollista tehtäessä eristys silikapylväsmenetelmin. Silikapylväseristys voidaan suorittaa myös automaattilaitteella. (Qiagen 2010: 8; 12.)



Kuvio 5. RNA:n eristys silikamenetelmällä (mukaiillen: Qiagen 2010: 8).

Silikapylväsmenetelmällä virus-RNA:ta voidaan eristää plasmasta (ei hepariiniplasma), seerumista tai muista elimistön nesteistä. Näyte voi olla tuore tai pakastettu. Pitkäaikaisessa säilytyksessä pakastelämpötilan tulee olla -20 – (-80) astetta. RNA:n säilymisen vuoksi näyte tulisi sulattaa vain kerran. (Qiagen 2010: 7; 15.)

Menetelmässä käytetään puskuria, joka saa aikaan näytteen hajoamisen korkeassa ionivahvuudessa kaotroopin läsnäollessa. Kaotrooppi hajottaa molekyyliä ympäröivän vesivaipan, jolloin negatiivisesti varautuneiden silikan että RNA:n välille muodostuu positiivisesti varautunut suolasilta, kun ionivahvuus on korkea. Kaotrooppi on yleensä 6M guaniidiinihydrokloridia. (Suominen 2010: 106.) Kantaja-RNA voidaan lisätä hajotuspuskuriin

parantamaan RNA:n sitoutumista silikakalvoon erityisesti, kun RNA-pitoisuus näytteessä on alhainen. Se myös vähentää RNA:n hajoamista, mikäli RNAasi-aktiivisuutta on jäänyt jäljelle. Hajotuspuskurin ja näytteen muodostamassa liuoksessa suolan ja pH-tasapainon vaikutuksesta olosuhteet ovat sellaiset, että proteiinit ja muut kontaminoivat elementit, jotka voisivat haitata myöhempiä entsyymireaktioita, eivät jää silikakalvolle. (Qiagen 2010: 9.) Liuos viedään pylvääseen ja sentrifugoinnin jälkeen RNA on sitoutunut silikakalvolle (Suominen 2010: 106). Työskentelyssä huomioidaan, että liuos pipetoidaan huolellisesti pylvääseen ilman, että sitä pääsee pylvään reunoille. Myöskään pipetin kärjen ei tule osua silikakalvolle. (Qiagen 2010: 18.)

Sitoutumisen jälkeen silikakalvoa pestään kahden eri pesupuskurin avulla. Pesuilla varmistetaan epäpuhtauksien poistuminen silikakalvolta ilman, että se vaikuttaa RNA:n sitoutumiseen. (Qiagen 2010: 9.) Pesupuskurit sentrifugoidaan silikakalvon läpi. Silikakalvon pesujen jälkeen RNA eluoidaan vähäiseen määrään puskuria sentrifugoimalla pus-kuri kalvon läpi steriiliin mikroputkeen. (Suominen 2010: 106.) Puskuri on RNAasi-vaapaata vettä sisältäen 0,04 % natriumatsidia, joka estää mikrobien kasvun ja myöhemmän kontaminoitumisen RNAaseilla. Natriumatsidi absorboi spektrofotometrillä aallonpituudella 220 ja 280 nm, muttei vaikuta esimerkiksi RT-PCR-menetelmään. Mikäli eristetyn RNA:n puhtautta määritetään, on suositeltavaa käyttää pelkästään RNAasi-vaapaata vettä puskurin sijasta. (Qiagen 2010: 9.)

4.2 RT-PCR

Monistettaessa RNA:ta se tulee kääntää ennen PCR-reaktiota DNA:ksi. Tätä sovellusta kutsutaan RT-PCR-menetelmäksi (reverse transcription polymerase chain reaction). Menetelmässä käytettävän käänteiskopioijaentsyymin avulla tuotetaan komplementaarista DNA:ta (cDNA) RNA-juosteesta. RT:n ensimmäisessä vaiheessa muodostuu kaksijuosteinen RNA-DNA-hybridi. Jotta käänteiskopioijaentsyymi voi alkaa toimimaan, reaktiolämpötilaa on hieman nostettava. Kun lämpötilaa nostetaan lähes 100 asteeseen, RNA-DNA-hybridi denaturoituu ja käänteiskopioijaentsyymi inaktivoituu. Tämän jälkeen PCR-reaktio jatkuu normaalisti. Reaktiossa templaattina eli monistuskohteena toimii siis cDNA. (Suominen ym. 2010: 170–172.)

PCR:illa saadaan monistettua DNA-jaksoja. Menetelmällä saadaan pienestä DNA-määrästä miljardikertainen määrä vain muutamissa tunneissa. Työskentelyssä käytetään

elävistä bakteereista eristettyä ja lämpöä kestävä DNA-polymeraasia. TAQ-polymeraasi on niistä eniten käytetty. Aluke on templaattiin sitoutuva lyhyt, noin 15–40 nukleotidin pituinen ssDNA-fragmentti (single-stranded DNA). Alukkeen on oltava komplementaarinen monistettavalle DNA:lle ja sen emäsjärjestys tunnetaan tarkasti. DNA-polymeraasi tuottaa uutta juostetta alukkeen loppupäästä ja liittää siihen nukleotidejä templaatin mukaisessa järjestyksessä. Alukkeet suunnitellaan kiinnittyväksi DNA:n juosteisiin ja monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden väliin jää DNA-jakso, jota halutaan monistaa. (Suominen ym. 2010: 153–155; NCBI 2014.)

Templaatti denaturoidaan kuumennuskäsittelyllä, jotta alukkeet voivat sitoutuvat siihen. Denaturoituessa kaksijuosteinen DNA:n juosteet irtoavat toisistaan, jolloin DNA:sta saadaan yksijuosteista. Jotta alukkeet kiinnittyisivät templaattiin, lämpötilan tulee olla hetkellisesti matalampi. Tätä vaihetta kutsutaan annealing-reaktioksi. Alukkeet renaturoituvat eli kiinnittyvät templaattiin. Itse templaatti ei ehdi renaturoitumaan suuremman kokonsa vuoksi. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet, lämpötilaa nostetaan esimerkiksi 72 asteeseen, riippuen polymeraasientsyymistä. Pidennysreaktion aikana DNA-polymeraasi saa aikaan nukleotidien liittymisen templaatin mallin mukaisesti alkaen alukkeen 3'-päästä. Näin templaatille muodostuu vastinjuoste. Lämpötilaa nostattaessa noin 95 asteeseen juosteet irtoavat jälleen toisistaan. PCR-sykli muodostuu sarjasta denaturointi-, annealing- ja pidennysvaihe. Yhden syklin aikana syntyy kahdesta DNA-juosteesta neljä juostetta. Syklejä toistettaessa saadaan pienestä määrästä monistettua suuri määrä halutun pituisia DNA-jaksoja. (Suominen ym. 2010: 154.)

4.2.1 Reaaliaikainen RT-PCR

Reaaliaikaisessa PCR:ssä (real-time PCR) reaktion etenemistä ja tuotteen monistumista voidaan seurata reaaliajassa. Reaaliaikainen PCR-menetelmä on nopeampaa, koska lopputuotetta ei tarvitse käsitellä esimerkiksi geielektroforeesia varten. Näin vähennetään myös kontaminaation mahdollisuutta. Menetelmä perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön. Reaaliaikaisessa PCR:ssä signaaleja voidaan mitata fluoresoivan koettimen (probe) avulla. Koettimet ovat pituudeltaan 18–30 nukleotidia ja ne ovat kopioitavalle templaatille komplementaarisia. Koettimet leimataan fluoresoivalla aineella. Proximal quenching-energiansiirtomenetelmässä koettimen 5'-päähän on sijoitettu fluoresoiva leima ja sen toiseen päähän, 3'-päähän, vaiennin (quencher). Kun koetin ei ole sitoutunut kohteeseensa, ei 5'-pään leima pysty fluoresoimaan, koska energia siirtyy

vaientimelle. Kun koetin sitoutuu kohteeseensa ja polymeraasi muodostaa 5'-3'-suuntaisesti uutta juostetta, koetin hajoaa ja leima että vaeinnin joutuvat erilleen toisistaan. Tällöin leiman fluoresenssisignaali voimistuu ja se voidaan detektoida. (Suominen ym. 2010: 168.)

SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR-menetelmässä yhdistyy käänteiskopioijaentsyymi (SuperScript reverse transkriptase) ja DNA-polymeraasi (Platinum Taq) samassa entsyymiseoksessa. Menetelmässä käytettävä käänteiskopioijaentsyymi on suunniteltu vähentämään RNAasi-aktiivisuutta ja sen cDNA:n syntetisoiminen voi tapahtua 42–60 asteessa. Käytettävä polymeraasi on Taq-DNA-polymeraasi, johon on yhdistetty vasta-aine, joka estää sen polymeraasiaktiivisuuden ympäröivässä lämpötilassa. Entsyymiaktiivisuus palautuu PCR:n denaturoitumisvaiheen jälkeen. Reaktioseos koostuu magnesiumsulfaatista, deoksinukleotideistä (dNTP) ja reaktiota tasapainottavista aineista. ROX® toimii referenssiväriä normalisoimassa fluoresenssisignaalia. Työskennellessä reaktioseoksen ainesosat sekä näytteet on pidettävä jäällä. Menetelmässä on ehdottoman tärkeää reaktioseoksen tarkka, oikein pipetointi. (Thermo Fisher Scientific 2014: 1.)

Reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä määritetään nukleiinihappojen määrää näytteestä. Tulosten tulkinnassa käytetään Ct-arvoa (threshold cycle). Kynnysyykli ilmoittaa syklien määrän, kun signaali ylittää tunnetun kynnysarvon. (Suominen ym. 2010: 170.) Käytetyimmät tulosten analysointimetodit ovat absoluuttinen- ja suhteellinen kvantifiointi, joista suhteellinen kvantifiointi on yleisimmin käytetty. Absoluuttisessa kvantifioinnissa verrataan näytteen Ct-arvoja vakiodien avulla saatuun standardikäyrään. Suhteellinen kvantifiointi vertaa kohdenukleiinihappojen suhteellista määrää referenssigeeniä käyttäen. (Bio-rad 2006: 34.)

4.2.2 PCR-työskentely

PCR-työskentely suoritetaan kontrolloiduissa olosuhteissa noudattamalla hyviä laboratoriotyöskentelytapoja. Toiminta tulee olla hyvin suunniteltua ja vaatii tarkkaa toimintamenetelmän seurantaa. Erityisesti puhtauteen tulee kiinnittää suuresti huomiota, jotta mahdollisilta vääriltä PCR-tuloksilta vältyttäisiin. Optimoidun työskentelyn saavuttamiseksi vaaditaan oma erillinen työtila. PCR-reaktioiden valmistamista varten on oltava

puhdastila, joka on eristetty muusta laboratoriosta esimerkiksi ylipaineistetun ilmastoiminnan avulla ja suodattamalla sisään pääsevä ilma. On otettava huomioon se, ettei PCR-tuotteiden käsittelyn jälkeen työskentely puhdastilassa ole mahdollista ilman perusteellista puhdistautumista. Tämä on aiheellista huomioida, kun käsitellään herkkiä sovelluksia, joissa lähtömateriaalin määrä on vähäinen tai muuten on mahdollisuus saada vääriä positiivisia tuloksia. (Suominen ym. 2010: 165–166.)

PCR-työskentelyssä reaktioseosten valmistaminen on tapahduttava laminaarikaapissa. Laminaarikaapin puhtaudesta huolehditaan UV-valoa käyttämällä. Pipetointi voidaan suorittaa joko positiivikorvauspipeteillä tai käyttämällä tavallisessa pipetissä filterillisiä pipetinkärkiä. Tällä suojataan mahdollisten aerosolien aiheuttama kontaminaatio. Reaktioiden valmistamisessa käytettyjä pipettejä ei käytetä muuhun työskentelyyn. (Suominen ym. 2010: 166.)

4.2.3 Nested-RT-PCR

Nested-RT-PCR pitää sisällään käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktion (RT), PCR-reaktion ensimmäisen kierroksen sekä toisen kierroksen. Ensimmäinen kierros on niin sanottu tavallinen PCR-reaktio. Toisessa eli jälkimmäisessä reaktiossa käytetään ensimmäisestä reaktiosta saatua tuotetta templaattina. Toisen kierroksen alukkeet ovat komplementaarisia ensimmäisen kierroksen tuotteelle. Toisella kierroksella näin ollen pitäisi monistua vain oikeaa tuotetta. Nested-PCR:llä saadaan melko onnistuneesti vähennettyä tai poistettua epätoivottuja tuotteita samalla lisäten herkkyyttä. (Roux 1995: 187–188.)

4.2.4 Agaroosigeelielektroforeesi

Elektroforeesiin perustuvia menetelmiä voidaan käyttää analysoitaessa pieniä, keskikokoisia tai suuria nukleiinihappojaksia. Pienet nukleiinihappojaksot ovat kooltaan kymmenestä muutama sataan emästä tai emäsparia ja niiden analysoimiseen käytetään polyakryyliamidigeelielektroforeesia (PAGE). Keskikokoiset nukleiinihappojaksot, 0,1–50 kb, analysoidaan käyttämällä agaroosigeelielektroforeesia (AGE). Suuret DNA- tai

RNA-molekyylit tai kokonaiset kromosomit, kooltaan alle 2 Mb, tutkitaan pulssikenttä-elektroforeesilla, jossa tekniikka perustuu useansuuntaisten sähkökenttien vuorottelevaan käyttöön. (Suominen – Ollikka 2006: 72.)

Agaroosigeelielektroforeesissa käytetään merilevästä eristettyä polysakkaridia. Agarosi liukenee veteen sitä kuumennettaessa ja jäähtyttyään siitä muodostuu geeli. Nukleiinihapot ovat fosfaattiryhmiensä ansiosta negatiivisesti varautuneita. Agarosigeelillä DNA tai RNA kulkevat sähkökentässä kohti positiivista napaa. Agarosigeelin verkkorakenteen vuoksi nukleiinihappojen kulkeutuminen hidastuu sitä enemmän, mitä suurempia ne ovat kooltaan. Lyhyemmät fragmentit kulkeutuvat geelillä näin olen nopeammin kuin suuret. Agarosigeelille muodostuu ajon aikana vyöhykkeitä eli bändejä, joiden perusteella erikokoiset DNA- tai RNA-jaksot ovat eroteltavissa toisistaan. DNA:n koon lisäksi geelin agarosipitoisuus vaikuttaa siihen, miten DNA kulkeutuu AGE:ssa. Yleisimmin geelin agarosipitoisuus on 0,4–2,0 %. Kun agarosigeelipitoisuus on suuri, DNA kulkeutuu hitaammin. Pienemmille fragmenteille on siis käytettävä tiheämpää geeliä kuin suuremmille fragmenteille. (Suominen – Ollikka 2006: 72; 75.)

Jotta DNA ja RNA saataisiin näkymään agarosigeelillä UV-valossa, on käytettävä nukleiinihappovärejä. Yleisin käytössä oleva yhdiste on etidiumbromidi (EtBr), joka sitoutuu nukleiinihappojen emästen väliin. UV-valossa emäkset imevät itseensä UV-säteitä saaden energiaa. Energia siirtyy etidiumille, joka tällöin fluoresoi oranssinpunaisena. Etidiumbromidi on kuitenkin mutageeninen eli eläville soluille myrkyllinen yhdiste. Etidiumbromidin sijasta voidaan käyttää nukleiinihappoväreinä esimerkiksi SYBR®:ia tai sen johdannaisia. (Suominen – Ollikka 2006: 72.) GelRed® ja GelGreen®-nukleiinihappovärit on todettu mutageenisuustesteissä turvallisimmiksi kuin EtBr ja sen hävittäminen on helpompaa. Lisäksi valmistaja lupaa sen olevan herkempi kuin EtBr tai SYBR®-Safe. Se myöskin kestää kuumuutta, joten se voidaan lisätä agarosigeeliin ilman geelin jäähtyttämistä. (Biotium 2013.)

Näytteeseen lisätään näytepuskuria tiheyden lisäämiseksi (esim. glyseroli) ja väriaineksi (esim. bromfenolisininen, BPB). Näin näytteestä saadaan ajopuskuria painavampaa, joten se pysyy geelin näytekoloissa. Väriaineen avulla voidaan seurata ajon edistymistä. BPB kulkeutuu samassa kohdassa ajon aikana kuin 300 emäsparin pituinen DNA-fragmentti. Geelielektroforeesissa käytetään näytteiden rinnalla kokostandardia. Kokostandardi on yleensä DNA:ta, joka on pilkottu yhdellä tai kahdella restriktioentsyymillä tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi. (Suominen ym. 2010: 124–125.)

Ennen ajon aloittamista on syytä huomioida johtimien oikeinasettelu, jotta negatiivisesti varautunut nukleinihappo kulkeutuisi kohti plusnapaa. Tavallisesti käytetään 20–200 V jännitettä riippuen muun muassa geelin koosta tai ajolaitteesta. (Suominen ym. 2010: 125.) Geeliä tarkastellaan reaaliajassa tähän tarkoitukseen suunnitellulla kuvantamislaitteella, johon on liitetty tietokoneohjelmisto. Laitteessa on valotiivis suljettu alue, joka sisältää sisäänrakennetun UV-valon ja valkoisen valon lähteen. Sen avulla saadaan dokumentoitua geelistä korkearesoluutioisia kuvia. (Bio-rad 2013: 17.)

4.3 Sekvensointi

Sekvensoinnilla saadaan selville DNA:n nukleotidijärjestys. Eniten käytetty sekvensointimenetelmä on Sangerin menetelmä (dideoksidimenetelmä). Menetelmää kutsutaan terminaatiomenetelmäksi ja siinä käytetään deoksinukleotidejä sekä dideoksinukleotidejä. Deoksinukleotideiltä puuttuu hydroksyyliiryhmä (-OH) 2'-asemasta (sokeriosan kaksohiili). Dideoksinukleotideillä ei ole hydroksyyliiryhmää 2'-aseman lisäksi 3'-asemassakaan. Juosteeseen lisättävän dideoksinukleotidin 5'-fosfaatin ja muodostuvan juosteen edellisen nukleotidin 3'-hydroksyyliiryhmän välille muodostuu fosfodiesterisidos DNA-polymeraasin avulla. Koska muodostuvaan juosteeseen on liittynyt dideoksinukleotidi, jolta puuttuu OH-ryhmä 3' asemasta, ei seuraava nukleotidi pysty sitoutumaan siihen. Tällöin synteesi päättyy eli terminoituu. (Suominen ym. 2010: 177–178.)

Menetelmässä eri dideoksinukleotidit on leimattu fluoresoivalla leimalla. Kaikki neljä reaktiota tapahtuvat samassa koeputkessa. Kapillaarielektroforeesilla erotellaan monistetut sekvensointituotteet. Laitteessa tunnistimena toimii laservalo, joka mittaa leimojen lähettämät fluoresenssivärit. Koska eri leimat säteilevät eri aallonpituuksilla, ne voidaan havaita eri väreinä. (Strachan – Read 2011: 218–219.) Tulos on saatavana digitaalisessa muodossa, graafisena tulosteena ja nukleotidisekvenssinä. Sekvensoinnit tehdään tavallisesti yliopistojen tai tutkimuslaitosten sekvensointipalveluissa tai kaupallisissa palveluyrityksissä. Sekvensoitava DNA lähetetään palveluun esimerkiksi dsDNA-PCR-tuotteena. Asiakas saa sekvenssidatan sekä graafisena että sekvenssitiedostona sähköisessä muodossa, jota voidaan käyttää erilaisissa sekvenssinkäsittelyohjelmissä. (Suominen ym. 2010: 179–181.)

4.4 Tietokantahaku

Biologiset tietokannat voidaan jakaa primäärisiin, sekundäärisiin ja erikoistuneisiin tietokantoihin niihin varastoidun tiedon sisällön mukaan. Kolme merkittävintä sekvenssitietokantaa ovat GenBank Amerikassa, the European Molecular Biology Laboratory/European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) Euroopassa ja DNA Data Bank of Japan (DDBJ) Japanissa. Niihin tallennetaan käsittelemättömiä nukleiinihapposekvenssejä, joita tutkijat tuottavat. Tietokannat ovat julkisia ja saatavilla internetistä. Näin voidaan varmistaa, että molekyylibiologian informaatio on kaikkien saatavilla. Tutkijan aiheestaan kirjoittaman artikkelin julkaisun edellytys on, että data tallennetaan tietokantaan. Tietokantoihin päivittyvät tiedot vaihdetaan tietokantojen kesken päivittäin. (Suominen ym. 2010: 213–214.)

Basic Local Alignment Search Tool (Blast), kuten esimerkiksi NCBI Blast, on sekvenssien analysointiohjelma. Ohjelman avulla tiettyä sekvenssiä voidaan verrata tietokannassa oleviin sekvensseihin ja tunnistaa tietokannasta sekvenssejä, jotka ovat samankaltaisia kyseisen sekvenssin kanssa. Ohjelman avulla yhtenäisiä sekvenssialueita rinnastetaan keskenään ja sekvenssialueiden samankaltaisuudet pisteytetään. Ohjelma käyttää tilastollista menetelmää sekvenssirinnastusten luotettavuuden arvioimiseen (eli määrittää niin sanotun E-arvon). E-arvolla saadaan poissuljettua tilastollinen sattuma. Kun E-arvo on pieni, niin sitä suuremmalla todennäköisyydellä rinnastukseen voidaan luottaa. E-arvon lisäksi ilmoitetaan bit score, joka perustuu pisteytysmatriisiin. Mitä suurempi bit score-arvo on, sitä todennäköisemmin rinnastukset ovat toisiaan vastaavia. Ohjelmassa tulos annetaan sekä graafisena yhteenvetona, jossa punainen väri merkitsee suurinta yhteensopivuutta, että luettelona samankaltaisista sekvensseistä sekä niiden saamista pisteytyksistä, E-arvoista ja sekvenssien samankaltaisuudesta (identtisten nukleotidien/aminohappojen lukumäärät ja prosentiosuudet). (Suominen ym. 2010: 224–227.)

5 Työn tavoitteet ja tarkoitus

Opinnäytetyön ensisijaisena tavoitteena oli tuottaa tietoa parechoviruksen esiintymisestä alle neljävuotiailla lapsilla. Toisena tavoitteena oli tuottaa tietoa Cepheid Xpert® EV-tes-

tin luotettavuudesta. Tavoitteena oli lisäksi lisätä tietämystä parecho- ja enterovirusinfektioita aiheuttaneesta virustyypeistä. Tulosten perusteella voidaan saada muun muassa parempi käsitys parechoviruksen esiintymisestä lasten virusinfektioissa sekä eri virustyyppien esiintymisestä ja niiden aiheuttamista oirekuvista. Tiedon avulla voidaan oppia tunnistamaan millaisiin oirekuviin esimerkiksi parechovirusinfektiot liittyvät ja näin ollen tuoda lisäinformaatiota myös klinikon käyttöön. Parechovirusinfektiot ovat pienillä lapsilla sairaalaan johtavien keskushermostoinfektioiden aiheuttajia enterovirusinfektioiden ohella (Harvala – Simmonds 2009: 6; Pallansch – Roos 2001: 751). Kliinikot voisivat tietäessään taudinaiheuttajan diagnosoida infektion parechoviruksen aiheuttamaksi ja potilaan hoidosta tulisi spesifimpää. Parecho- ja enterovirusinfektioiden hoito on oireenmukaista eikä niihin ole lääkehoitoa. Tunnistamalla taudinaiheuttaja mahdollisilta turhilta antibioottihoidoilta voitaisiin välttyä. Myös taudin oireet että eteneminen olisi helpompi ennakoita. (Luoto ym. 2014: 2074–2076.)

Käytimme työssämme tutkimuskysymyksiä, joiden avulla pyrimme saavuttamaan työmme tavoitteet. Ensimmäinen, tärkein tutkimuskysymys oli, **löytyykö aiemmin enterovirusnegatiivisiksi todetuista näytteistä parecho- tai enterovirusta ja mitä ne ovat tyypeiltään**. Toinen tutkimuskysymyksemme oli, **mitä parecho- tai enterovirustyyppiä löytyy aiemmin positiivisiksi todetuista näytteistä**.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää seerumi- ja selkäydinnestenäytteistä (n=90) parechoviruksen olemassaolo reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä. Tutkittavat seerumi- ja selkäydinnestenäytteet olivat peräisin alle 4-vuotiailta lapsilta ja ne oli otettu vuosien 2013–2014 aikana. Näytteet oli aiemmin HUSLABissa todettu enterovirusnegatiiviksi Cepheid Xpert® EV-testillä. Parechovirusta ei näistä näytteistä oltu vielä tutkittu. Selvitimme nyt kuitenkin näytteistä uudelleen myös enteroviruksen olemassaolon, koska halusimme varmistaa Xpert® EV-testin luotettavuutta. Enteroviruksen määrittäminen tehtiin samanaikaisesti parechovirusmäärityksen kanssa reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä, jossa käytettiin niin sanottua multiplex-menetelmää. Positiivisiksi todetut näytteet oli tarkoitus vielä tyyppittää.

Aiemmin HUSLABissa parecho- tai enteroviruspositiivisiksi todetuista näytteistä (n=24) oli tarkoitus selvittää virustyyppit. Näytteet olivat kaikenikäisiltä henkilöiltä vuosilta 2013–2014. Näytteistä suurin osa oli seerumia ja selkäydinnestettä, mutta mukana oli myös rakkula- ja nieluieritenäytteitä. Tämä suoritettiin monistamalla viruskantojen tyyppitykseen

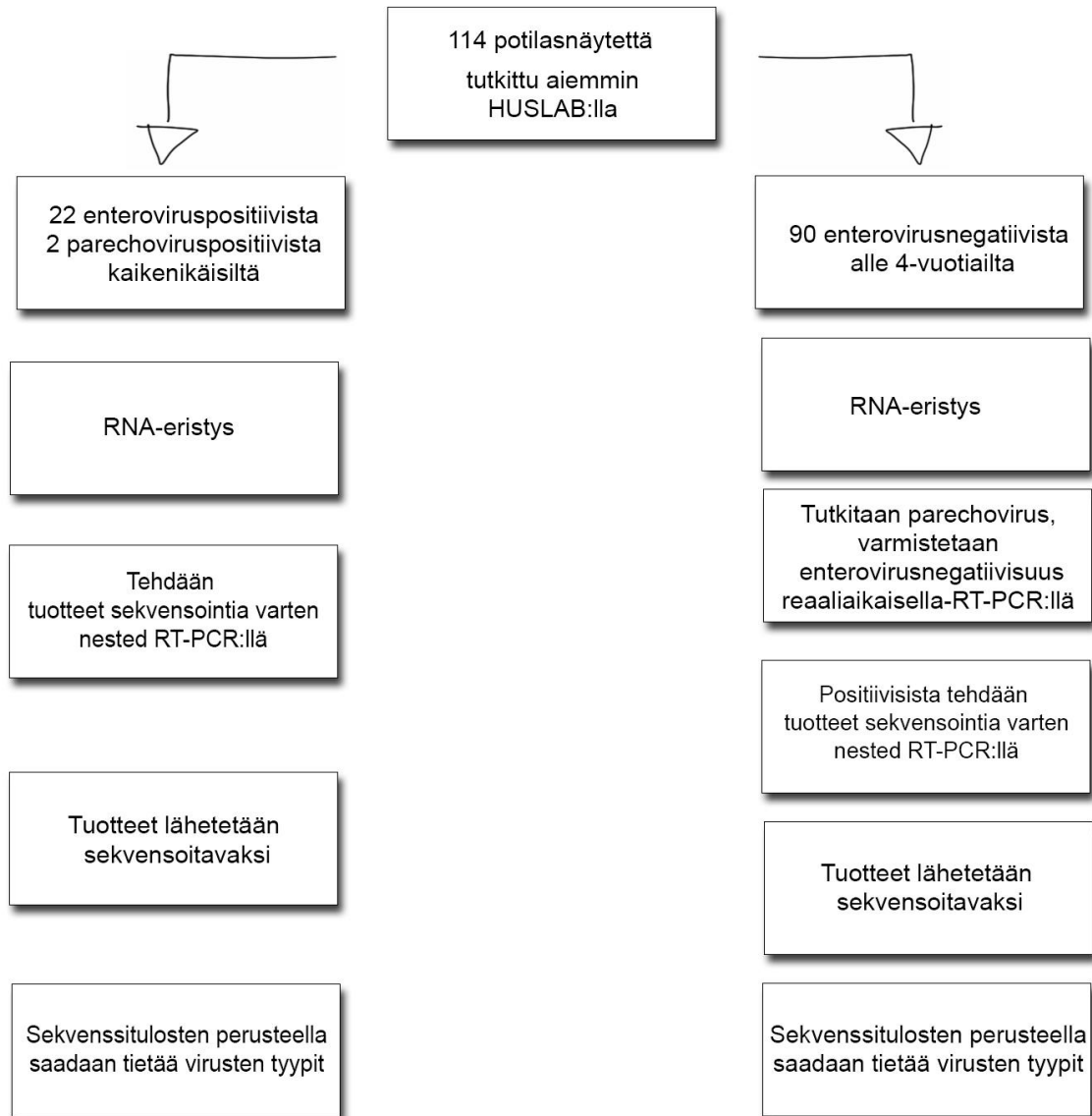
käytettävä genomialue nested-RT-PCR:llä. Nämä tuotteet sekvensoitiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa. Sekvenssitulosten perusteella virustyyppi määritettiin genomipankkien avulla.

6 Työn suoritus

Suoritimme työn empiirisen osan Helsingin yliopiston Haartman Instituutin virologian osastolla. Työn toteutuksessa meitä ohjasivat dosentti, FT Anne Jääskeläinen ja FT Teemu Smura. Työ kaikkine vaiheineen kesti kuukauden verran alkuperehdyksestä sekvenssitulosten käsittelyyn.

6.1 Näytteiden esikäsittely

Saimme näytemateriaalin (ks. kuvio 6), joka sisälsi negatiiviset ja positiiviset potilasnäytteet. Aikaisemmin enterovirusnegatiivisiksi todetut näytteet olivat seerumi- ja selkäydinnesteenäytteitä. Näistä valikoimme alle neljä vuotiaiden näytteet. Aikaisemmin parecho- ja enteroviruspositiivisiksi todetut näytteet olivat selkäydinnestettä, seerumia sekä rakula- ja nielu-eritettä ja ne olivat kaikenikäisiltä potilailta. Näytteet olivat vuosilta 2013–2014 ja niitä oli säilytetty -20 asteessa.



Kuvio 6. Suoritusprosessin eteneminen.

Kirjasimme näytteistä tarvitsemamme tiedot; näytteenumeron, näytelaadun, syntymäajan (kk/vvvv), näytteenottoajan (kk/vvvv) sekä sukupuolen. Näyttenumero pidettiin anonyyminä potilastietosuojan vuoksi. Näytteitä käsiteltiin näytteidenkäsittelylaboratoriossa vetokaapissa. Suojasimme näytteitä pitämällä niitä kuiva- eli hiilihappojäällä välttämällä näin näytteen sulamisen ja siten mahdollisen ribonukleiinihappojen hajoamisen.

Pipetoimme näytteistä alikvaatit yhden ml:n eppendorf-putkiin. Pyrimme saamaan näytettä 200 µl, mutta osassa näytteitä jäljellä oli enää pienempi määrä, joten saimme näytettä vain 100 µl tai 50 µl. Merkitsimme eppendorf-putkiin näyttenumerot ja näyttemäärän.

Käsittelimme näytteitä aseptisesti käyttämällä imupaperia näyteputken avaamisessa. Näin välttyimme mahdollisilta näyteroiskeilta ja kontaminaatioilta. Säilöimme näytealiquaattit -70 asteeseen pakastimeen odottamaan eristämisvaihetta.

6.2 RNA-eristys

Ennen PCR-monistusta tai sekvensointia RNA pitää eristää potilasnäytteistä (Suominen ym. 2010: 103). RNA-eristykset suoritimme laboratorion näytteidenkäsittelytilassa. Aloitimme työn puhdistamalla vetokaapin ja pipetit etanolilla sekä suojaamalla työtason Me-kaasoft-imuliinilla. Käytimme suodattimellisia pipetinkärkiä.

Käytimme RNA-eristykseen QIAmp Viral RNA Mini-käsikittimenetelmää. Tuotepaketti sisältää QIAmp Mini Spin pylväitä, keräysputkia, AVL-hajotuspuskurin, pesupuskurit (AW1 ja AW2) ja AVE-eluoointipuskurin sekä Carrier RNA:n, jota emme käyttäneet eristämässä, koska RNA:ta olisi näytteissä riittävä määrä. (Qiagen 2010: 7; 4.)

Näytteet olivat olleet pakastettuina -70 asteessa ja ne oli sulatettava ennen käsittelyä. Hajotusliuos tehtiin kahden ml:n eppendorf-putkeen lisäämällä 800 µl AVL-puskuria ja 200 µl näytettä. Mikäli näytettä oli pienempi määrä, 100 µl tai 50 µl, AVL-puskuria tuli liuokseen suhteessa vähemmän. Liuosta sekoitettiin Vortex-laitteella pulsoivasti 15 sekunnin ajan ja inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Etanolia (100 %) lisättiin liuokseen näytemäärän mukaan 800 µl tai 560 µl ja liuos sekoitettiin jälleen Vortex-laitteella pulsoivasti.

Putkien nimeämisen jälkeen pipetoimme niihin näyteliuosta ja sentrifugoimme putket 8000 rpm minuutin ajan, jolloin RNA sitoutui silikapylvääseen. Tämä vaihe toistui niin kauan, että kaikki näyteliuos saatiin vietyä silikapylvään läpi. Silikapylväitä pestiin AW1- ja AW2-pesupuskureilla, jotta epäpuhtaudet saatiin irtoamaan silikasta. Pesu tapahtui sentrifugoimalla puskureita silikalvon läpi, AW1 8000 rpm minuutin ajan ja AW2 täydellä rpm-teholla kolmen minuutin ajan. AVE-puskurin avulla silikapylvääseen sitoutunut RNA eluoitoin 1,5 ml:n eppendorf-putkeen. AVE-puskuria käytettiin näytemäärästä riippuen 50 µl tai 30 µl. RNA-tuote siirrettiin -70 asteeseen. Vetokaappi ja välineet tuli puhdistaa etanolilla käytön jälkeen. Lisäksi UV-valo jätettiin palamaan mahdollisten mikrobien ja kontaminanttien tuhoamiseksi.

6.3 Reaaliaikainen RT-PCR

Reaaliaikaisen RT-PCR:n reaktioliuokset valmistettiin laboratorion puhdastilassa. Puhdastilan välitilassa pukeuduimme suojatakkiin, hius- ja kenkäsuojiin sekä suojakäsineisiin. Puhdastilassa lisäsimme vielä toiset suojakäsineet. Työtila ja välineet tuli puhdistaa etanolilla. UV-valo on ajastettu palaamaan yön ajan.

Reaktioseosta varten valmistimme alukkeista ja koettimista 10 µM käyttöliuokset. Reaktioseos valmistettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkeen. Työskentelyn ajan reaktioseoksen reagensseja tuli pitää jääblokilla. Käyttämämme menetelmä oli niin sanottu multiplex-menetelmä, jolloin parecho- ja enterovirus saadaan määritettyä yhtäaikaaisesti. Reaktioseos sisältää 2X Mastermix:n, HPEV-FW1- ja HPEV-RV1-alukkeet sekä HPEV-Probe1 FAM-koettimen parechoviruksille, EQ-1- ja EQ-2-alukkeet sekä EV-Probe1 VIC-koettimen enteroviruksille. Lisäksi seokseen tulee referenssiväri ROX, nukleaasitonta vettä ja SuperScript® III RT-käänteiskopioijaentsyymiä ja Platinum® Taq Mix-DNA-polymeraasia (ks. liite 1). Reaktioseosta pipetoitiin 18 µl kuhunkin PCR-striippiin. (Kolehmainen ym. 2014: 1110.) PCR:ssä käytettävistä muovisista putkista käytetään yleisesti suomenkielissä sanaa strippi.

PCR-stripit kuljetettiin jäällä näytteenkäsittelylaboratorioon, jossa lisäsimme 7 µl templaattia reaktioseokseen laminaarikaapissa. Templaattina reaaliaikaisessa RT-PCR:ssa käytimme aiemmin enterovirusnegatiiviksi todettujen näytteiden RNA:ta. Negatiivisena kontrollina käytimme vettä ja positiivisena kontrollina parecho- ja enteroviruspositiivisia näytteitä. (Kolehmainen ym. 2014: 1110.)

Templaatin lisäyksen jälkeen stripit sentrifugoitiin kevyesti ja asetettiin PCR-laitteeseen. PCR-ohjelma (ks. liite 2) kesti alle kaksi tuntia, jonka jälkeen luimme tulokset (ks. liite 3). (Kolehmainen ym. 2014: 1110.) Tarkistimme, että käyttämämme negatiivinen kontrolli oli jäänyt negatiiviseksi ja positiivinen kontrolli tullut positiiviseksi (ks. liite 3).

6.4 Sekvensointia varten valmistettavat PCR-tuotteet

Aiemmin parecho- ja enteroviruspositiivisiksi todetuista seerumi-, selkäydinneste- ja erinäytteistä valmistettiin PCR-tuotteet sekvensointia varten monistamalla genomien VP1- aluetta tai sen osaa. Tuotteet valmistettiin nested-RT-PCR:llä ja agarosigeelielektroforeesilla todennettiin tuotteen monistuminen.

6.4.1 Nested-RT-PCR

Nested-RT-PCR:n reaktioseokset valmistettiin reaaliaikaisen RT-PCR:n tapaan laboratorion puhdistilassa. Reaktioseosta varten teimme 10 µM käyttöliuokset alukkeista. Enteroviruksille on kaksi eri reaktiota, A- ja B-reaktiot, kun parechoviruksille on käytössä vain yksi reaktio. A- ja B-reaktioissa on eri alukkeet enterovirusten erilaisuuden vuoksi.

Nested-RT-PCR:n ensimmäisen kierroksen A- ja B-reaktioseokset enteroviruksille sisältävät 2X Reaction mix, EV-A-OAS- (OAS = outer anti-sense) ja EV-A-OS (OS = outer sense) -alukkeet (A-reaktio) ja EV-B-OAS- ja EV-B-OS-alukkeet (B-reaktio) ja SuperScript® III RT ja Platinum® Taq Mix-entsyymit. Nested-RT-PCR:n ensimmäisen kierroksen reaktioseos parechoviruksille sisältävät muuten samat reagenssit, mutta alukkeina on Parecho-VP3/VP1-OAS ja Parecho-VP3/VP1-OS (ks. liite 4).

Reaktioseosta pipetoitiin 14,5 µl kuhunkin PCR-strippiin. Näytteenkäsittelylaboratoriossa lisäsimme 10,5 µl templaattia reaktioseokseen puhdistetussa laminaarikaapissa. Tempplaattina käytimme eristettyä RNA:ta. Negatiivisena kontrollina käytimme vettä ja positiivisena kontrollina joko parecho- tai enteroviruspositiivisia näytteitä. Tempplaatin lisäyksen jälkeen stripit sentrifugoitiin kevyesti ja asetettiin PCR-laitteeseen. Ohjelma (ks. liite 5) kesti useita tunteja, jonka jälkeen teimme agarosigeelielektroforeesiajon. PCR-tuotteet säilytettiin jääkaappilämpötilassa.

Agarosigeelielektroforeesiajossa negatiivisiksi todetuista tuotteista tehtiin nested-RT-PCR:n toinen kierros. Toisessa kierroksessa käytetään inner-alukkeita. Alukkeet sitoutuvat ensimmäistä kierroksesta saatujen tuotteiden sisäpuolelle, joten templaattina toimii ensimmäisen kierroksen PCR-tuote. Reaktioseoksessa on enteroviruksille A-reaktiossa EV-A-IAS- (inner anti-sense) ja EV-A-IS (inner sense) -alukkeet ja B-reaktiossa EV-B-IAS- ja EV-B-IS-alukkeet. Parechoviruksille Parecho-VP3/VP1-IAS- ja Parecho-VP3/VP1-IS-alukkeet. Entsyymien sijasta seokseen lisätään nukleasitonta vettä, koska

templaatti sisältää jo käänteiskopioijaentsyymin ja polymeraasin (ks. liite 6). Negatiivisena ja positiivisena kontrollina käytimme ensimmäisen kierroksen negatiivista ja positiivista kontrollia. PCR-ohjelman (ks. liite 7) jälkeen teimme ensimmäisen kierroksen tapaan agarosigeelielektroforeesiajon.

6.4.2 Agarosigeelielektroforeesi

Valmistimme AGE:a varten 1 % agarosigeelin. Mittasimme yläkuppivaa'alla mittapulloon 1 g agarosijauhetta ja 100 ml TAE-puskuria. Liuos kiehautettiin mikroaaltouunissa kirkkaaksi ja siihen lisättiin 8 µl GelRed®-nukleiinihappoväriä. GelRed® kestää kuumuutta, joten geeliliuosta ei tarvinnut jäähdyttää.

Valoimme agarosigeelin kelkalle ja valitsimme siihen sopivat näytekammat. Huomioimme näytemäärän suunnitellessamme geelin kokoa ja näytekaivojen määrää. Geelin jäähdytyä väriltään maitomaiseksi näytekammat poistettiin. Lisäsimme ajolaitteeseen TAE-ajopuskuria. Puskuria lisättiin sen verran, että geeli peittyi sen alle juuri ja juuri.

Käytimme DNA-kokostandardina GeneRuler 1kb DNA Ladder-liuosta. Sen avulla on mahdollista määrittää 250–10000 emäsparin kokoisten tuotteiden pituus. Kokostandardia pipetoitiin 5 µl geelin alkuun ja loppuun. Näytepuskuri pipetoitiin 2 µl:n tipoiksi Parafilm-muoville, jossa 5 µl näytettä sekoitettiin näytepuskuritippoihin pipetin avulla. Samoin tavoin valmistimme myös negatiiviset ja positiiviset kontrollit. Muodostunut 7 µl:n liuos pipetoitiin näytekaivoihin. Näytejärjestys kirjattiin paperille ylös. Tämän avulla pystyimme pitämään kirjaa tutkituista näytteistä.

Näytteiden lisäämisen jälkeen ajolaite käynnistettiin ja johtimet asetettiin virtalähteeseen huomioiden niiden oikea napaisuus. Käytimme ajoissa 90 voltin jännitettä. Kun näytepuskuri oli ajautunut riittävän pitkälle, voitiin ajo lopettaa.

Geeli siirrettiin tarkastelua varten UV-laitteeseen. Katsoimme geelikuvalla (ks. liite 8, liite 9), oliko positiivinen kontrolli tullut positiiviseksi ja negatiivinen jäänyt negatiiviseksi. Oikean kokoiset monistuneet tuotteet havaittiin geelikuvalla verraten tuotetta kokostandardiin. Vertaamalla monistunutta tuotetta kokostandardiin saimme tietää tuotteen koon.

Ensimmäisen kierroksen tuotteet olivat kooltaan noin 1000 emäsparia ja toisen kierroksen tuotteet noin 500 emäsparia pitkiä. PCR-tuotteet lähetimme alukekäyttöliuoksien kanssa Helsingin yliopiston Biotekniikan instituuttiin sekvensoitavaksi.

6.5 Virustyyppitys

Sekvenssitulokset tulivat sähköisessä muodossa, sekä graafisena- että sekvenssitiedostona Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutista. Seurasimme, kun ohjaajamme suorittivat virusten tyyppittämisen Blast-ohjelman avulla. Sekvenssin alussa ja lopussa oleva huonosti sekvensoitunut alue poistettiin ennen tyyppistystä. Sekvensoitu tuote oli DNA:ta ja sen kummatkin juosteet oli sekvensoitu 5'-3'-suuntaisesti. Juosteiden sekvenssit kohdennettiin komplementaarisesti paikoilleen. Sekvenssijärjestys kopioitiin ja liitettiin ohjelmassa sille varattuun kenttään. Ohjelma antoi vastaavuudet paremmuusjärjestyksessä. Analysoimalla saimme tietää virustyyppit.

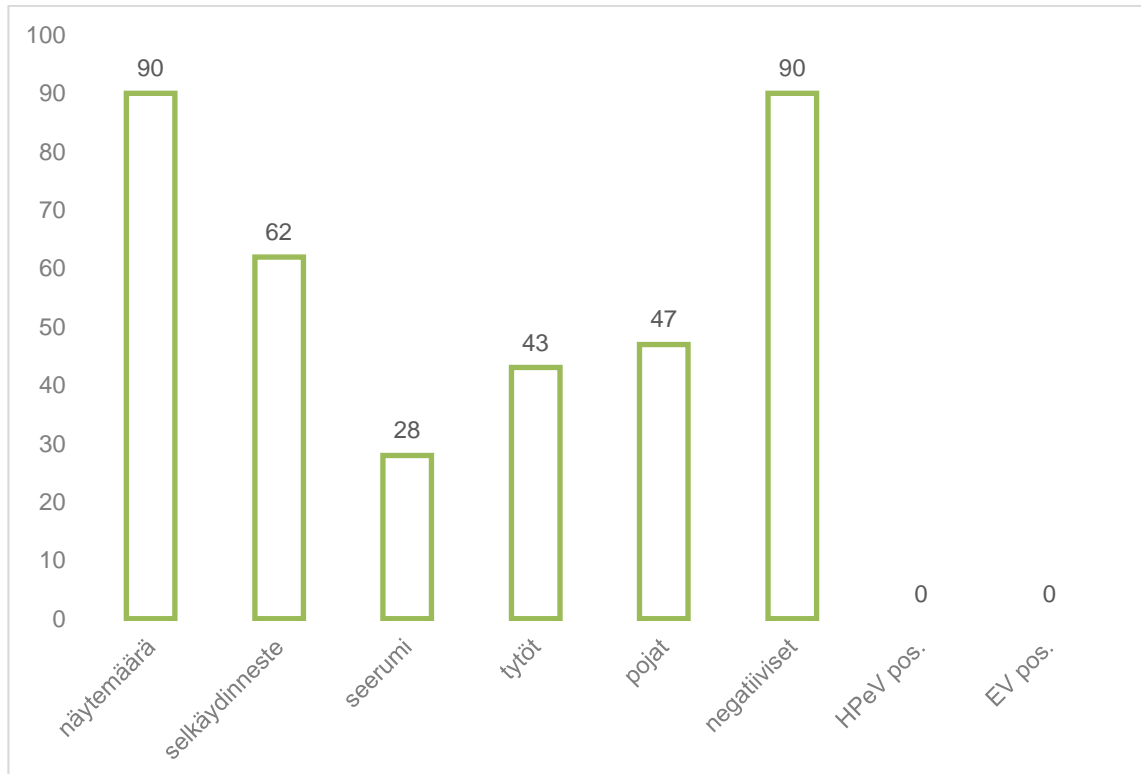
7 Tulokset

Opinnäytetyömme tarkoitus oli selvittää löytyykö aiemmin HUSLABissa enterovirusnegatiivisiksi todetuista seerumi- ja selkäydinnestenäytteistä parechovirusta. Parechoviruksen lisäksi tarkoituksena oli tarkentaa näistä samoista näytteistä aiempaa negatiivista enterovirustulosta. Tällä selvitettiin HUSLABin Xpert® EV-testin luotettavuutta. Mikäli parecho- ja enterovirusta näytteistä löytyisi, oli ne tarkoitus tyyppittää. Lisäksi tarkoituksemme oli tyyppittää aiemmin HUSLABissa parecho- ja enteroviruspositiiviksi todetut selkäydinneste-, rakkula-, seerumi- ja nielueritenäytteet.

7.1 Parecho- ja enterovirusten osoittaminen sekä löydösten tyyppitys

Aiemmin enterovirusnegatiiviksi todetut näytteet olivat maaliskuulta 2013 vuoden 2014 syyskuuhun asti otettuja seerumi- ja selkäydinnestenäytteitä. Tutkittavaksi näytteiksi valitsimme alle neljävuotiaiden näytteet, koska tutkimuksessa haluttiin etsiä juuri pienten

lasten mahdollisia parechovirustartuntoja. Kaikki näytteemme olivat aiemmin HUSLA-Bissa Cepheid Xpert® EV-testillä enterovirusnegatiivisiksi todettuja. Näytteitä oli 90 kappaletta, joista selkäydinnestenäytteitä 62 kappaletta ja seeruminäytteitä 28 kappaletta. Tyttöjen näytteitä oli 43 kappaletta ja poikien 47 kappaletta (ks. kuvio 7).

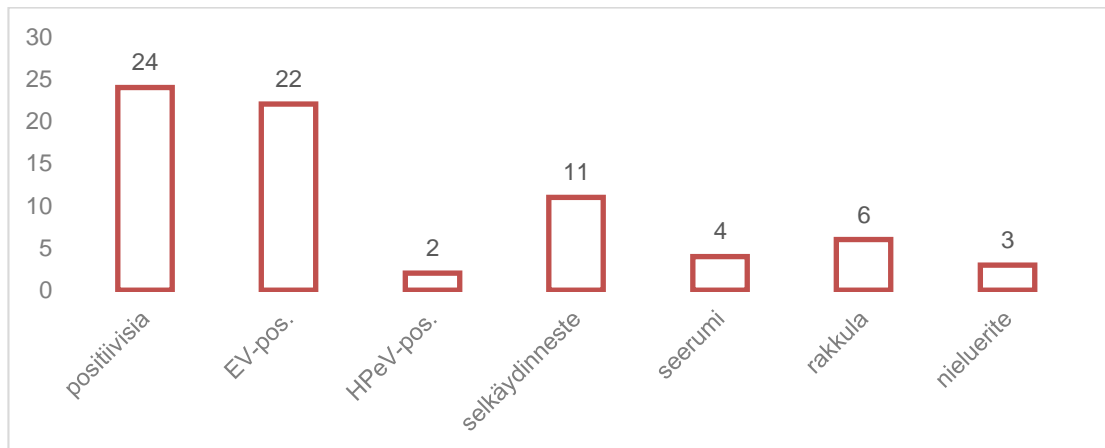


Kuvio 7. Aiemmin enterovirusnegatiivisiksi todettujen näytteiden jakauma ja reaaliaikainen RT-PCR-tulos. HPeV pos. = Human parechovirus positiiviset näytteet. EV pos. = Enterovirus positiiviset näytteet.

Tutkimme nämä näytteet reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä, kuten aiemmin (ks. luku 6.3) kerromme. Kaikki aiemmin enterovirusnegatiiviksi todetut näytteet olivat parecho- ja enterovirusnegatiivisia opinnäytetyössämme käyttämällämme menetelmällä (ks. liite 3).

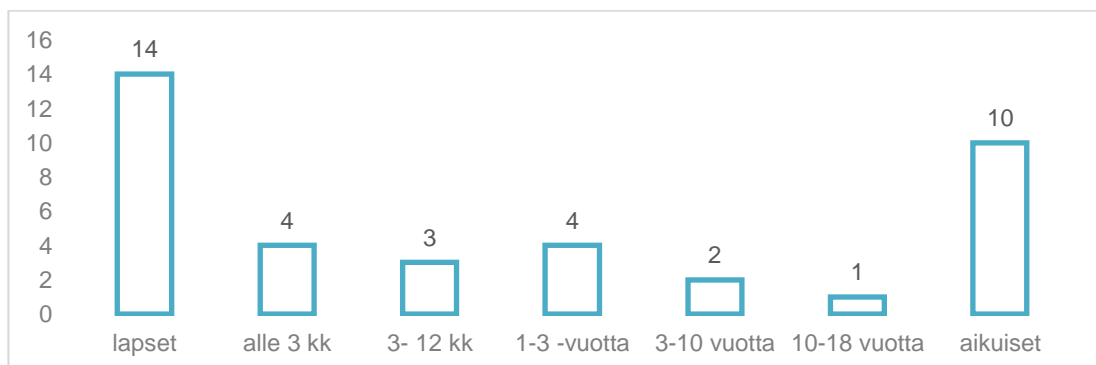
7.2 Aiemmin parecho- ja enteroviruspositiiviksi todettujen näytteiden tyyppitys

HUSLABissa aikaisemmin parecho- ja enteroviruspositiiviksi todettuja näytteitä oli yhteensä 24 kappaletta. Saimme virustyyppit 21 näytteestä (87,5 %). Parechoviruspositiivisia oli kaksi ja enteroviruspositiivisia 22. Suurin osa näytteistä oli selkäydinnestenäytteitä, mutta mukana oli myös seerumi-, rakkula- ja nieluieritenäytteitä (ks. kuvio 8). Näytteet oli otettu helmikuun 2013 ja lokakuun 2014 välisenä aikana.



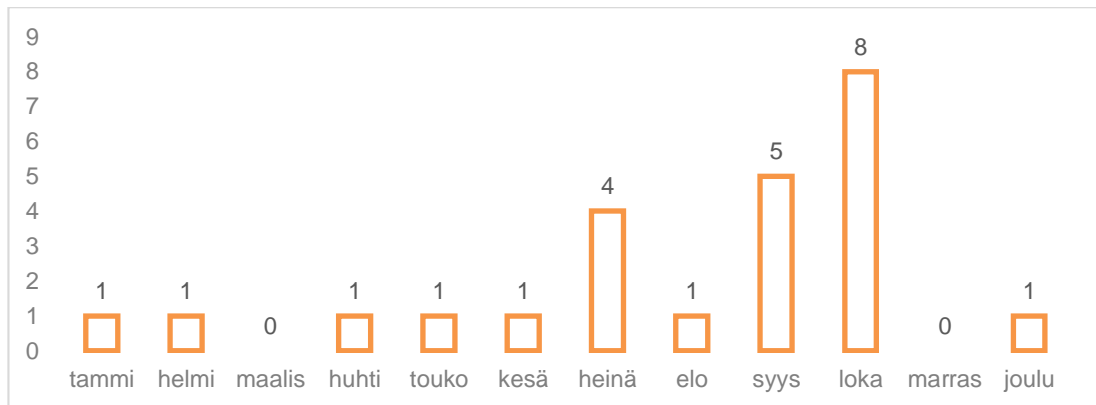
Kuvio 8. Parecho- ja enteroviruspositiivisten näytteiden näytelaatu ja jakauma. HPeV pos. = Human parechovirus positiiviset näytteet. EV pos. = Enterovirus positiiviset näytteet.

Parecho- tai enteroviruspositiivisia näytteitä oli miehillä 13 ja naisilla 11. Lapsia näistä oli 14. Alle kolme vuotiailla parecho- ja enteroviruspositiivisia näytteitä esiintyi 11 lapsella, joista alle kolmen kuukauden ikäisiä oli neljä. Kolmesta vuodesta aikuisikään asti esiintyi viruksia enää kolmella lapsella. Aikuisten positiivisten näytteiden määrä oli kymmenen (ks. kuvio 9).



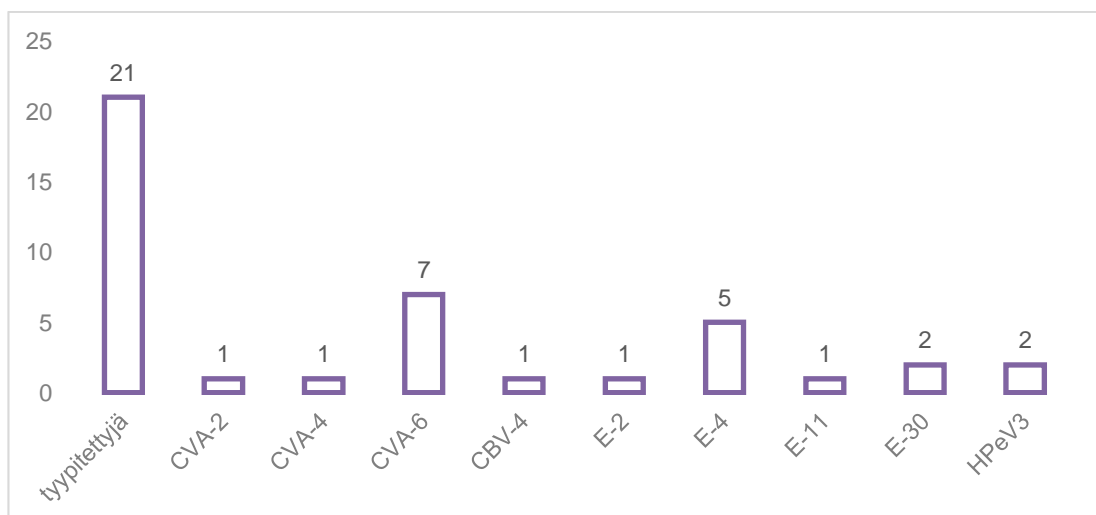
Kuvio 9. Parecho- ja enteroviruspositiivisten näytteiden ikäjakauma.

Suurin osa positiivisista näytteistä oli lokakuulta. Positiiviset näytteet olivat muutenkin kesä-syysy painotteisia. Maaliskuussa tai marraskuussa ei esiintynyt parecho- tai enterovirusinfektioita. Parechovirusta löytyi lokakuussa otetuista näytteistä (ks. kuvio 10).



Kuvio 10. Parecho- ja enterovirusten esiintyminen eri kuukausina.

Parecho- ja enteroviruspositiivisista näytteistä saimme virustyyppit 21 näytteestä (ks. kuvio 11), joista kaksi oli parechovirusinfektioita sairastaneet lapset olivat yksi- ja kaksikuisia poikia. Kummatkin parechovirukset olivat seerumista ja tyypiltään HPeV3.



Kuvio 11. Parecho- ja enterovirustyytit. Enterovirus A-lajin tyytit: coxsackievirus A2 (CVA-2), CVA-4 ja CVA-6. Enterovirus B-lajin tyytit: CBV-4, echovirus 2 (E-2), E-4, E-11 ja E-30. Human parechovirus-lajin tyyppi: HPeV3.

Enterovirusia saimme tyytitettyä 19 näytteestä. Kolmea enteroviruspositiivista näytettä emme saaneet tyytitettyä. Enterovirustyypeistä eniten esiintyi coxsackievirus A6-tyyppiä (CVA-6). Seitsemän näytettä sisälsi tätä enterovirustyyppiä. Kahdessa näytteessä oli muita enterovirus A-lajin tyyppejä (CVA-2 ja CVA-4). Enterovirus B-lajin tyyppejä olivat coxsackievirus B4 (CBV-4), echovirus 2 (E-2), E-4, E-11 ja E-30. CBV-4, E-2 ja E-11 löytyi kutakin yhdestä näytteestä ja E-30 kahdesta näytteestä. E-4 esiintyi viidessä näytteessä.

Enteroviruspositiivisia näytteitä oli 12 lapsella ja kymmenellä aikuisella. Yhdeksän lapsen ja kymmenen aikuisen näytteistä saimme tyytitettyä virukset. Kolmen lapsen näytteestä emme saaneet virustyyppejä. CVA-6-virustyyppi oli pääosin rakkulanäytteistä sekä lisäksi seerumi- ja nielueroitenäytteistä. CVA-6-infektioit esiintyivät syyspainotteisesti ja niitä tavattiin niin lapsilla kuin aikuisillakin. Muita enterovirus A-lajin tyyppejä (CVA-2 ja CVA-4) esiintyi lapsilla rakkula- ja nielunäytteissä. Enterovirus B-lajin tyytit CBV-4 ja E-11 löytyivät selkäydinnesteestä kuukauden ikäisiltä. Neljän nuoren aikuisen ja yhden lapsen selkäydinnestenäyte sisälsi E-4-virustyyppiä. E-4-infektioita esiintyi kesä-syysy painotteisesti. Muut enterovirus B-lajin tyytit (E-2 ja E-30) löytyivät selkäydinnestenäytteistä lapsilta ja aikuisilta.

8 Luotettavuuden arviointi

Luotettavuutta tarkastelemme työvaiheiden kautta. Ennen varsinaista käytännöntyötä saimme työelämänohjaajilta kattavan alkuperähdytyksen, jonka avulla saimme käsityksen työvaiheista ja laboratoriotoiminnasta. Perehdytys mahdollisti jatkossa itsenäisen työskentelyn omalla aikataulutuksella. Saavutimme laadukkaan työn ja sille asetetut tavoitteet, noudattaen tarkasti ohjeita ja aseptiikkaa jokaisessa työvaiheessa.

Aloitimme työskentelyn aina puhdastilalaboratoriosta. Näytteenkäsittelyhuoneesta eli niin sanotusta likaisesta tilasta, emme enää siirtyneet saman päivän aikana puhtaaseen

tilaan. Tällä tavalla poissuljimme kontaminaatoriskit näytteiden välillä. Kontaminaatioiden vähentämiseksi suojauduimme suojatakkeihin ja -käsineisiin. Ennen töiden aloitusta puhdistimme käytettävät välineet ja tilat. Näytteitä käsitelimme varoen, erityisesti positiiviset ja negatiiviset näytteet suoritimme eri aikoina. Näyteputket avasimme yksitellen imupaperia käyttäen välttääksemme roiskeet. Varmistimme reagenssien voimassaolo-päivämäärät. Käytössämme oli kalibroidut ja toimivat pipetit, joten pipetointivirheet oli näiltä osin poissuljettu. Otimme huomioon hyvän pipetointitekniikan. Käytön jälkeen puhdistimme välineistön ja varmistimme mikrobien tuhoamisen UV-valoa käyttäen. Näytteet säilytimme pakastimissa niille varatuissa paikoissa. Positiiviset ja negatiiviset näytteet olivat eri näytelaatikoissa sekaannuksien välttämiseksi. Sulatimme näytteitä ainoastaan niiden varsinaisessa käsittelyssä. Näytteiden keräyksen suoritimme jäillä.

Käytimme negatiivisia ja positiivisia kontrollinäytteitä PCR- ja geielektroforeesityöskentelyssämme. Kirjasimme näytetiedot ylös huolellisesti ja tarkistimme kirjauksien ja näyteputkien yhteneväisyydet. Näytteitä käsiteltäessä näytteiden numerointi tuli olla pysyvää. Analysoimamme näytteet olivat oikeita potilasnäytteitä, joten käsitelimme niitä anonyymisti. Potilaiden tunnistustiedot korvattiin ohjelmoidusti, joten potilasnäytteet pysyivät tunnistamattomina. Noudatimme vaitiolovelvollisuutta.

Työskentelimme tilanteesta riippuen sekä yhdessä että erikseen. Yhdessä työskentely mahdollisti toistemme työtapojen tarkkailun. Tällä tavoin pystyimme kontrolloimaan virheitä. Eriksen työskentely vaati omien työtapojen tarkkailua ja varmuutta omaa työskentelyä kohtaan. Epäselvissä tilanteissa kysyimme neuvoa ohjaajiltamme.

Tavoitteena oli tuottaa tietoa Cepheid Xpert® EV-laitteen luottavuudesta, tutkimalla tällä laitteella enterovirusnegatiivisiksi todetut näytteet uudelleen reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä. Cepheid Xpert® EV-laitteen luotettavuus mitattiin niin, että saman näytteen tutki eri henkilöt eri laitteella eri aikana.

9 Pohdinta

Opinnäytetyömme oli selvästi rajattu. Alun perin tarkoituksenamme oli tutkia parechovirusen esiintyvyyttä vain vastasyntyneiden selkäydinnestenäytteistä. Otos olisi jäänyt näin ollen suppeaksi, joten otimme tutkittavaksi kaikki alle neljä vuotiaiden näytteet sekä

selkäydinnestenäytteiden lisäksi seeruminäytteet. Näin saimme otoskooksi 90 näytettä. Tutkimuksissa, Wolthers ym. (2008: 359); Harvala ym. (2009: 1753); Benschop ym. (2007: 73), joita käsittelemme aiemmin (ks. luku 2.4), on ollut tutkittavana useita satoja näytteitä pidemmältä ajanjaksolta. Opinnäytetyömme otos oli näihin tutkimuksiin nähden pieni. Tosin suomalaisessa tutkimuksessa, Kolehmainen ym. (2014: 1110), otoskoko (n=85) on ollut pienempi, mutta parechoviruksen esiintyminen on ollut korkea (8,2 %). Aiemmissa tutkimuksissa parechovirusesiintyvyys on ollut vaihtelevaa, alle prosentista aina yli kahdeksaan prosenttiin. Tutkimuksessa, Harvala ym. (2009: 1755), todetaan parechoviruksen esiintyvän vaihtelevasti vuosien aikana, joten tämäkin on otettava huomioon arvioitaessa tuloksia. Opinnäytetyössämme suuremman otoksen tutkiminen olisi vaatinut enemmän aikaa ja se olisi saattanut olla opinnäytetyöksi liian laaja. Koimme otoksen tarpeeksi kattavaksi opinnäytetyöhön.

Työn ensisijainen tarkoitus oli selvittää parecho- ja enterovirusten esiintyminen reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä. Koimme yllättävänä, ettemme löytäneet yhtään parechovirusta tutkimistamme näytteistä (n=90). Reaaliaikaisella RT-PCR menetelmällä tutkimme uudelleen aiemmin enterovirusnegatiivisista näytteistä enteroviruksen olemassaolon, koska varmistimme Cepheid Xpert® EV-testin luotettavuutta. Käyttämällämme menetelmällä emme löytäneet yhtään enteroviruspositiivista näytettä, joten tämän mukaan HUSLABin käyttämä kaupallinen Xpert® EV-testi on antanut oikean tuloksen.

Tarkoituksenamme oli myös tutkia aiemmin parecho- ja enteroviruspositiiviksi todetuista näytteistä virustyyppit. Valitsimme tähän otokseen selkäydinneste- ja seeruminäytteiden lisäksi myös eritenäytteitä, jotka oli otettu kaikenikäisiltä potilailta. Oteroskosta tuli näin 24 näytettä. Tuloksissa enterovirukset nousivat esille parechovirusia enemmän. Saimme virustyyppit lähes 90 prosentista viruksista, jota voidaan pitää hyvänä tuloksena. Kuten toteamme kertoessamme aikaisemmasta tutkimuksesta, McWilliam Leitch ym. (2008: 122), ei tyypittäminen aina onnistu sata prosenttisesti. Itse saimme tyypitettyä 79 prosenttia viruksista. Emme onnistuneet monistamaan nested-RT-PCR:llä parechovirusta. Nested-RT-PCR parechoviruksille käyttämällämme alukeparilla ei toiminut heikoilla eli vähän virusta sisältävillä näytteillä, kuten ei myöskään heikolla positiivisella kontrollilla. (ks. liite 8). Ohjaajamme testasi menetelmän toimivaksi kuitenkin vahvalla näytteellä. Käytetty alukepari ei siis sovellu menetelmään, koska sillä ei voida määrittää heikkoja näytteitä. FT Pekka Kolehmainen teki tyypitystä varten tuotteet vaihtoehoisella menetelmällä. Parechovirukset olivat HPeV3-tyyppejä alle kolmen kuukauden ikäisiltä

lapsilta seeruminäytteistä. Aiemmissa tutkimuksissa, Harvala ym. (2009: 1755); Kolehmainen ym. (2014: 1109), on löytynyt HPeV3-tyyppiä alle kolmen kuukauden ikäisten selkäydinnestenäytteistä.

Tutkimuksissa, Blomqvist ym. (2008: 2411); McWilliam Leitch ym. (2008: 122), erilaisista näytteistä todetaan löytyneen eniten enterovirus B-lajin tyyppejä. Toisista eniten on tavattu enterovirus A-lajin tyyppejä, mutta enterovirus C- ja D-lajien tyyppejä vähemmässä määrin. Suomessa tehdyssä tutkimuksessa, Blomqvist ym. (2008: 2411), näytteissä esiintyneet B-lajin tyypit ovat olleet muun muassa echovirus-11 (E-11), E-6, coxsackievirus B5 (CBV-5) ja CBV-4 ja E-30, kun taas A-lajin tyypeistä esimerkiksi EV-71 ja CVA-16. Tutkimissamme enteroviruspositiivisissa näytteissä (n=24) oli enterovirus B-lajin tyyppejä kymmenessä ja A-lajin tyyppejä yhdeksässä näytteessä. Enterovirus C- tai D-lajin tyyppejä emme löytäneet lainkaan. Enterovirus A-lajin CVA-6 ja enterovirus B-lajin E-4 virustyyppejä esiintyi eniten. Selkäydinnestenäytteissä esiintyi eniten E-4 (viidessä) ja rakkulanäytteissä CVA-6 (viidessä). Lapsien näytteistä löytyi eniten rakkulanäytteiden CVA-6, kun taas aikuisilta selkäydinnestenäytteiden E-4. Lasten selkäydinnestenäytteissä esiintyi muita enterovirus B-lajin tyyppejä. Kaikkia muitakin löytämiämme virustyyppejä on esiintynyt aiemmissa tutkimuksissa, kuten esimerkiksi E-11, E-30 ja CBV-4. Odotetusti viruksia esiintyi kesä-syky painotteisesti.

Tavoitteenamme oli tuottaa tietoa parechoviruksen esiintymisestä lasten infektiosairauksista, etenkin keskushermostoinfektioista. Opinnäytetyömme avulla ei mahdollisesti voida vakuuttaa klinikoita parechoviruksen osalta, koska sitä ei esiintynyt tutkimissamme otoksissa kuin kahdessa näytteessä. Parechoviruksen esiintymisestä voitaisiin saada enemmän tietoa, mikäli tutkittavasta otoksesta saisi suuremman. Tällöin otokseen voisi valita näytteitä vanhemmilta lapsilta erilaisista näytelaaduista. Myös pidempiaikainen tutkimus sekä maantieteellisesti laajempi alue tuottaisi suuremman otoksen. Mahdollisesti tutkimuksessa voisi käyttää näytteitä, joista ei ole vielä tutkittu lainkaan virusten olemassaoloa. Lisäksi näytteistä voitaisiin tutkia parechovirustyyppien vasta-aineita niin lapsilta kuin aikuisilta ja näin saada tietoa infektioita sairastaneista.

Tavoitteenamme oli myös tuottaa tietoa parecho- ja enterovirustyyppien esiintymisestä kaikenikäisten potilaiden erilaisissa näytteissä. Opinnäytetyöllämme virustyyppittäminen voidaan osoittaa tärkeäksi. Kliinikoilla on mahdollisuus saada tietää, mitä parecho- ja enterovirustyyppejä heidän potilaansa ovat sairastaneet. Tulosten perusteella on mah-

dollista tehdä infektiosta ja virustyypeistä johtopäätöksiä. Tuloksista voidaan havaita virustyyppien esiintyvyys eri näytelaaduissa eri-ikäisillä sekä virusten esiintyvyys eri kuu-kausina. Kliinikoiden lisäksi hyödynsaajana on Haartman instituutti. Haartman instituutti sai tietoa helmikuun 2013 ja lokakuun 2014 välisenä aikana liikkuneista viruskannoista pääkaupunkiseudulla. Tätä tietoa tarvitaan selvittäessä virusten virulenssia, aiheuttaako jokin kanta enemmän esimerkiksi keskushermostoinfektioita. Työ tuotti myös lisätietoa virusten perinnöllisestä monimuotoisuudesta. Virusten monimuotoisuuden ja sukulaissuhteiden perusteella voidaan saada selville virusten muuntuminen ja maailmanlaajuiset leviämisreitit. Lopullisia hyödynsaajia ovat parecho- ja enterovirusinfektioita sairastavat potilaat. Potilailla on mahdollisuus saada spesifimpää tietoa ja hoitoa, mikäli kliinikot saadaan vakuuttamaan virustyyppityksen tärkeydestä. Taudin eteneminen ja oireiden ennakoiminen helpottuvat kliinikon tuntiessa taudinaiheuttaja. Myös mahdollisesta turhasta antibiootihoidosta voidaan näin luopua.

Parechoviruksen tutkiminen on tärkeää, jotta jatkossa tietämys parechoviruksista ja sen aiheuttamista infektiosta laajenee. Myös uusia parechovirustyyppjä tullaan varmasti jatkossa löytämään lisää. Parecho- ja enterovirusten tutkiminen on tärkeää myös kehiteltäessä lääkkeitä tai rokotteita näitä viruksia vastaan. Suonensisäisen immunoglobuliinin käyttöä myös parechovirusinfektioissa on jatkossa tutkittava ja kehitettävä. Tulevaisuudessa todennäköisenä lääkevaihtoehtona ovat vasta-aineet. Tehoavien rokotteiden kehittäminen on vaikeaa muun muassa enterovirusten monimuotoisuuden vuoksi. On kuitenkin välttämätöntä kehittää myös rokotteita vakavia infektiota aiheuttavia enteroviruksia vastaan, joilla on taipumus muodostaa epidemioita.

Opinnäytetyössämme oli kaksi eri työtä. Käsittelimme ensimmäisessä työssä enterovirusnegatiivisia lasten selkäydinneste- ja seeruminäytteitä. Toisessa työssä meillä oli kaikenikäisten parecho- tai enteroviruspositiivisia selkäydinneste-, seerumi- ja eritenäytteitä. Teimme kahta työtä samanaikaisesti ristikkäin. Koimme aluksi kokonaisuuden hahmottamisen vaikeaksi. Hahmottaminen olisi ollut helpompaa, mikäli olisimme voineet suorittaa työvaiheet järjestyksessä. Ensin olisimme tutkineet negatiiviset näytteet, jonka jälkeen olisimme siirtyneet tutkimaan positiivisia näytteitä. Päädyimme kuitenkin työstämään kahta työtä samanaikaisesti, jotta ehtisimme tyypittämään virukset määrätysässä ajassa.

Opinnäytetyötä suorittaessamme huomioimme eettisyyden. Suunnittelimme työskenteilyn huolellisesti ennen työn aloittamista. Teimme työmme tietopohjaan perustuen ja työohjeita seuraten sekä suoritimme työtehtävät aseptisten ohjeiden mukaisesti. Tekemisemme perustui rehellisyydelle, ottaen aina selvää itsellemme epäselvistä asioista. Noudatimme laboratorion turvallisuus- ja jätteidenhävitysohjeita. Tutkimustulokset analysoimme puolueettomasti. Luonnollisesti noudatimme vaitiolovelvollisuutta.

Meillä ei ollut aikaisempaa kokemusta tällaisesta työstä. Olimme suorittaneet koululla aiheeseen liittyvät opinnot, mutta emme olleet suorittaneet käytännönharjoitteluita. Saimme hyvän perehdytyksen työhömmе. Meillä oli aina mahdollisuus kysyä neuvoa ohjaajiltamme, joten pystyimme suorittamaan työvaiheet suurimmaksi osaksi itsenäisesti. Opinnäytetyön tekeminen oli mielenkiintoista ja kehittävää. Bioanalytikkoina saimme paljon kokemusta virologian ja geenitekniikan osa-alueilla, joten pystyimme jatkossa hyödyntämään osaamistamme.

Lähteet

Adams, M.J. – King, A.M.Q – Carstens, E.B. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses 2013. Archives of Virology 158. 2023–2030.

Arnold, Edward – Luo, Ming – Vriend, Gerrit – Rossmann, Michael G. – Palmenberg, Ann C. – Parks, Griffith D. – Nicklin, Martin J. H. – Wimmer, Eckard 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84. 21–25. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.pnas.org/content/84/1/21.full.pdf>>.

Benschop, Kimberley – Molenkamp, Richard – van der Ham, Alwin – Wolthers, Katja – Beld, Marce P. 2007. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by realtime PCR. Journal of Clinical Virology 41 (2). 69–74.

Bio-rad 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Käyttöopas. Verkkodokumentti. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf>. Luettu 27.11.2014.

Bio-rad 2013. ChemiDoc™ MP Imaging System with Image Lab™ Software. Käyttöopas. Verkkodokumentti. <<http://sharedlab.bme.wisc.edu/teaching/2005/equipment/chemi-doc/biorad-chemidoc-mp-manual.pdf>>. Luettu 27.11.2014.

Biotium 2013. GelRed & GelGreen. Verkkodokumentti. <<http://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/GelRed-GelGreen-Flyer.pdf>>. Luettu 18.11.2014.

Blomqvist, Soile – Paananen, Anja – Savolainen-Kopra, Carita – Hovi, Tapani – Roivainen, Merja 2008. Eight Years of Experience with Molecular Identification of Human Enteroviruses. Journal of Clinical Microbiology 46 (7). 2410–2413.

Butel, Jane 2013. Virology. Teoksessa Brooks, Geo F. – Caroll, Karen C. – Butel, Janet S. – Morse, Stephen A. – Mietzner, Timothy A.: Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical microbiology. 26. painos. New York: McGraw Hill. 407–669.

Cepheid 2014. Xpert® EV. Verkkodokumentti. <<http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/critical-infectious-diseases/xpert-ev>>. Luettu 15.01.2015.

Harvala, Heli – Simmonds, Peter 2009. Human parechoviruses: Biology, epidemiology and clinical significance. *Journal of Clinical Virology* 45 (1). 1–9.

Harvala, H. – Robertson, I. – Chieochansin, T. – McWilliam Leitch, E.C. – Templeton, K – Simmonds, P. 2009. Specific Association of Human Parechovirus Type 3 with Sepsis and Fever in Young Infants, as Identified by Direct Typing of Cerebrospinal Fluid Samples. *The Journal of Infectious Diseases* 199 (12).1753–1760.

Hyypiä, Timo – Roivainen, Merja – Ruuskanen, Olli. 2010. Pikornavirukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Seppo, Meri – Vaara, Matti (toim.): *Mikrobiologia – mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet kirja 1*. Helsinki: Kustannus oy Duodecim. 512–523.

ICTV 2014. Virus Taxonomy Assignments. Verkkodokumentti. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>>. Luettu 29.11.2014.

Joki-Korpela, Päivi – Hyypiä, Timo 1998. Diagnosis and Epidemiology of Echovirus 22 Infections. *Clinical Infectious Diseases* 26. 129–36.

Joki-Korpela, Päivi – Marjomäki, Varpu – Krogerus, Camilla – Heino, Jyrki – Hyypiä, Timo 2001. Entry of Human Parechovirus 1. *Journal of Virology* 75 (4).1958–1967.

Jääskeläinen, Anne – Kolehmainen, Pekka – Kallio-Kokko, Hannimari – Nieminen, Tea – Koskiniemi, Marjaleena – Tauriainen, Sisko – Lappalainen, Maija 2013. First two cases of neonatal human parechovirus 4 infection with manifestation of suspected sepsis. *Journal of Clinical Virology* 58 (1). 328–330.

Knowles, N.J. – Hovi, T. – Hyypiä, T. – King, A.M.Q. – Lindberg, A.M. – Pallansch, M.A. – Palmenberg, A.C. – Simmonds, P. – Skern, T. – Stanway, G. – Yamashita, T. – Zell, R. 2012. Picornaviridae. Teoksessa King, A.M.Q. – Adams, M.J. – Carstens, E.B. – Lefkowitz, E.J.: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier. 855–880.

Kolehmainen, Pekka – Jääskeläinen, Anne – Blomqvist, Soile – Kallio-Kokko, Hannimari – Nuolivirta, Kirsi – Helminen, Merja – Roivainen, Merja – Lappalainen, Maija – Tauriainen, Sisko 2014. Human Parechovirus Type 3 and 4 Associated With Severe Infections in Young Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 33 (11). 1109–1113.

Kolehmainen, P. – Oikarinen, S. – Koskiniemi, M. – Simell, O. – Ilonen, J. – Knip, M. – Hyöty, H. – Tauriainen, S. 2012. Human parechoviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children. *Journal of Clinical Virology* 54 (2). 156–161.

Le Gall, Olivier – Christian, Peter – Fauquet, Claude – King, Andrew – Knowles, Nick – Nakashima, Nobuhiko – Stanway, Glyn – Gorbalenya, Alexander 2008. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Archives of Virology* 153 (4). 715–727.

Li, Rongcheng – Liu, Longding – Mo, Zhaojun – Wang, Xuanyi – Xia, Jielai – Liang, Zhenglun – Zhang, Ying – Li, Yanping – Mao, Qunying – Wang, Jingjing – Jiang, Li – Dong, Chenghong – Che, Yanchun – Huang, Teng – Jiang, Zhiwei – Xie, Zhongping – Wang, Lichun – Liao, Yun – Liang, Yan – Nong, Yi – Liu, Jiansheng – Zhao, Hongling – Na, Ruixiong – Guo, Lei – Pu, Jing – Yang, Erxia – Sun, Le – Cui, Pingfang – Shi, Haijing – Wang, Junzhi – Li, Qihan 2014. An Inactivated Enterovirus 71 Vaccine in Healthy Children. *The New England Journal of Medicine* 370 (9). 829–837.

Luoto, Raakel – Ruuskanen, Olli – Holmberg, Kaisa – Waris, Matti – Peltola, Ville – Lehtonen, Liisa 2014. Vastasyntyneen virusinfektio. *Duodecim* 130. 2071–2077.

McWilliam Leitch, E.C. – Harvala, H. – Robertson, I. – Ubillos, I. – Templeton, K – Simmonds, P. 2008. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *Journal of Clinical Virology* 44 (2). 119–124.

Metsämuuronen, Jari 2006. Laadullisen tutkimuksen käsikirja. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

NCBI 2014. Polymerase Chain Reaction (PCR). Verkkodokumentti. Päivitetty 26.09.2014. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>>. Luettu 12.01.2015.

Pallansch, Mark A. – Roos, Raymond P. 2001. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Teoksessa Knipe, David M. (toim.) – Howley, Peter M. (toim.) Griffin, Diane E. – Lamb, Robert A. – Martin, Malcolm A. – Roizman, Bernard – Straus, Stephen E.: Fields Virology Volume 1. 4. painos Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 723–775.

Picornastudygroup. 2014a. Picornavirus Species. Verkkodokumentti. <<http://www.picornastudygroup.com/taxa/species/species.htm>>. Luettu 10.12.2014.

Picornastudygroup. 2014b. Human Parechovirus. Verkkodokumentti. <<http://www.picornastudygroup.com/types/parechovirus/hpev.htm>>. Luettu 10.12.2014.

Pikornaviridae.com 2014a. Parechovirus. Verkkodokumentti. <<http://www.picornaviridae.com/parechovirus/parechovirus.htm>>. Luettu 16.9.2014.

Pikornaviridae.com 2014b. Enterovirus. Verkkodokumentti. <<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>>. Luettu 16.9.2014.

Qiagen 2010. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. Käyttöopas. 3. painos.

Qvist, Erik – Korppi, Matti 2009. Alle kolmen kuukauden ikäinen lapsi päivystyksessä. *Duodecim* 125 (21). 2373–2379. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98404.pdf>>.

Racaniello, Vincent R. 2001. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. Teoksessa Knipe, David M. (toim.) – Howley, Peter M. (toim.) Griffin, Diane E. – Lamb, Robert A. – Martin, Malcolm A. – Roizman, Bernard – Straus, Stephen E.: Fields Virology Volume 1. 4. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 685–722.

Ramirez-Fort, Marigdalia K. – Downing, Christopher – Doanc, Hung Q. – Benoist, Frances – Oberste, M. Steven – Khana, Farhan – Tyinga, Stephen K. 2014. Coxsackievirus A6 associated hand, foot and mouth disease in adults: Clinical presentation and review of the literature. *Journal of Clinical Virology* 60 (4). 381–386.

Roux, K. H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research* 4. 187–188.

Ruuskanen, Olli – Heikkinen, Terho 2011. Ylähengitystieinfektiot ja otiitti. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Matti (toim.): *Infektiosairaudet – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 3. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 418–440.

Shoji, Kensuke – Komuro, Hisako – Miyata, Ippei – Miyairi, Isao – Saitoh, Akihiko 2013. Dermatologic Manifestations of Human Parechovirus Type 3 Infection in Neonates and Infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 32 (3). 233–236.

Stanway, Glyn – Hyypiä, Timo 1999. Parechoviruses. *Journal of Virology* 73 (7). 5249–5254. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://jvi.asm.org/content/73/7/5249.full.pdf+html>>.

Stanway, Glyn – Kalkkinen, Nisse – Roivainen, Merja – Ghazi, Farideh – Khan, Mahboob – Smyth, Michael – Meurman, Olli – Hyypiä, Timo 1994. Molecular and Biological Characteristics of Echovirus 22, a Representative of a New Picornavirus Group. *Journal of Virology* 68 (12). 8232–8238.

Strachan, Tom – Read, Andrew 2011. *Human Molecular Genetics*. 4.painos. New York: T&F informa.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2006. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. 3.painos. Helsinki: Opetushallitus.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. *Geenitekniikka*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Tauriainen, Sisko – Martiskainen, Mika – Oikarinen, Sami – Lönnrot, Maria – Viskari, Hanna – Ilonen, Jorma – Simell, Olli – Knip, Mikael – Hyöty, Heikki 2007. Human Parechovirus 1 Infections in Young Children – No Association With Type 1 Diabetes. *Journal of Medical Virology* 79. 457–462.

Tauriainen, Sisko – Oikarinen, Sami – Taimen, Kirsi – Laranne, Jussi – Sipilä, Markku – Lönnrot, Maria – Ilonen, Jorma – Simell, Olli – Knip, Mikael – Hyöty, Heikki 2008. Temporal Relationship between Human Parechovirus 1 Infection and Otitis Media in Young Children. *The Journal of Infectious Diseases* 198. 35–40. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://jid.oxfordjournals.org/content/198/1/35.full.pdf>>.

Thermo Fisher Scientific 2014. SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System. Käyttöopas.

Vainionpää, Raija – Hedman, Klaus – Hyypiä, Timo 2000. Mitä lääkärin on hyvä tietää virusdiagnoosista. *Duodecim* 116. 17–24. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo91263.pdf>>.

Verboon-Maciolet, Malgorzata A. – Krediet, Tannette G. – Gerards, Leo J. – de Vries, Linda S. – Groenendaal, Floris – van Loon, Anton M. 2008a. Severe Neonatal Parechovirus Infection and Similarity With Enterovirus Infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 27 (3). 241–245.

Verboon-Maciolet, Malgorzata A. – Groenendaal, Floris – Hahn, Cecil D. – Hellmann, Jonathan – van Loon, Anton M. – Boivin, Guy – de Vries, Linda S. 2008b. Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Annals of Neurology* 64 (3). 266–273.

Wigand, Reinhard – Sabin, Albert 1961. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 11. 224–247.

Wildenbeest, Joanne G. – Harvala, Heli – Pajkrt, Dasja – Wolthers, Katja C. 2010. The need for treatment against human parechoviruses: how, why and when? *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8 (12). 1417–1429.

Wolthers, Katja – Benschop, Kimberley – Schinkel, Janke – Molenkamp, Richard – Bergevoet, Rosemarijn – Spijkerman, Ingrid – Kraakman, Carlijn – Pajkrt, Dasja 2008. Human Parechoviruses as an Important Viral Cause of Sepsis Like Illness and Meningitis in Young Children. *Clinical Infectious Diseases* 47 (3). 358–363.

Vuorinen, Tytti 2011. Ihon virusinfektiot. Teoksessa Hannuksela, Matti – Pelttonen, Sirkku – Reunala, Timo – Suhonen, Raimo (toim.): Ihotaudit. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy. Duodecim. 173–184.

Reaaliaikainen RT-PCR, HPeV- ja EV-multiplex: reaktioseoksen ohje

HPEV-EV MPLEX MGB (VIC/FAM)

Final conc.	Mastermix	1X
	Master mix (2X)	12,5 µl
400 nM	HPEV-FW1	1 µl
400 nM	HPEV-RV1	1 µl
200nM	HPEV-Probe1 FAM	0,5 µl
400 nM	EQ-1	1 µl
400 nM	EQ-2	1 µl
50nM	EV-Probe1 VIC	0,15 µl
	ROX	0,05 µl
	H ₂ O	0,3 µl
	Temp.	7 µl
	SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix	0,5 µl
		25 µl

Reaaliaikainen RT-PCR, HPeV- ja EV-multiplex: ohjelma

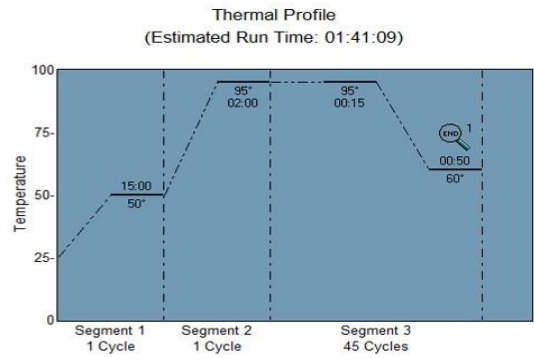
OHJELMA

FAM 8 X (FAM-leimatuille koettimille)
HEX/JOE 4 X (VIC-leimatuille koettimille)
PCR-protokolla (~1h 40min)
step 1 (RT) 15 min 50 °C
step 2 (alkudenaturaatio) 2 min 95 °C
step 3 (amplifikaatio 2 step)
45 X 15 s 95 °C
50 s 60 °C
Datankeräys vain viimeisestä vaiheesta.

Reaaliaikainen RT-PCR, tulokset

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12 281 P.AM	12 427 P.AM	12 462 P.AM	12 245 P.AM	12 226 P.AM	12 788 P.AM	12 777 P.AM	12 787 P.AM	12 787 P.AM			
B	12 229 P.AM	12 244 P.AM	12 425 P.AM	12 229 P.AM	12 229 P.AM	12 718 P.AM	12 712 P.AM	12 780 P.AM	12 780 P.AM			
C	12 287 P.AM	12 283 P.AM	12 282 P.AM	12 286 P.AM	12 213 P.AM	12 732 P.AM	12 732 P.AM	12 732 P.AM	12 732 P.AM			
D	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM			
E	12 287 P.AM	12 281 P.AM	12 462 P.AM	12 229 P.AM	12 463 P.AM	12 276 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM			
F	12 288 P.AM	12 281 P.AM	12 288 P.AM	12 288 P.AM	12 288 P.AM	12 718 P.AM	12 718 P.AM	12 718 P.AM	12 718 P.AM			
G	12 462 P.AM	12 212 P.AM	12 246 P.AM	12 277 P.AM	12 285 P.AM	12 782 P.AM	12 782 P.AM	12 782 P.AM	12 782 P.AM			
H	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM	12 781 P.AM			

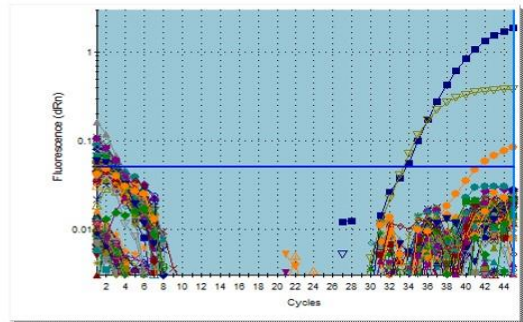


Analysis Sel./Setup-Term Settings View

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	7	8	9	10	11	12
A	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
B	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
C	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
D	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
E	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
F	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
G	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		
H	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5	ROX 1/5 P.AM 1/5		

Amplification Plots



Nested-RT-PCR 1. kierros HPeV ja EV: reaktioseosten ohje

Seq-one step RT-PCR		
1.kierros		
Parechovirus		
		1 x
2XREACTION MIX (Invitrogen)		12,5 µl
Parecho-VP3/VP1-OAS (10 µM)	0,5 µM	0,5 µl
Parecho-VP3/VP1-OS (10 µM)	0,5 µM	0,5 µl
SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix		0,8 µl
Enterovirus-A		
		1 x
2XREACTION MIX (Invitrogen)		12,5 µl
EV-A-OAS (10 µM)		0,5 µl
EV-A-OS (10 µM)		0,5 µl
SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix		0,8 µl
Enterovirus-B		
		1 x
2XREACTION MIX (Invitrogen)		12,5 µl
EV-B-OAS (10 µM)		0,5 µl
EV-B-OS (10 µM)		0,5 µl
SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix		0,8 µl

Nested-RT-PCR 1. kierros HPeV ja EV: ohjelma

Ohjelma	1.kierros	Parecho- ja enteroviruksille
		RT-PCR1–protokolla
		step1 (RT) 60 min 43 °C
20 X step2		step2 1 min 53 °C ja 1 min 55 °C
step 2 (RT)		step3 (ekstensio) 15 min 70 °C
		step4 (inakt.) 2 min 94 °C
40 X (step 1–3)		step1 30s 94 °C
		step2 30s 50 °C
		step3 105s 68 °C
		step4 5 min 68 °C

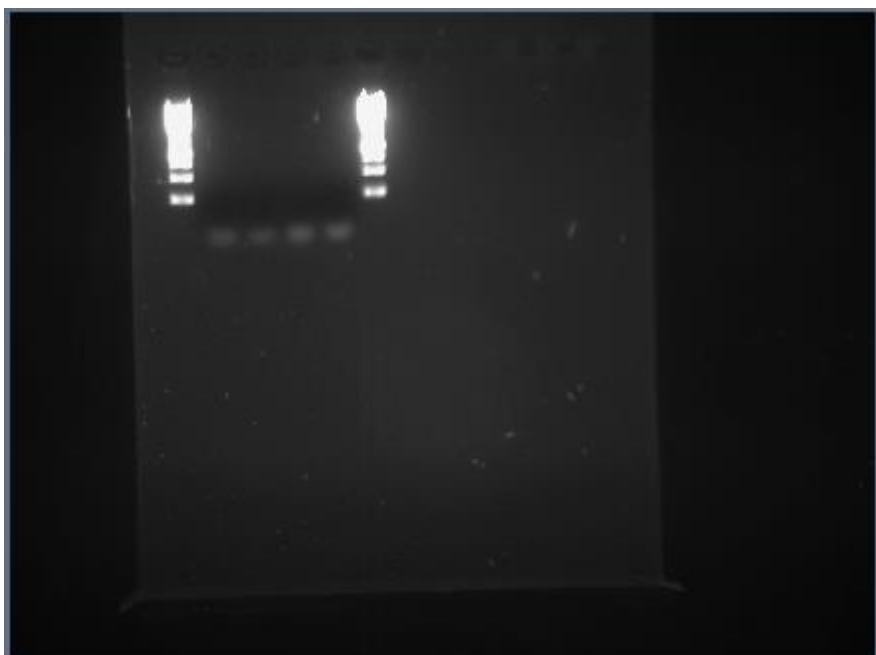
Nested-RT-PCR 2. kierros HPeV ja EV: reaktioseosten ohje

Seq-one step RT-PCR		
2.kierros PCR2 (Phusion Flash)		
Parechovirus		
		1 x
2XREACTION MIX (Phusion)		12,5 µl
Parecho-VP3/VP1-IAS (10 µM)	0,5 µM	0,5 µl
Parecho-VP3/VP1-IS (10 µM)	0,5 µM	0,5 µl
Apteekin vesi		5,5 µl
Enterovirus-A		
		1 x
2XREACTION MIX (Phusion)		12,5 µl
EV-A-IAS (10 µM)		0,5 µl
EV-A-IS (10 µM)		0,5 µl
Apteekin vesi		5,5 µl
Enterovirus-B		
		1 x
2XREACTION MIX (Phusion)		12,5 µl
EV-B-IAS (10 µM)		0,5 µl
EV-B-IS (10 µM)		0,5 µl
Apteekin vesi		5,5 µl

Nested-RT-PCR 2. kierros HPeV ja EV: ohjelma

Ohjelma 2.kierros	Parecho- ja enteroviruksille
	RT-PCR2-protokolla (1 µl PCR1-templaattia)
30 X (step 1–3)	step1 18s 94 °C
	step2 21s 50 °C
	step3 90s 72 °C
	step4 5 min 72 °C

AGE-kuva – parechovirus



AGE-kuva – enterovirus

