

Alena Kaijalainen

# Rotavirusten seuranta Suomessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

27.3.2015

Tekijä Otsikko	Alena Kaijalainen Rotavirusten seuranta Suomessa
Sivumäärä Aika	44 sivua + 1 liitettä 27.3.2015
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	laboratorioala
Ohjaajat	FT Haider Al-Hello Dosentti Carita Savolainen-Kopra Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksessa (THL), Virusinfektiot-yksikössä. Työn tavoitteena oli selvittää rotavirusten aiheuttamaa sairastuvuutta eri ikäryhmissä ja tunnistaa Suomessa kiertävät rotavirusgenotyypit ja niiden jakaumat. Lisäksi, selvittää, että suojaako rokote kaikilta rokotuksessa olevilta genotyypeiltä ja esiintyykö uusia genotyyppijä/reassortantteja.</p> <p>Virusinfektiot-yksikkö vastaa koko Suomen rotavirusseurannasta. Suomessa käytettävä rokote (RotaTeq®) on ollut kansallisessa rokotusohjelmassa vuodesta 2009 alkaen. Ennen rokotetta rotavirusten aiheuttamat ripuliepidemiat sairastuttivat Suomessa vuosittain n. 20 000 alle 5-vuotiasta lasta (ilmaantuvuus 460/100 000), joista yli puolet tarvitsi terveydenhuollon palveluja. Rotavirusinfektiot ovat vähentyneet rokotteiden ansiosta (2013, 44/100 000), mutta viruksia esiintyy silti. Yleisimmin tautia aiheuttavat rotavirustyyppit tulevat harvinaistumaan ja mahdollisesti korvautumaan toisilla taudinaiheuttamiskyvyltään muuntuneilla virustyypeillä. Seuranta on tärkeää, ja sitä on jatkettava uusien syntyvien kantojen havaitsemiseksi ja estämiseksi. Rotavirus on kuulunut 1.5.2013 alkaen tartuntatautilain ja -asetuksen mukaiseen mikrobikantakokeelmaan. Näin ollen rotaviruspositiiviset näytteet lähetetään THL:n Virusinfektiot-yksikköön tyyppitettäväksi. Tarkoituksena on seurata, mitkä genotyypit kiertävät Suomessa rokotuksista huolimatta.</p> <p>Rotavirus on pieni, kaksisäikeinen RNA-virus, ja se on yleisin lasten akuutin suolistotulehduksen aiheuttaja kehittyneissä maissa. Tartuntatautirekisteriin (TTR) ilmoitettiin vuoden 2013 aikana 282 rotavirusinfektiota, joista saatiin yksikköön tutkittavaksi 73 positiivista näytettä. Näytteet tutkittiin käyttäen käänteiskopiointia ja reaaliaikaista polymeraasiketjureaktiota (RT-qPCR), minkä jälkeen ne tyyppitettiin geneettisesti. Tutkimuksen näytteistä 53 % oli miespuolisilta ja 47 % naispuolisilta henkilöiltä, ja näytteistä puolet oli alle 5-vuotiailta lapsilta. Yleisin näytteistä löydetty genotyyppi oli G1P[8], joka on myös muissa teollisuusmaissa yleisin. Muita useimmin tavattuja genotyyppijä olivat G2P[4], G3P[8], G4P[8] ja G9P[8].</p>	
Avainsanat	rotavirus, mikrobikantakokeelma, tartuntatautirekisteri

Author Title	Alena Kaijalainen Rotavirus surveillance in Finland
Number of Pages Date	44 pages + 1 appendices 27 March 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Haider Al-Hello, Ph.D. Carita Savolainen-Kopra, Docent Jarmo Palm, Supervisor
<p>The final thesis was carried out in the Viral Infections Unit in the National Institute for Health and Welfare (THL). The aim was to study the rotavirus-induced morbidity in different age groups and to identify rotavirus genotypes circulating in Finland and their distributions. Also, to find out does the vaccine protect children against all genotypes and the occurrence of new genotypes / reassortant.</p> <p>The Viral Infections Unit is responsible for the rotavirus surveillance program in Finland. Since 2009, the Finnish authorities have included the rotavirus vaccine (RotaTeq®) in the national immunization program. Before the vaccination, rotavirus affected 20 000 children under 5 years of age per year (incidence of 460/100 000), of which more than half needed primary health care services. Rotavirus infections have been reduced by more than 10 fold (2013, 44/100 000); however, the viruses still exist. The vaccination will probably reduce the most common rotavirus genotypes, which will possibly be replaced by other uncommon genotypes. Follow-up is important, and it should continue for the detection and prevention of new genotypes. For this reason, rotaviruses have been included in the Communicable Diseases Act and Decree as part of the microbe strain collection since May 2013. Thus, diagnostic laboratories must send rotavirus positive specimens to the THL's Viral Infections Unit for typing.</p> <p>Rotaviruses are small, double-stranded RNA viruses. They are the most common causative agents of children's acute gastroenteritis in developed countries. According to the infection disease register (TTR), 282 cases were registered during 2013. Only 73 positive samples were received in the Viral Infections Unit. The samples were studied using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), followed by genetic typing. As much as 53 % of the samples were from males and 47 % from females. Half of the samples were collected from children under 5 years of age. G1P[8] was the most common genotype found. This genotype is the most common also in other industrialized countries. The other mostly detected genotypes were G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8].</p>	
Keywords	rotavirus, microbe strain collection, infection disease register

## Alkulause

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Virusinfektiot-yksikölle. Kiitän ohjaajaani FT Haider Al-Helloa loistavasta asiantuntevuudesta, vinkeistä ja huumorintajusta. Dosentti Carita Savolainen-Kopraa ja FT Soile Blomqvistia kiitän heidän erityisestä ammattitaidostaan, kannustuksesta ja opastuksesta. Kiitän kaikkia niitä, jotka ovat edesauttaneet työni valmistumista ja olleet mukana työni eri vaiheissa.

Metropolia Ammattikorkeakoulusta opinnäytetyön ohjaajana toimi tutkintovastaava Jarmo Palm. Kiitos hänelle kannustuksesta opiskeluaikani, jolloin jopa mahdottomista tehtävistä suoriuduin helposti.

Lisäksi kiitän vanhempiani, siskoani ja kavereitani, joilta olen saanut tukea, ymmärrystä ja kannustusta. Erityisesti kiitän äitiäni, laboratoriotutkija Svetlana Kaijalaista, joka on aina ollut lähelläni. Hänen kanssaan olemme tehneet Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksessa (ent. Kansanterveyslaitos) erinomaista yhteistyötä jo vuodesta 2008.

Helsingissä 10.3.2015

Alena Kaijalainen

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Rotavirukset	2
2.1	Rakenne ja luokittelu	2
2.2	Genomi	3
2.3	Infektion tarttuminen ja kehittyminen	5
2.4	Tauti ja oireet	5
2.5	Epidemiologia	6
2.6	Ehkäisy ja rokote	8
2.7	Diagnostiikka	11
3	Tavoite	13
4	Materiaalit, menetelmät ja työn suoritus	14
4.1	Laitteet ja reagenssit	15
4.2	Näytemateriaali	17
4.3	Referenssimateriaalit ja kontrollit	17
4.4	Työturvallisuus ja työtilat	17
4.5	Ulostenäytteen esikäsittely	18
4.6	Virus-RNA:n eristys	18
4.6.1	Rneasy®	19
4.6.2	Omegan kitti	21
4.7	Detektiomenetelmät	22
4.7.1	Rotavirusten RT-qPCR (VP2)	22
4.7.2	Rotavirusten genotyypitys	26
4.8	Agarosigeelielektroforeesi	30
5	Tulokset	31
5.1	Tartuntatautirekisteriin ilmoitetut rotavirusinfektiot	31
5.2	Rotaviruskantakokoelmanäytteet	33
5.2.1	Pikatestipositiivisten näytteiden varmistus RT-qPCR:llä	34
5.2.2	Kantakokoelmanäytteiden tyyppitys kahdessa laboratoriossa	34
5.2.3	Vallitsevat genotyypit ja niiden alueellinen jakauma Suomessa	37
6	Päätelmät	40

Liitteet

Liite 1. G- ja P-typin amplikonikokojen tulkinta

## Lyhenteet

Aluke	Lyhyt DNA-sekvenssi tai fragmentti, joka sitoutuu komplementaariseen kohtaan DNA:ssa (RNA:han RT-reaktiossa).
bp	Emäspari ( <i>base pair</i> ).
cDNA	Komplementaarinen DNA ( <i>complementary DNA</i> ).
Cq-arvo	Sykliluku, jossa fluoresenssi ylittää kynnyksarvon ( <i>quantification cycle</i> ).
DEPC – H <sub>2</sub> O	Dietyylipyrokarbonaatilla RNAasi-vapaaksi käsitelty vesi.
dRn-arvo	Mitta-arvo, joka kuvaa PCR-menetelmässä fluoresoivien rakenneosien määrää.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo.
EIA	Entsyymi-immunologinen menetelmä.
EM	Elektronimikroskopia.
EMA	Euroopan lääkevirasto ( <i>European Medicines Agency</i> ).
FAM	Fluorescein amidite.
IgA	Immunoglobuliini A.
IgG	Immunoglobuliini G.
LATU	THL:n laboratoriotyön tukiyksikkö.
MGB	Minor groove binder.
NFQ	Non-fluorescent quencher.

PBS-liuos	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos.
RT-PCR	Käänteiskopiointi polymeraasiketjureaktio ( <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> ).
RT	Huonelämpötila ( <i>room temperature</i> ).
RT-qPCR	Käänteiskopiointi ja reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio.
RNA	Ribonukleiinihappo ( <i>ribonucleic acid</i> ).
shp	Sairaanhoidopiiri.
THL	Terveysten ja hyvinvoinnin laitos.
TRTK	Tampereen yliopiston Rokotetutkimuskeskus.
TTR	Tartuntatautirekisteri.
TBE	Tris-boraatti-EDTA-puskuri ( <i>tris-borate-EDTA buffer</i> ).
WHO	Maailman terveysjärjestö ( <i>World Health Organization</i> ).



## 1 Johdanto

Rotavirukset ovat maailmanlaajuisesti yleisimpiä pienten lasten vakavan suolistotulehduksen (gastroenteriitti) aiheuttajia. Vuosittain suolistotulehdukseen kuolee 600 000 lasta. Rotavirusripuli on tavallisin 6–24 kk:n ikäisillä lapsilla ja lähes kaikki lapset saavat oireisen tai oireettoman tartunnan ennen viidettä ikävuottaan. Aikuisilla tautia esiintyy harvemmin ja oireet ovat lievemmät.

Rotaviruksen ensimmäinen infektiio on oireiltaan vakavin. Seuraavat saadut infektiot ovat lievempiä, koska immuniteetti on jo kehittynyt. Rotavirustauti on lapsille vakava, koska se runsaan oksentelun, ripuloinnin ja kuumeilun takia voi johtaa kuivumiseen ja hoitamattomana jopa kuolemaan. Ennen rotavirusrokotteen ottamista kansalliseen rokotusohjelmaan Suomessa infektiot aiheuttivat arviolta 2 400 sairaala- ja 3 600 poliklinikkakäyntiä pienillä lapsilla vuosittain. Rokotteet tulivat Suomen markkinoille vuonna 2006, ja julkisen tarjouskilpailun perusteella kansalliseen rokotusohjelmaan valittiin vuonna 2009 RotaTeq®. Rokotusohjelmassa kaikki alle 5-vuotiaat lapset saavat 1.9.2009 lähtien 3 rokoteannosta 2, 3 ja 5 kuukauden ikäisinä. Rokotusohjelmaan kuuluvat 1.7.2009 lähtien syntyneet lapset. Seuraavana rotaviruskautena alle 1-vuotiaiden lasten kaikki sairaalahoitoa vaativat suolistoinfektiot vähenivät 50 % ja laboratoriovarmistetut rotavirusinfektiot jopa 80 %. Vaikka rotavirusrokote on ollut tehokas, infektiota esiintyy silti ja seuranta on tehtävä.

Seurannasta Suomessa vastaa Terveystieteiden tutkimuskeskus (THL). Rotaviruspositiiviset löydökset ilmoitetaan tartuntatautirekisteriin (TTR) ja positiiviset näytteet kerätään Virusinfektiot-yksikköön, joka ylläpitää rotaviruksen kantakokoelmaa. Seurannan tarkoituksena on tunnistaa rotavirusinfektiot, selvittää altistuneet ikäryhmät, havaita virusten muuntuminen, sekä arvioida tautitaakkaa ja rokotusten vaikuttavuutta.

Vuonna 2013 rotavirusdiagnostiikkaa tekevät laboratoriot ilmoittivat TTR:ään yhteensä 282 tapausta, joista Virusinfektiot-yksikköön saapui 73 näytettä. Opinnäytetyön aikana näytteiden (uloste, ulostesuspensio tai virusisolaatti) positiivisuus varmistettiin ensin reaaliaikaisella RT-PCR-menetelmällä, minkä jälkeen todetut rotavirukset genotyyppitettiin. Tyypitysmenetelmä perustuu genotyyppispesifisten alukkeiden käyttöön VP7- ja VP4-alueiden monistamisessa ja saatujen PCR-tuotteiden kokoanalyysiin.

## 2 Rotavirukset

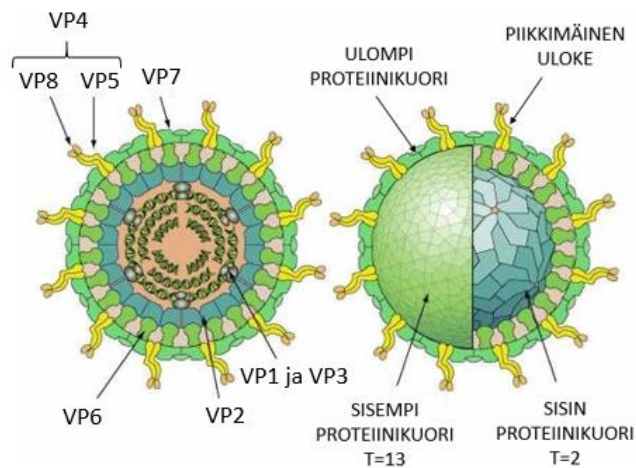
Rotaviruksen löysi Bishopin tutkimusryhmä ensimmäisen kerran ihmisen ulosteesta elektronimikroskopian avulla vuonna 1973 [1]. Viruksen nimesi Thomas Henry Flewett sen ulkonäön perusteella, koska sen partikkelit muistuttivat pyörää (lat. *rota*) [2]. Rotavirusta esiintyy kaikkialla maailmassa sekä maanperässä että vesiympäristössä. Rotavirus aiheuttaa akuuttia gastroenteriittiä eli suolistotulehdusta. [3.]

### 2.1 Rakenne ja luokittelu

Reovirusiin kuuluva rotavirus koostuu 11 kaksois-RNA -kierteestä ja kolmesta päällekkäisestä proteiinivaipasta. Proteiinivaipassa on piikkimäiset ulokkeet, jotka muodostuvat VP4-dimeereistä. Ulokkeilla virus tarttuu isäntäsoluun. Immunomikroskopiolla on voitu osoittaa, että vasta-aineet tarttuvat ulokkeiden kärkiin estäen viruksen tarttumisen isäntäsoluun. [3; 4.]

Rotaviruspartikkelin eli virionin koko on 75 nm [5]. Virioni koostuu uloimmasta kuoresta, keskikuoresta ja sisäkuoresta (kuva 1). Virionin kuorirakenne ei ole täysin tiivis. Heksooneiksi ja pentoneiksi järjestäytyneen proteiiniuoren läpäisee kaikkiaan 132 kanavaa. Kuorirakenne on ikosahedraalinen. Viruksen pyöreä muoto koostuu toisiinsa liittyneistä kolmiorakenteista. Sisimmän kuoren ja keskikuoren alkeiskolmioiden määrä on  $T=2$  ja  $T=13$ . Triangulaatioluku ( $T$ ) viittaa rakenteessa olevien alkeiskolmioiden määrään. [3; 4.]

Viruksen sisempi kuori koostuu yhtenäisestä VP6:sta, joka on eniten konservoitunut ja immunogeeninen proteiini. Rotavirukset jaotellaan ryhmiin A–G riippuen VP6-pintaproteiinista, joita on löydetty eri lajeilta. Ihmisiä infektioivat rotavirukset kuuluvat pääasiallisesti A-, B- ja C-tyyppeihin. Ihmisestä on myös eristetty muihin ryhmiin kuuluvia rotaviruksia, mutta löydökset olivat yksittäisiä. Yleisin niistä on rotavirus A, joka aiheuttaa tartunnoista yli 90 %. Sekä ihmisten että eläinten rotavirukset ovat rakenteeltaan samanlaisia. VP6-proteiinin sisäpuolella on VP2-proteiinikerros, joka peittää kapsidin sisäpinnan ja sulkee sisäänsä RNA:n sekä VP1- ja VP3-proteiinit. Kuvassa 1 näkyvät proteiinien sijainnit ja alkeiskolmiot viruksessa. [3; 6.]



Kuva 1. Virionin rakenne. Muokattu lähteestä [4].

Uloin kuori sisältää tärkeimmät proteiinit eli VP7 ja VP4, joiden perusteella rotavirukset luokitellaan eri serotyyppeihin tai genotyyppeihin. Molekyylogeneettisen tyypityksen perusteella saadut A-ryhmän rotavirusten G- ja P-genotyypit vastaavat hyvin serotyypitykseen perustuvia VP7- ja VP4-tyyppejä, joiden alatyyppejä merkitään numeroin. Ihmisessä neutraloivat vasta-aineet kohdistuvat juuri näihin proteiineihin [5]. Tähän asti on kuvattu 27 eri lajeilla esiintyvää G-tyyppiä ja 35 eri P-tyyppiä [7]. Ihmisiä infektoivia on 10 eri G-tyyppiä ja 11 eri P-tyyppiä [3]. G- ja P-tyypit voivat esiintyä eri yhdistelminä ja kaksoisinfektiot ovat melko yleisiä. Kaksoisinfektioiden aikana voi tapahtua reassortatio, jolloin virukset vaihtavat geenejään. Näin syntyy täysin uusi virus. [8.]

## 2.2 Genomi

Rotaviruksen kolmikerroksinen vaipaton kapsidi suojaa viruksen genomia, joka koostuu 11 jaokkeesta. Genomin koko on 18 555 emäsparia. Jokainen jaoke (taulukko 1) koodaa yhtä proteiinia, paitsi jaoke 11 kahta (NSP5 ja NSP6). Virusrakenneproteiineja koodaavia ovat VP1-4 ja VP6-7 ja ei-rakenteellisia proteiineja koodaavia NSP1-6. Ei-rakenneproteiineja tarvitaan viruksen monistumisessa ja niitä tuotetaan viruksen infektoimassa solussa. Jaokkeet mahdollistavat reassortanttien muodostumisen. Tärkeimmät virioniproteiinit ovat VP2, VP6 ja VP7, jotka muodostavat yhdessä noin 95 % koko proteiinimäärästä. Kaikki rotaviruksen rakenneproteiinit toimivat antigeeneinä ja osallistuvat immuunivasteen muodostamiseen. [3; 6; 9.]

Taulukko 1. Rotavirusgenomin jaokkeet, niiden sijainnit ja toiminnot [6].

Genomi jaokkeet	Proteiini	Koko (bp)	Kopiota/partikkeli	Proteiinin sijainti	Toiminto
1	VP1	3302	<25	Sisin kuori/virionin ydin	mRNA:n transkriptio (polymeeraasikompleksi VP3 kanssa).
2	VP2	2690	120	Sisin kuori/virionin ydin	Aktivoi VP1 ja VP3 - sdRNA synteesin, ei-neutraloiva antigeeni.
3	VP3	2591	<25	Sisin kuori/virionin ydin	mRNA:n transkriptio (polymeeraasikompleksi VP1 kanssa).
4	VP4 (VP5+VP8)	2362	120	Ulompi kuori/kapsidi	Solukiinnittyminen, neutraloiva antigeeni, trypsiinillä pilkkoutuva. VP5 on virulenssitekijä. VP8 on pintaauke.
5	NSP1	1611	0	Ei rakenneproteiini	Interferonien vastustaja, sinkkisormi.
6	VP6	1356	780	Sisempi kuori/kapsidi	Kapsidiproteiini, ei-neutraloiva antigeeni, (tärkein IgA:n kohde).
7	NSP3	1104	0	Ei rakenneproteiini	Sitoutuu RNA:han, estää isäntäsolun translaation.
8	NSP2	1059	0	Ei rakenneproteiini	Muotoilee viroplasman yhteen NSP5 kanssa, ei-neutraloiva antigeeni. Osallistuu RNA:n replikaatioon.
9	VP7	1062	780	Ulompi kuori/kapsidi	Neutraloiva antigeeni, glykoproteiini.
10	NSP4	751	0	Ei rakenneproteiini	Enterotoksiini, glykoproteiini, uloimman kapsidin kokoonpano, ei-neutraloiva antigeeni.
11	NSP5+NSP6	667	0	Ei rakenneproteiini	Muotoilee viroplasman yhteen NSP2 kanssa. NSP5 on emäksinen fosfoproteiini. NSP6 esiintyy viroplasmassa.

Genomijaokkeiden positiivisäikeinen RNA alkaa 5'-pään guaniinilla ja loppuu 3'-päähän sytosiiniin. 3'- ja 5'-päiden ei-koodaavat, vahvasti konservoituneet sekvenssialueet vaihtelevat eri geeneillä. Poly-(A)-häntä eli polyadenyylaatiosignaali puuttuu rotaviruksen 3'-päähän kaikista jaokkeista. Rotaviruksen sekvenssi sisältää suuren määrän (58–67 %) adeniini (A) ja tymiini (T) -emäksiä. [5.]

### 2.3 Infektion tarttuminen ja kehittyminen

Rotavirusinfektio on hyvin tarttuva, ja akuutin infektion aikana ulosteeseen erittyy suuri määrä viruksia. Oireisen infektion aikana lapsi erittää jopa  $10^{11}$  viruspartikkelia yhtä ulostegrammaa kohti [10]. Hygieniatoimet, kuten käsien desinfiointi alkoholipitoisella käsihuuhteella, eivät luultavasti tehoa hyvin rotavirusinfektioihin. Rotavirus on hyvin kestävä virus, ja se selviää pitkiäkin aikoja elimistön ulkopuolella [12].

Rotavirus tarttuu useimmiten uloste-suu -reittiä. Infektion voi saada esim. viruksella kontaminoituneista elintarvikkeista tai huonon käsihygienian vuoksi. Lisäksi mahdollinen infektio voisi tapahtua viruksella kontaminoituneiden hengitystie-eritepisaroiden nielemisen kautta, mutta viruksen läsnäoloa hengitysteissä ei ole kuitenkaan koskaan osoitettu. Viruksen pääsystä suolistoon ei ole tarkkaa tietoa, koska virukset kestävät huonosti happoa. Viruksen olisi oltava resistentti mahahapolle tai sen olisi päästävä mahalaukun läpi jonkin neutraloivan aineen suojassa. Rotavirus on epävakaa, kun pH on alle neljän, ja se tarvitsee ainakin osittaisen mahahappojen neutraloimisen päästäkseen eteenpäin suolistoon. [3; 12.]

Suolistoon päässeän viruksen lisääntyminen tapahtuu suolen enterosyyteissä. Infektioitunut enterosyytti vaurioituu, jolloin nesteen ja ravintoaineiden imeytyminen häiriintyy. Limakalvolle muodostuu sekretorisia kryptasoluja, jotka ovat syntyneet vaurioituneiden enterosyyttien tilalle. Suolessa alkaa lisääntyä eritettävä neste ja elektrolyyttien määrä. Ruuansulatusentsyymien erityksen häiriintyminen alkaa vaikeuttaa imeytymistä, ja kun suolessa nousee osmolaliteetti, nesteen määrä lisääntyy ja näin syntyy runsas vesiripuli. Akuutin infektion aikana esiintyvän oksentelun mekanismi on huonosti tunnettu. Rotavirus ei lisääny suolen ulkopuolella, vaikka se voi kulkeutua suolesta myös verenkiertoon ja sieltä edelleen keskushermostoon. Rotavirusinfektioon joskus liittyvän enkefaliitin syntymistapaa ei tunneta. [11.]

### 2.4 Tauti ja oireet

Taudin itämisaika on noin kaksi vuorokautta ja taudin kesto yleensä alle viisi vuorokautta. Rotavirusinfektio on periaatteessa itsestään paraneva tauti. Saatu infektio aiheuttaa oksentelua, kuumetta, päänsärkyä ja väsymystä. Vaikeimpana oireena on vetinen ripuli, johon liittyy voimakkaita vatsakrampeja. Runsaan oksentelun ja ripuloinnin seu-

rauksena voi tapahtua elimistön kuivuminen. Vaarassa olevat alle vuoden ikäiset lapset on saatava hoitoon mahdollisimman nopeasti, jotta nesteytys hoito voitaisiin aloittaa. [11; 12.]

Ensimmäinen rotavirusripuli on tavallisin 6–24 kk:n ikäisillä lapsilla [13]. Ennen 6 kk:n ikää lapsi voi saada äidiltä vasta-aineet, jotka lieventävät taudinkuvaa. Ennenaikaisesti syntyneillä lapsilla on suurempi riski saada infektio, koska suojaavia vasta-aineita ei ole ehtinyt siirtyä äidiltä lapseen. Myös vanhemmat lapset voivat saada hoitoa vaativan ripulitaudin. Rotavirusinfektioista ensimmäinen eli ns. primaari-infektio on taudinkuvaltaan rajuin. Uudet myöhemmin saadut infektiot ovat lievempiä, koska immuunivaste on kehittynyt. Rotavirusimmunitetti koostuu sekä paikallisesta IgA-vasteesta, humoraalisista IgG-vasta-aineista että soluvälitteisestä immunitetista [3]. Lähes kaikki lapset saavat oireisen tai oireettoman infektion ennen kolmatta ikävuottaan. Erityisen hyvän suojan antaa oireinen rotavirustauti, koska myöhemmät tartunnat johtavat yleensä vain subkliiniseen infektiin, joka antaa osittaisen suojan myöhempiä tartuntoja vastaan. Aikuiset voivat myös saada infektion, mutta sen vaikutus ja oireet ovat lievemmät. Vaikka aikuinen olisi vähäoireinen, hän erittää elävää virusta ja voi tartuttaa tautia ympäristöönsä. Aikuisten kesken epidemioita esiintyy yleensä varuskunnissa ja vanhainkodeissa ja lisäksi ripulilapsia hoitava henkilökunta voi saada tartunnan. Immunitetin heikkeneminen myöhemmällä iällä voisi selittää vanhaintiepidemioita. [ 8; 11.]

## 2.5 Epidemiologia

Euroopassa suurin osa sairaalainfektiona ilmaantuvista ripuliepisodeista on rotaviruksen aiheuttamia. Rotavirusepidemioita esiintyy joka vuosi kevättalvella. Epidemia alkaa Etelä-Euroopasta ja leviää nopeasti Skandinaviaan. Rotavirustautia sairastaa talviaikana Euroopassa 2/3 lastensairaaloissa ja päivystyspoliklinikoilla hoidettavista ripulipotilaista. Lääkärikäynnit ja sairaalahoidot lisääntyvät huomasti rotavirusepidemian aikana. Euroopassa vuosittain n. 700 000 alle 5-vuotiasta lasta tarvitsee avoterveydenhuollon palveluja ja sairaalahoitoon joutuu joka vuosi n. 90 000 lasta. Rotavirusinfektioon EU:n alueella kuolee vuosittain 200–250 lasta. [11.]

Kehitysmaissa on 114 miljoonaa infektiotapausta vuodessa, ja niistä 20 miljoonaa on vakavia tapauksia. Kehitysmaissa suolistotulehdukseen menehtyy vuosittain 500 000–800 000 lasta [34]. Suurin osa kuolemantapauksia sijoittuu Intiaan, Kaakkois-Aasiaan

ja Afrikkaan [14]. Ripulit ja subkliiniset infektiot alkavat aikaisemmin ja reinfektiot ovat yleisiä [3].

Sen sijaan kehittyneissä maissa, joissa nestetasapainohäiriö pystytään hoitamaan, rotavirusinfektioon liittyvät kuolemat ovat yksittäisiä ja harvinaisia. Kehittyneissä maissa sairaalainfektion ilmaantuvuus on alle 2-vuotiailla 7.0–15.8/1000 sairaalahoitopäivää ja alle 5-vuotiailla 0.7–8.1/1000 sairaalahoitopäivää. [11.]

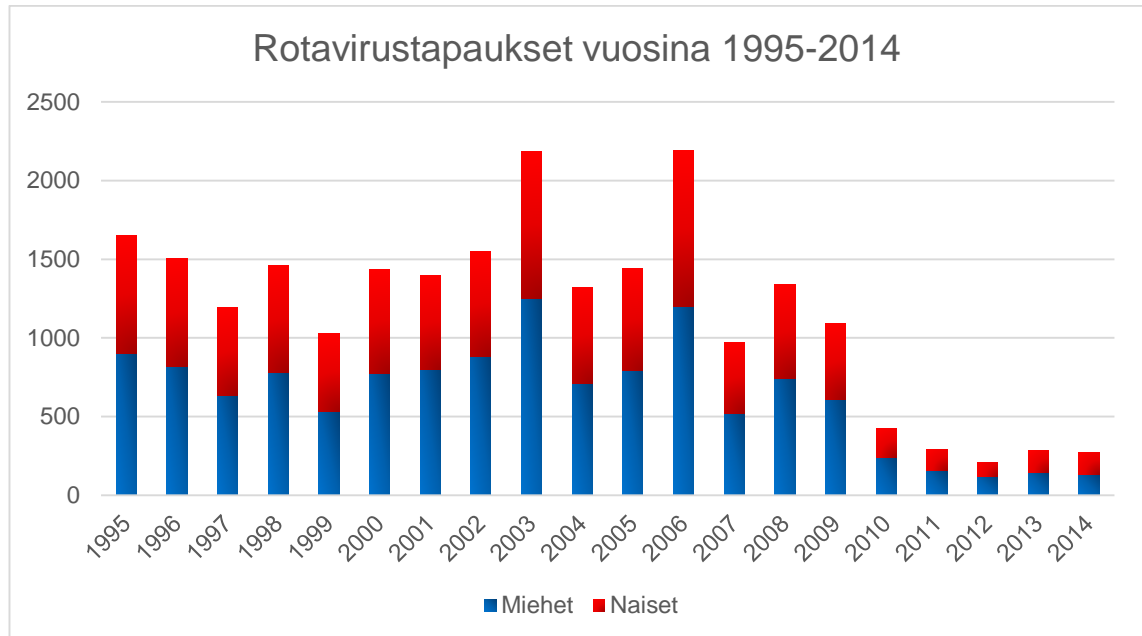
Suomessa epidemia kestää joulukuusta kesäkuuhun. Tästä poikkeuksellisesti vuosina 1985–1995 jokaisella 4 viikon jaksolla todettiin laboratorioissa varmennettuja rotaviruslöydöksiä. Syytä vuodenaikaisvaihteluun ei tiedetä [11]. Ennen rotavirusrokotteen ottamista kansalliseen rokotusohjelmaan v. 2009 rotavirusten aiheuttamat ripuliepidemiat sairastuttivat Suomessa vuosittain n. 20 000 alle 5-vuotiasta lasta. [8.]

1990-luvulla 5,6 % jokaisesta ikäluokasta joutui sairaalahoitoon ripulin takia. Alle 5-vuotiailla lapsilla oli vuosittain n. 3 600 sairaalahoitoa, joista rotaviruksen arvioitiin aiheuttavan 54 % eli suomalaisista lapsista 3 % joutui rotavirusinfektion vuoksi sairaalahoitoon. Rotavirus leviää sairaalaolosuhteissa suhteellisen helposti. Vuosina 1984–1995 rotavirusinfektioiden ilmaantuminen pysyi tasaisena. Ripulikuolemia sattuu Suomessa 0–2 vuosittain. [11.]

Kansanterveyslaitos asetti v. 2007 työryhmän, jonka tehtävänä oli arvioida rotaviruksen aiheuttamaa tautitaakkaa ja rokotteiden tehoa ja turvallisuutta sekä analysoida kustannus-vaikuttavuutta. Tutkimuksessa arvioitiin rotaviruksen osuutta suolistoinfektioiden aiheuttamista vuodeosastohoitojaksoista, poliklinikkakäynneistä ja perusterveydenhuollon lääkärikäynneistä. Terveystieteiden tutkimuskeskuksen palveluja tarvitsevia arvioitiin olevan alle 5-vuotiaiden ikäryhmässä 11 100. Rotavirustapausten arvioitiin aiheuttavan 2 400 sairaalahoitojaksoa, 3 700 sairaalan poliklinikkakäyntiä ja 9 000 terveyskeskuskäyntiä. Päiväkotilapsilla infektiota esiintyy enemmän kuin lapsilla keskimäärin. Suomalaisten tekemässä tutkimuksessa seurattiin 207 päiväkotilasta 6 kk:n ajan. Tutkimuksen lapset olivat 9–44 kk:n ikäisiä. Puolen vuoden aikana lapsille ilmaantui 98 ripuliepisodia, joista 40 % oli varmistetusti rotaviruksen aiheuttamia. Tutkimuksen mukaan rotavirusinfektioiden ilmaantuvuus oli 0,08 lapsikuukautta kohti eli 2,7/1000 lapsipäivää kohti. [11.]

Vuosina 1995–2009 laboratoriovarmistettuja rotavirustapauksia ilmoitettiin tartuntatauti-rekisteriin keskimäärin 1 400 vuodessa [13]. Vuonna 2009 kansalliseen rokotusohjel-

maan tullut rotavirusrokote tehosi jo vuonna 2010 varsin hyvin rotavirusinfektioihin (kuva 2). Suolistoinfektiot vähenivät 50 % ja laboratoriovarmistetut rotavirusinfektiot jopa 80 % [8].



Kuva 2. Rokotukset ovat selvästi vähentäneet infektiota Suomessa. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta.

Suomessa vuonna 2012 tavallisimmat taudinaiheuttajat ihmisillä olivat G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ja G9P[8] [15]. Yleisin rotavirus teollistuneissa maissa on G1P[8], jota tavataan enimmäkseen epidemiaikauden aikana [3]. Samat genotyypit ovat olleet vuosina 2009–2012 myös maailmanlaajuisesti yleisimpiä. Joitakin alueellisia eroja on tavattu [16]. Eri genotyyppien aiheuttamat kliiniset taudinkuvat ovat keskenään varsin samanlaiset. Kahden rotavirusten yhteisinfektion aikana voi syntyä uutta genotyyppiä. Uusi syntynyt genotyyppi voi aiheuttaa laajojakin epidemioita.

## 2.6 Ehkäisy ja rokote

Rotaviruksen aiheuttamaan vatsatautiin ei ole olemassa täsmälääkettä, ja infektio on periaatteessa itsestään paraneva tauti. Oireita lievitetään runsaalla juomisella. Tarttumisen riskiä vähennetään hyvällä käsihygienialla tai pesemällä kontaminoituneet tavarat yli 50 °C:ssa (30 min). Viruksen voi inaktivoida käsittelemällä 95 % etanolilla, joka poistaa virionin uloimman kuoren. [17.]



Rotavirusinfektion voi torjua rokotuksin. Suomessa ensimmäinen rotavirusrokotus annettiin Tampereen yliopistossa pikkulapsille vuonna 1983, mistä alkoivat laajat tutkimukset. Rokotetutkimuskeskuksessa rotavirusrokotteita on tutkittu jo 30 vuotta. Rotavirusrokotteen tiedetään lieventävän tai ehkäisevän tautia. Rokottamisen aloittamisen jälkeen rotavirusinfektion vuoksi Suomessa suurin osa sairaalahoitoon joutuvista potilaista on rokottamattomia lapsia. Professori Timo Vesikari toteaa tutkimusuutisessa [18], että kehitysmaissa rotavirusrokottaminen voisi estää 200 000 – 300 000 lapsen kuoleman vuosittain.

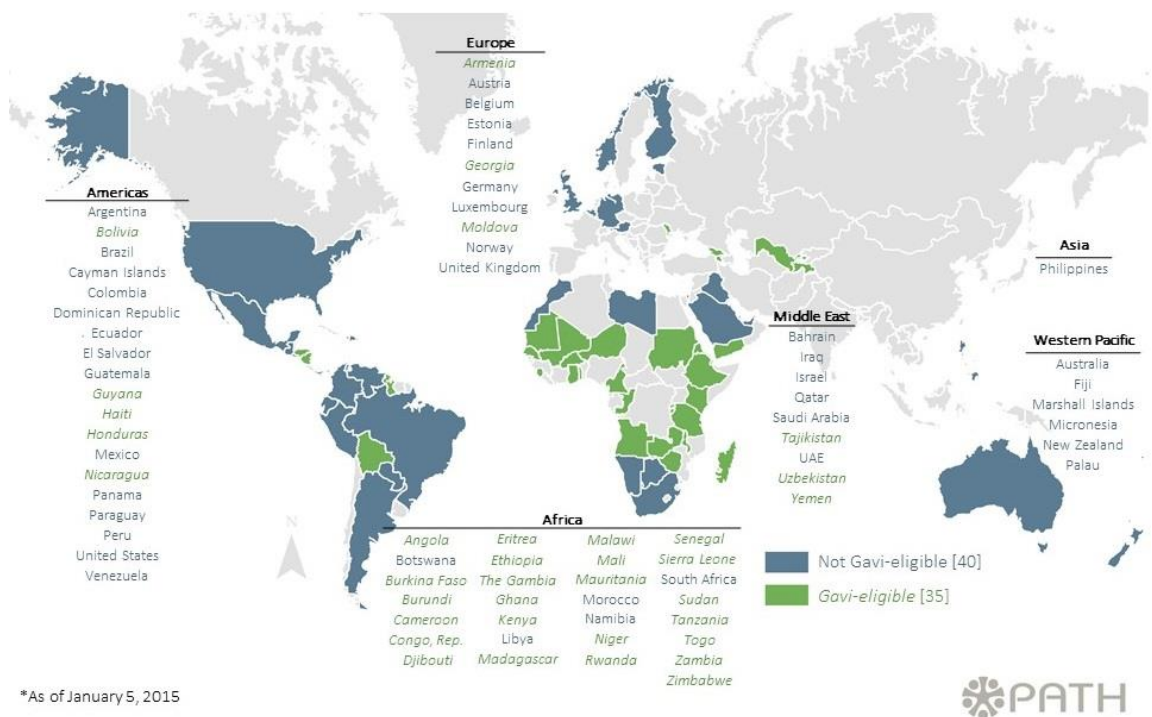
Yhdysvaltojen markkinoille tuli vuonna 1998 ensimmäinen rotavirusrokote (RotaShield), joka oli reesusapinan rotaviruksesta johdettu tetravalentti reassortantti elävä oraalirokote. Rokotuksen haittavaikutuksena ilmennyt suolentuppeuma esiintyi n. 1:10 000 rokotetulla, minkä takia se vedettiin pois markkinoilta. Vuosien 2004–2006 aikana saatiin kehitettyä nykyiset rotavirusrokotteet [3]. Rokotteet RotaTeq® (Sanofi Pasteur MSD) ja Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals) ovat suun kautta annettavia valmisteita. Rotarix®-rokote on elävä, heikennetty, monovalentti (G1), ihmisperäinen rotavirusrokote. Rokotetta suositellaan annettavaksi kaksi kertaa, 2 ja 4 kk:n ikäisille vauvoille. Tämän rokotteen tehokkuus vakavaa gastroenteriittiä vastaan on 95 %. Toinen rokote, Rotateq®, on elävä heikennetty, pentavalentti (G1-4, P[8]), vasikan rotavirusperäinen reassortanttirokote. Rokote antaa sisältämistään virustyypeistä huolimatta ristisuoja eri rotavirustyyppien aiheuttamaa vaikeaa ripulitautia vastaan [8]. Rokotetta annetaan kolmesti, 2, 3 ja 5 kk:n ikäisille vauvoille. Rokotteen tehokkuus vakavaa gastroenteriittiä vastaan on 98 % [3]. Suomen markkinoille nämä rokotteet tulivat vuonna 2006 EMEA:n (Euroopan lääkevirasto) hyväksymänä, ja molemmat rokotteet antavat hyvän ristisuoja eri rotavirustyyppien vastaan. Kokonaistilanteen parantamiseksi ja sekä lasten että perheiden elämänlaadun kohentamiseksi rotavirusrokote Rotateq® otettiin Suomessa osaksi kansallista rokoteohjelmaa 1.9.2009. THL:n suositus on, että rokotetta annetaan 2, 3 ja 5 kk:n iässä. [11; 19.]

Ennen rotavirusrokotuksia lasten infektoita oli 50 % enemmän kuin rokotuskauden jälkeen [20]. Rotavirusrokotusohjelman korkean rokotuskattavuuden takia tautia yleisimmin aiheuttaneet rotavirustyyppit mahdollisesti harvinaistuvat. Tapausten väheneminen johtaa noroviruksen nousuun yleisimmäksi taudinaiheuttajaksi pienillä lapsilla. Tampereen yliopiston Rokotetutkimuskeskuksessa on kehitetty yhdistelmärokote, joka suojaisi sekä norovirukselta että rotavirukselta. Rokote on tuotannossa ja ensimmäiset

turvallisuus- ja immunogeenisuustutkimukset aikuisilla alkavat Suomessa todennäköisesti vuonna 2015. [21.]

Pienten lasten rokottaminen on johtanut siihen, että suurempi osuus infektioista esiintyy vanhemmissa ikäryhmissä. Vuonna 2013 tapauksista 52 % esiintyi 5 vuotta täyttäneillä, kun ennen rokotuksia vanhemmat ikäryhmät ovat vastanneet korkeimmillaan noin 10 %:sta tapauksista. Ennen rokotuksen aloittamista ilmaantuvuus oli 460/100 000 ja näistä suurin osa oli alle 5-vuotiaita lapsia. Rokotuksen jälkeen vuonna 2013 ilmaantuvuus oli 44/100 000. Rokotukset ovat selvästi vähentäneet perusterveydenhuollon palveluiden käyttöä ja vanhempien työstä poissaoloja sekä hoitoon liittyviä rotavirusinfektioita. [15.]

Rotavirusrokote on liitetty kansalliseen rokotusohjelmaan 5.1.2015 mennessä jo 75 maahan (kuva 3).



Kuva 3. Maailmanlaajuinen kartta eri maissa käyttöön otetuista rotavirusrokotteista. Gavi (The Vaccine Alliance) on kansainvälinen järjestö, joka kokoaa yhteen julkisen ja yksityisen sektorin kanssa yhteisen tavoitteen luoda yhtäläiset mahdollisuudet köyhiin maihin asuville lapsille. [22.]

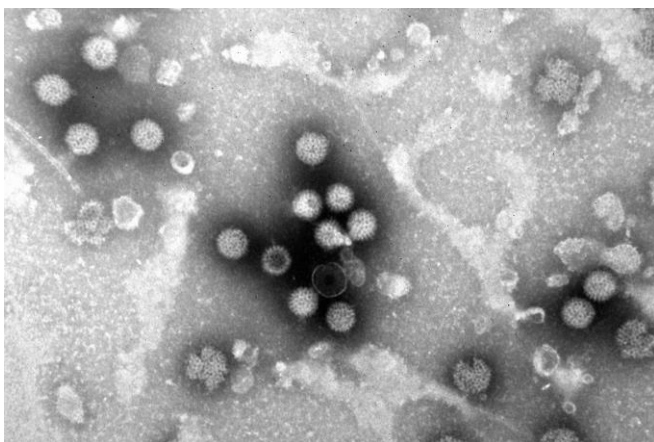
Viro ja Norja ovat Euroopan tuoreimpia maita, jotka ovat juuri liittyneet rokotusohjelmaan. [22.]

## 2.7 Diagnostiikka

Rotavirusdiagnostiikkaa tekevät kliiniset laboratoriot ilmoittavat tartuntatautilain ja -asetuksen velvoittamina rotaviruslöydöksensä THL:n ylläpitämään valtakunnalliseen TTR:iin [8]. Se on ollut toiminnassa vuodesta 1995 alkaen. Laboratoriot tekevät ilmoitukset rekisteriin n. 70 nimetyn taudinaiheuttajamikrobin löydöksistä. Ripulin aikana rotaviruksen osoitus on suhteellisen helppoa, koska ulosteessa oleva virusmäärä on suuri. Rotaviruksen havaitsemiseksi sopiva näytteenottoajankohta on 3–5 päivää oireiden alkamisesta [20]. Potilaan ulostenäytteestä voidaan todeta rotavirukset (kuva 4) elektronimikroskopiolla (EM). EM:n etu on se, että sen avulla voidaan havaita myös muita viruksia. [3.]

Lateksiagglutinaatiomenetelmä on nopea, mutta ei niin spesifinen kuin entsyymi-immunologia. EIA-menetelmä perustuu rotavirusspesifisten IgA-vasta-aineiden osoittamiseen, ja siitä on olemassa liuskatestiversio, joka soveltuu pikadiagnostiikkaan. Rotaviruksen RNA-segmentit voidaan osoittaa suoraan ulostenäytteestä polyakryyliamidielektroforeesin avulla. Virusserologista menetelmää käytetään rotavirusinfektion toteamiseen pariseeruminäytteistä, jossa käytetään antigeeninä eläinten (lähinnä apinan) rotaviruksia, joilla on ihmisen rotavirusten kanssa ristireagoiva ryhmäantigeeni (VP6). Tähän käytetään komplementinsitoutumiskoetta. [3.]

Rotavirusinfektio diagnosoidaan osoittamalla ulostenäytteestä rotavirusantigeeni pikatestin avulla. Aiemmin käytettyyn elektronimikroskopiaan verrattuna menetelmien herkkyys rotaviruksen suhteen on 92 % ja tarkkuus 99 %. [20.]



Kuva 4. Ulostenäytteessä näkyvät rotaviruspartikkelit (EM). Kuva on saatu HUSLABin Virologian yksiköstä.

Tutkimuslaboratorioissa käytetään viljely- ja geenimonistusmenetelmiä. Pikatestien avulla ei saada selville rotaviruksen tarkkaa tyyppiä, joten rotavirustyyppitys perustuu molekyylogeneettisiin analyyseihin. Rotaviruksen nukleiinihappo voidaan osoittaa suoraan ulosteesta PCR-menetelmän avulla, jolloin rotaviruslöydösten määrä on suurempi kuin tavanomaisilla menetelmillä [3]. RT-qPCR on herkin kaikista tehtävistä analyyseistä, koska sen avulla voidaan todeta hyvinkin pienet määrät virusta ja vieläpä reaaliaikaisesti.

Suomessa rotavirusseuranta varten on julkaistu THL:n asiantuntijatyönä seurantakäsikirja, joka tarjoaa tietoa seurantajärjestelmästä, määritelmistä ja ohjeista kliinisen mikrobiologian laboratorioille ja sairaaloille, jotka osallistuvat valtakunnalliseen rotavirusinfektioiden seurantaan. [8.]

### 3 Tavoite

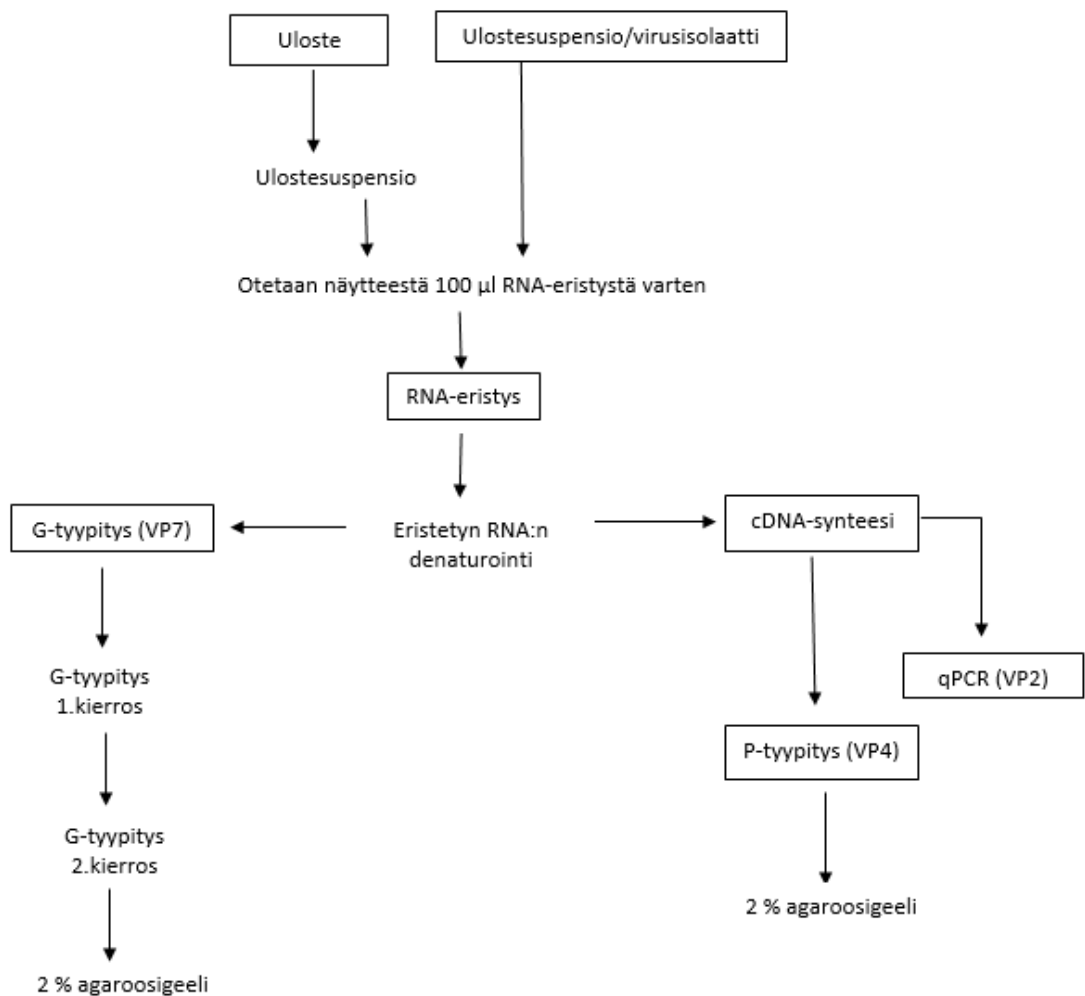
Rotavirusseuranta perustuu kliinisten laboratorioiden ilmoittamiin rotaviruslöydöksiin. Kantakokoelman tavoitteena on molekyylogeneettinen tyyppitys ja siinä tunnistetaan ne rotavirusgenotyypit, jotka rokotuksista huolimatta aiheuttavat edelleen sairastumisia ja sairaalahoitoa vaativaa akuuttia gastroenteriittiä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää:

1. Rotavirusten aiheuttamaa sairastuvuutta eri ikäryhmissä.
2. Vuoden 2013 aikana Suomen väestössä kiertävät rotavirusgenotyypit ja niiden jakaumat.
3. Rokotuksen suoja rokotuksessa olevia genotyyppijä vastaan.
4. Esiintykö uusia genotyyppijä/reassortantteja.

#### 4 Materiaalit, menetelmät ja työn suoritus

Potilasnäytteiden esikäsitteilyn jälkeen kantakokoelmanäytteistä eristettiin virus-RNA käyttäen QIAcube-laitetta tai Omega Biotekin RNA-eristys-kittiä. Eristettyä RNA:ta käytettiin cDNA-synteesissä ja RT-qPCR:ssä, joka tunnistaa hyvin pienetkin määrät virus-  
ta. Positiiviset löydökset tyyhitettiin geneettisesti. Rotaviruksen genotyyppispesifisissä PCR-menetelmissä G-tyypityksessä käytettiin denaturoitua RNA:ta ja P-tyypityksessä RNA:sta kopioitua cDNA:ta. PCR-tuotteet tarkastettiin ajamalla agarosigeelielektroforeesiajo. Prosessikaaviossa (kuva 5) on esitetty työvaiheiden järjestys.



Kuva 5. Rotavirusten molekyyli diagnostiikka THL:ssä.

#### 4.1 Laitteet ja reagenssit

Taulukossa 2 on listattu työssä käytetyt laitteet ja niiden toimittajat.

Taulukko 2. Menetelmissä käytetyt laitteet.

Laite ja malli	Toimittaja
koeputkisekoittaja, Vortex Genie	VWR
jäähdyttävä sentrifugi, Jouan CR 3i	Thermo Electron Oy
pöytäseentrifugi, Eppendorf 5424	AH Diagnostics
lämpöblokki, Techne Dri-Block, DB-2A	Sigma-Aldrich
QIAcube-eristysautomaatti	Qiagen
PCR-laite, Bioer XP cycler	Fisher Scientific
real-time PCR-laite, Mx3005P	AH Diagnostics
PCR-laite, PTC-200	Finnzymes
elektroforeesi-laite, Power supply EPS 601	Pharmacia Biotech
geelinkuvausjärjestelmä, Genius	VWR
UV-pöytä, GenoView	Oriola Oy

Taulukossa 3 on menetelmäkohtaisesti käytettyjen reagenssien kataloginumerot, valmistajien tiedot ja säilytyksen kannalta huomioitavat asiat.

Taulukko 3. Menetelmissä käytetyt reagenssit.

Menetelmä	Reagenssi	Katalogi-numero	Valmistaja	Säilytys
<b>Ulostenäytteen esikäsitely</b>	PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)		LATU	+2 - +10 °C
<b>RNA-eristys Rneasy®</b>	Rneasy Mini Kit	74106	Qiagen	RT
	β-merkaptotetanol	63690	Fluka Biochemica	+2 - +8 °C
	Etanoli 70 % (puhtausaste Aa)		Berner	RT
<b>RNA-eristys Omegan kitti</b>	E.Z.N.A.® Total RNA Kit	R6834-02	Omega	RT
	Etanoli 99,5 % (puhtausaste Aa)		Berner	RT
	DEPC - H <sub>2</sub> O		LATU	+2 - +8 °C
<b>Rotavirusten RT-qPCR</b>	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	4374967	Applied Biosystems	alle -18 °C, valolta suojattuna
	Sigma-H <sub>2</sub> O	W4502	Sigma	+2 - +10 °C
	Taqman® Universal PCR Master Mix	4304437	Applied Biosystems	+2 - +8 °C
<b>Genotyyppitys</b>	QIAGEN® One-Step RT-PCR Kit	210212	Qiagen	alle -18 °C
	RNasin Inhibitor - entsyymi, 40 U/μl	N211B	Biofellow	alle -18 °C
	QIAGEN® HotStarTaq Plus Master Mix Kit	203643	Qiagen	alle -18 °C
<b>Agaroosigeelija</b>	Agaroosi-jauhe	50005	Lonza	RT
	Etidiumbromidi tippapullo, 0,5 μg/ml		VWR	RT, valolta suojattuna
	10 x TBE-puskuri		LATU	RT
	DNA:n kokomarkkeri, generuler 100 bp DNA ladder mix		Fermentas	laimentamattomana -18 °C:ssa ja laimennettuna +2 - +8 °C:ssa
	5 x DNA-loading buffer		LATU	RT
	H <sub>2</sub> O, tislattu vesi		LATU	RT



## 4.2 Näyttemateriaali

Rotavirus on kuulunut mikrobikantakokoelmaan 1.5.2013 alkaen. Ensimmäisten näytteiden näytteenottopäivät olivat 10.5.2013 alkaen. Rotaviruspositiiviset näytteet tulivat rotavirusdiagnostiikkaa tekeviltä laboratorioilta. Virusinfektiot-yksikköön saatiin vuoden 2013 loppuun mennessä yhteensä 73 potilasnäytettä. Tutkittava materiaali koostui 53 ulostenäytteestä, 14 ulostesuspensiosta ja 6 virusisolaatista. Kahden virusisolaatin näytteenottopäivämäärät olivat kuitenkin 10.4.2012 ja 12.12.2012.

## 4.3 Referenssimateriaalit ja kontrollit

Työssä negatiivisena kontrollina käytettiin vesikontrollia (*Sigma water for molecular biology*), joka laitettiin jokaiseen työhön viimeiseksi näytteeksi. Kontrollin puhtaus varmistettiin aina seuraavassa PCR-työssä. Ensimmäinen negatiivinen kontrolli lisättiin RNA-eristysvaiheessa. Toinen negatiivinen kontrolli lisättiin komplementaarisen DNA:n valmistusvaiheessa ja myöhemmin jokaisessa PCR-vaiheessa.

Positiivisena kontrollina käytettiin tunnettua, vahvasti rotaviruspositiivista näytettä (Norian vesiepidemia pooli 1:1, G1P[8]), josta tehtiin yhdellä kerralla monta RNA-eristystä. Positiivinen kontrolli-RNA säilytettiin alle -70 °C:n lämpötilassa. Tunnettu positiivinen kontrolli-RNA ensin denaturoitiin ja denaturoidusta RNA:sta kopioitiin joka työssä cDNA. Kopioitua cDNA:ta käytettiin qPCR-vaiheessa positiivisena kontrollina laimentamattomana ja 1:10 laimennoksena. Genotyyppitykseen positiivinen kontrolli otettiin mukaan vain tarvittaessa.

## 4.4 Työturvallisuus ja työtilat

Virusnäytteitä käsiteltiin työturvallisuusohjeita noudattaen. Kaikki työvaiheet tehtiin suojakaapeissa ja käytettiin työtakkia sekä suojakäsineitä. RNA-eristyslaboratoriossa veto-kaapin työtaso ja käytettävät pipetit pyyhittiin puhdistusliuoksilla (0,2 % klorilli ja etanoli) ennen työn aloittamista ja työn lopettamisen jälkeen. PCR-mix- ja templaattilaboratoriossa suojakaappien työtasot pyyhittiin 0,2 % klorillilla ja sitten Desinfektol-P-liuoksella ennen työskentelyä ja työn jälkeen. Pipetoitaessa näytteitä, suodatinkärkiä vaihdettiin aina näytteiden välillä puhtaisiin ja suojakäsineitä vaihdettiin tarvittaessa. Kaikki reak-

tioseokset valmistettiin PCR-mix-laboratorion suojakaapissa. cDNA- ja RNA-näytteet lisättiin reaktioseokseen PCR-templaattilaboratorion suojakaapissa. Suojakaappeja pidettiin päällä työskentelyn ajan. Työskennellessä käytettiin ainoastaan näihin tiloihin tarkoitettuja työtakkeja ja tarvikkeita. Agarosigeeliä valmistaessa käytettiin nitrilihanskoja ja UV-valolta suojauduttiin pitämällä kasvoilla visiiriä.

#### 4.5 Ulostenäytteen esikäsittely

Ulostenäytteen esikäsittely tarkoittaa näytteen saattamista nestemuotoon, jotta siinä olevat taudinaiheuttajat saataisiin erilleen muusta materiaalista. Fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen (PBS) avulla valmistettiin ulostesuspensiot.

##### Ulostesusension teko

15 ml:n Falcon-putkeen kaadettiin 1 ml PBS ilman Ca ja Mg, johon siirrettiin noin 0,1 ml ulostenäytettä. Näyte vorteksoitiin 2 min, seisotettiin 2 min ja sentrifugoitiin 2 500 rpm 2 min. Supernatantti siirrettiin 2 ml:n kierrekorkilliseen putkeen, josta otettiin 100 µl RNA-eristystä varten. Loput ulostesusensiosta pakastettiin -70 °C:seen.

#### 4.6 Virus-RNA:n eristys

Nukleiinihappojen puhdistukseen käytetään monia eri tapoja. Pääasiana on saada puhdas nukleiinihappo erilleen muusta materiaalista. RNA-eristys alkaa viruksen isäntäsolun hajottamisella puskurilla, lyysayksellä, jotta virus-RNA:ta pystytään käsittelemään. RNA-eristyksessä saostetaan nukleiinihapot esimerkiksi etanolilla, jolloin sentrifugoitaessa näytteen epäpuhtaudet jäävät liuokseen ja saostetut nukleiinihapot voidaan liuottaa uuteen puskuriliuokseen. Eristettävää RNA:ta on puhdistettava useaan kertaan pesemällä, jotta näytteessä olevat epäpuhtaudet saadaan erilleen RNA:sta. Ennen PCR:ää on RNA käänteistranskriptoitava DNA:ksi, jotta sen monistus onnistuisi polymeraasiketjureaktiolla.

Tässä työssä eristettiin virus-RNA rotaviruspositiivisista näytteistä käyttäen QIAcube-laitetta, jossa lyysauspuskurin lisäys tehtiin manuaalisesti, mutta sen jälkeen reagensien lisäykset tapahtuivat QIAcube-eristysautomaatin toimesta. Toisena menetelmänä

käytettiin kaupallista Omegan kittiä (E.Z.N.A.® Total RNA Kit I). Tutkittavana materiaalina oli näytteestä otettu 100 µl:n erä.

Ensimmäisten rotaviruskantakokoelmanäytteiden RNA-eristys osoittautui hankalaksi QIAcube-eristysautomaatilla, aiheuttaen kontaminaatioita. Työssä siirryttiin eristämään RNA:t käsin, Omegan kitillä. Myöhemmässä vaiheessa Metropolian kehittämisprojektin (Rotavirusnäytteiden RNA-eristys QIAcube®-laitteella, Alena Kaijalainen) ja Virusinfektiot-yksikön osana olevan menetelmäkehitys-projektin avulla löydettiin menetelmän ongelmakohdat. Ulostesuspensio-ohjetta parannettiin ja kontaminaatio-ongelmasta päästiin eroon.

#### 4.6.1 Rneasy®

Rotavirusten RNA eristettiin käyttäen kaupallista kittiä (Rneasy®, Qiagen) ja eristysautomaattia (QIAcube®, Qiagen). RNA eristyksessä näytteet ensin lyysattiin ja homogenisoitiin voimakkaasti denaturoivaa guanidiini-isotiosyanaattia sisältävällä puskurilla, joka välittömästi inaktivoi RNAasit. Etanolia lisättiin, jotta RNA paremmin sitoutuisi suodatinputken silikageelimembraanin. Epäpuhtaudet pestiin pois pesupuskureilla ja lopuksi RNA eluoiitiin membraanista vedellä.

#### QIAcube® laite

Laitteella voidaan eristää ja puhdistaa genomista DNA:ta, plasmidi-DNA:ta, RNA:ta, viraalisia nukleinihappoja ja proteiineja. Näytteiden esikäsittelyjä voi myös suorittaa laitteella. Qiagenilta on saatavilla monenlaisia kittejä eri tarkoituksiin ja protokollat ovat helposti ladattavissa verkkosivuilta. Kuva 6 havainnollistaa paremmin laitteen rakennetta.



Kuva 6. QIAcube-eristysautomaatti.

QIAcube sisältää monia eri toimintoja tekeviä osia: sentrifugin, lämmitettävän ravistelijan, pipetointijärjestelmän ja robottimaiset pihdit. Laite voi suorittaa monimutkaisempia-kin prosesseja täysin automaattisesti. Laitteen sentrifugissa on pyörimisliikkeeseen mukautuvat keinoosat, joissa on paikat 12 näytteelle. Robottikäsivarren avulla QIAcube voi käsitellä sentrifugissa olevia näytteitä käyttämällä joko pipetointisysteemiä tai robottimaisia pihtejä. Kertakäyttöisissä roottorisovittimissa on paikat sekä näyteputkille, sentrifugipylväille että näytteen homogenisoimiselle. Lämmitettävä ravistelijä mahdollistaa 2–12 näytteen automatisoidun lyysauksen. Ravistelijan sovittimen numeroiduille paikoille sopivat 2 ml:n näyteputket. Näyteputkien korkit asetetaan ravistelijan niille tarkoitettuihin aukkoihin, jolloin putket pysyvät paikoillaan. QIAcubella voi käsitellä 2–12 näytettä samanaikaisesti. Käytettävä protokolla valitaan kosketusnäytöllä. Laitteeseen täytetään tarvittavat muovitarvikkeet, reagenssit ja viimeiseksi näytteet. Laitteen ovi suljetaan, minkä jälkeen laite käynnistää ohjelman. Ennen ohjelman aloitusta QIAcube tarkistaa, että kaikki reagenssit, näyteputket, kärjet ja adapterit on sijoitettu oikein.

### Työn suoritus

RNA-eristyksen esivalmistelut tehtiin vetokaapissa, siltä osin kun työskenneltiin lyysauspuskurin kanssa. Lysis Buffer RLT:hen tehtiin  $\beta$ -merkaptetanolin lisäys ennen käyttöä (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptetanolia / 1 ml RLT-puskuria).  $\beta$ -merkaptetanoli on pelkistin, joka denaturoi RNA:ta vähentämällä disulfididisidoksia ja tuhoaa alkuperäisen muodon jota tarvitaan entsyymien toiminnassa. Lyysauspuskuriä jaettiin valmiiksi 350  $\mu$ l:n eriin näyteputkiin (Sample Tubes RB, 2 ml). Aloitettaessa uutta RNeasy-kittiä Wash Buffer RPE-pulloon lisättiin nelinkertainen määrä etanolia (96–100 %).

Reagenssipullot täytettiin ja laitettiin suljettuina reagenssipullotelineeseen omiin numeroituihin paikkoihinsa. Kärkipakkaukset laitettiin omille paikoilleen QIAcuben työtasolle. Rneasy-kitin mukana tulevat filteripylväät ja keräysputket laitettiin omille paikoilleen roottoriadaptereihin protokollan ohjesivun mukaisesti. Roottoriadapterit sijoitettiin sentrifugiin näyteputkien numerointia vastaaville paikoille.

Näytteestä otettiin 100 µl näyteputkeen (Sample Tubes RB), jossa oli 350 µl Lysis Buffer RLT + β-ME:a. Näytteet sekoitettiin koeputkisekoittajalla 5 s ajan, jonka jälkeen sentrifugoitiin putken pohjalle eppendorf-sentrifugilla. Negatiivinen kontrolli valmistettiin lisäämällä yhteen lyysiputkeen 100 µl kitin RNAasi-vapaata vettä. QIAcube loading chart -ohjeen mukaisesti täytettiin näyteputket paikoilleen numerointia vastaaville paikoille. Näyteputkien korkit avattiin ja korkit taitettiin omiin koloihinsa samalla kun näyteputket laitettiin paikoilleen. Lopuksi reagenssipullojen korkit avattiin puhtailla suojakäsineillä.

QIAcube-laitteen kansi suljettiin ja laitettiin virta päälle virtakytkintä painamalla. Käytössä oleva RNA-eristysprotokolla oli: purification of total RNA from easy-to-lyse animal tissues and cells, version 2. Eluutiilavuutena käytettiin oletusarvoa (50 µl), joten asetuksia ei muutettu. Ajon alussa laite tarkisti pulloissa olevat nestemäärät ja antoi ilmoituksen, jos pulloissa oli liian vähän tai liian paljon nestettä. Näytemäärästä riippuen eristysohjelma kesti 20–30 min.

Ajon päätyttyä kuitattiin ohjelman päättyminen ja suljettiin reagenssipullot puhtailla suojakäsineillä. Roottoriadapterit nostettiin yksitellen ulos, otettiin niistä keräysputki talteen ja laitettiin muut osat roskiin. Lopuksi poistettiin näyteputket ravistelijasta. Suljettiin laitteen kansi ja virta, sekä lopuksi tyhjennettiin ja pyyhittiin kärkikotelo puhdistusliuoksella.

#### 4.6.2 Omegan kitti

Omega Biotekin manuaalisen RNA-eristys-kitin (E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, Omega Bio-Tek, Doraville, GA, USA) menetelmä perustuu silikapohjaisen HiBind®- materiaalin reversiibeliin sitomisominaisuuteen. Näyte hajotetaan ensin denaturoivissa olosuhteissa, jolloin myös RNAasi pitäisi inaktivoitua. RNA sitoutuu HiBind®- kolonneihin, kun taas solujäänteet ja muut kontaminantit pestään pois. Lopuksi RNA voidaan eluoida talteen.

## Työn suoritus

Työssä sekoitettiin näyte nopeasti koeputkiravistelijalla, minkä jälkeen pipetoitiin 100 µl näytettä eppendorf-putkeen, jossa oli 350 µl TRK Lysis -puskuria. Liuosta sekoitettiin pipetillä edestakaisin 3 kertaa. Negatiivinen kontrolli valmistettiin lisäämällä yhteen lyy-siputkeen 100 µl kitin RNAasi-vapaata vettä. Kaikkiin numeroituihin putkiin pipetoitiin 350 µl 70 % etanolia ja vorteksoitiin. Näyte pipetoitiin HiBind® RNA-pylvääseen ja sentrifugoitiin n. 30 s 12 000 rpm. Pylväästä läpitullut neste kaadettiin jäteastiaan. Pylväät siirrettiin uusiin keräysputkiin ja pipetoitiin 300 µl RNA Wash Buffer I:tä. Näytteitä sentrifugoitiin n. 30 s 12 000 rpm ja läpitullut neste kaadettiin jäteastiaan. Näytteisiin pipetoitiin 500 µl RNA Wash Buffer I:tä, sentrifugoitiin n. 30 s 12 000 rpm ja kaadettiin läpitullut neste jäteastiaan. Tämän jälkeen pipetoitiin 500 µl RNA Wash Buffer II:ta, sentrifugoitiin n. 30 s 12 000 rpm ja kaadettiin läpitullut neste jäteastiaan. Pesu toistettiin Wash Buffer II:lla eli pipetoitiin 500 µl RNA Wash Buffer II:ta, sentrifugoitiin n. 30 s 12 000 rpm ja kaadettiin läpitullut neste jäteastiaan. Tyhjää pylvästä sentrifugoitiin n. 1 min 12 000 rpm. Siirrettiin pylväs 1,5 ml:n nimikoituun eppendorf-putkeen ja RNA eluoi-tiin pipetoimalla 50 µl RNAasi-vapaata vettä (E.Z.N.A.® Total RNA Kit) membraanin keskelle. Sentrifugoitiin n. 1 min 12 000 rpm. Eristetyt RNA:t säilytettiin +2 - +8 °C:ssa. Pidempiaikainen säilytys näytteille oli pakastettuna alle -18 °C:ssa tai alle -70 °C:ssa.

## 4.7 Detektiomenetelmät

### 4.7.1 Rotavirusten RT-qPCR (VP2)

Menetelmä perustuu lähteen [23] tieteelliseen julkaisuun ja se on validoitu ja akkreditoitu Virusinfektiot-yksikössä (SFS-EN ISO/IEC 17025; FINAS) ulostenäytteille.

Menetelmä on ns. diagnostinen testi, jolla tunnistetaan rotavirus kliinisistä näytteistä. Reaaliaikaisen testin tuottama tulos on joko ”näyte on rotaviruspositiivinen” tai ”näyte on rotavirusnegatiivinen”. Mitä aikaisemmin monistuskierroksen aikana käyrä nousee kynnysarvon yläpuolelle, sitä enemmän tutkittavassa näytteessä on viruksen perintöai-nesta. Jos näytteessä ei ole lainkaan tutkittavaa ainesta, käyrä jää kynnysarvon ala-puolelle.

Kahden putken menetelmällä tehtiin RT-qPCR:

### cDNA-synteesi

Työssä käytettiin High-Capacity cDNA Reverse Transcription -kittiä. Reaktioseoksen kaikkia reagensseja säilytettiin kylmäblokissa työskentelyn ajan. PCR-mix-laboratoriossa valmistettiin 2 x RT master mix ohjeiden mukaisesti. Reaktioseoksen pipetointiohje yhdelle reaktiolle on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. cDNA:n tekemiseen tarvittava reaktioseos.

Reagenssi	Tilavuus (µl/reaktio)
10x RT Buffer	2,0
25x dNT Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2

Reaktioseos sekoitettiin koeputkisekoittajalla ja siirryttiin PCR-templaattilaboratorioon. RNA-näytteitä pipetoitiin 10 µl puhtaaseen 0,5 ml:n eppendorf-putkeen ja RNA:ta denaturoitiin 5 min 97 °C lämpöblokissa. Denaturoimisen jälkeen putket jäähdytettiin jäällä 5 min. Kunkin denaturoidun kontrolli- ja näyte-RNA:n joukkoon 10 µl reaktioseosta, sekoittamalla muutaman kerran edestakaisin. Yhden reaktion kokonaistilavuus oli 20 µl. Joka työhön otettiin mukaan negatiivinen kontrolli-RNA ja positiivinen rotaviruskontrolli-RNA. Näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin pohjalle. Putket laitettiin Bioer XP cycler-laitteeseen ja käynnistettiin rotavirus cDNA -ohjelma (taulukko 5).

Taulukko 5. Rotavirus cDNA:n ajo-olosuhteet.

Vaihe	1	2	3	4
Lämpötila (°C)	25	37	85	4
Aika	10 min	120 min	5 s	∞

Valmiit cDNA:t säilytettiin jääkaapissa, mikäli niitä käytettiin saman päivän aikana. Pitkempiaikaisessa säilytyksessä näytteet laitettiin -70 °C:seen.

## qPCR-vaihe

Seuraavassa vaiheessa cDNA:sta monistettiin spesifisten forward- ja reverse- alukkeiden välinen jakso moninkertaiseksi reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä. Menetelmässä monistettava alue on noin 80 bp pitkä ja se sijaitsee rotavirusgenomin VP2-geenin 3' päässä. Monistus perustuu kaksoisleimatus fluorogeenisen koettimen käyttöön. Reportteri-leimana toimii FAM ja sen vaimentajana MGB sekä ei-fluoresoiva NFQ.

Rotavirusten suuresta geneettisestä variaatiosta johtuen PCR:ssä käytettiin viittä erilaista forward-aluketta (F1–F5) ja kahta erilaista reverse-aluketta (R1–R2), jotta mahdollisimman monet rotavirusgenomeista tunnistuvat ja monistuvat. Taulukosta 6 löytyy alukkeiden ja koettimen sekvenssit, missä vaihtuvat synteettiset nukleotidit: H=T tai C tai A ja R=A tai G.

Taulukko 6. Rotavirusten qPCR:ssä käytettyjen alukkeiden ja koettimen sekvenssit.

Koodi	Sekvenssi 5'→3'
Vp2-F1 (forward)	TCT GCA GAC AGT TGA ACC TAT TAA
Vp2-F2 (forward)	CAG ACA CGG TTG AAC CCA TTA A
Vp2-F3 (forward)	TCG GCT GAT ACA GTA GAA CCT ATA AAT G
Vp2-F4 (forward)	TGT CAG CTG ATA CAG TAG AAC CTA TAA ATG
Vp2-F5 (forward)	TCA GCT GAC ACA GTA GAA CCT ATA AAT G
Vp2-R1 (reverse)	GTT GGC GTT TAC AGT TCG TTC AT
Vp2-R2 (reverse)	GTT GGC GTC TAC AAT TCG TTC AT
Vp2-P (MGB koetin)	FAM - ATG CGC ATR TTR TCA AAH GCA A – MGBNFQ

Alukkeiden ja koettimen valmistaja oli DNA Technology A/S. Valmistetut 25 µM alukkeet ja 5,2 µM foliolla suojattu koetin tehtiin Sigma- H<sub>2</sub>O:een ja säilytettiin alle -18 °C:ssa.

Reaaliaikaisessa qPCR:ssä käytettiin Taqman® Universal Master Mix -kittiä ja kaikki reagenssit pidettiin kylmäblokkissa työskentelyn ajan. PCR-mix-laboratoriossa valmistettiin PCR-mix tarvittavalle määrälle näytteitä, pipetoimalla reagensseja taulukon 7 mukaisesti.



Taulukko 7. qPCR -reaktioseoksen ohje yhdelle reaktiolle.

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

Reaktioseos sekoitettiin koeputkisekoittajalla ja pipetoitiin 20 µl reaktioseosta kuhunkin PCR-stripin kuoppaan. Stripit pidettiin työskentelyn ajan PCR-mix-laboratorion kylmäblokkissa. Siirryttiin templaattilaboratorioon, jonka välitilassa laitettiin stripit templaattilaboratorion kylmäblokkiin. Näin ollen mix-laboratorion välineet pysyvät puhtaina ja näin vältetään kontaminaatioilta.

Työlistan mukaisesti pipetoitiin ensimmäisenä 5 µl negatiivista kontrollia, eli sigma-H<sub>2</sub>O:ta PCR-stripin kuoppaan. Seuraavaksi pipetoitiin 5 µl cDNA -näytteitä PCR-stripin kuoppiin. Viimeiseksi tehtiin positiivisesta kontrollista laimennos 1:10 ja lisättiin sekä laimennettu että laimentamaton kontrollikuoppiin. Stripit suljettiin, vorteksoitiin ja sentrifugoitiin. Stripit siirrettiin Stratagene Mx3005P-PCR -laitteeseen ja käynnistettiin rotavirus-ohjelma (taulukko 8).

Taulukko 8. Rotavirus qPCR -ajo-ohjelma.

Vaihe	<i>UNG Incubation</i>	<i>AmpliTaq Gold Activation</i>	<i>PCR</i>	
	<i>HOLD</i>	<i>HOLD</i>	<i>CYCLE (45 cycles)</i>	
			<i>Denature</i>	<i>Anneal/Extend</i>
Lämpötila	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Aika	2 min	10 min	15 s	1 min

Ajon jälkeen PCR-tuotteet laitettiin laitehuoneessa olevaan infektiotaaralliseen autoklaavijätöpussiin.

## Tulosten tulkinta

RT-qPCR tulokset analysoitiin Stratagenen MxPro-ohjelmalla. Kohdesekvenssin monistumista seurattiin FAM-leimalla ja kynnysarvona käytettiin 10 % laimentamattomasta positiivisesta kontrollista. Mikäli näytteen dRn-arvo kohosi yli kynnysarvon (noin 10 % laimentamattoman positiivisen kontrollin dRn-arvosta), näyte tulkittiin positiiviseksi. Mikäli näytteet olivat kynnysarvon rajalla, varmistettiin näytteet uusimalla työ. Mikäli näytteelle ei tullut Cq-arvoa, mutta positiivinen kontrolli oli positiivinen, näyte tulkittiin negatiiviseksi.

### 4.7.2 Rotavirusten genotyyppitys

Näytteissä olevat rotavirukset tyyhitettiin kansainvälisen seurantaverkoston (EuroRo-taNet) suosittelmien standardisoitujen molekyylogeneettisten menetelmien avulla.

Rotavirusten genotyyppitys perustuu kahden eri geenialueen, VP7 ja VP4, molekyylogeneettiseen analyysiin. Geenien koodaamat VP7- ja VP4-proteiinit sijaitsevat rotaviruksen pinnalla ja indusoivat infektion aikana spesifisiä vasta-aineita. Genotyyppitys tehtiin kahdelta eri genomien alueelta, koska rotavirukset esiintyvät luonnossa erilaisina reasortantteina. Tyyppitystulos ilmoitettiin aina VP7-alueen (G-tyyppi) ja VP4-alueen (P-tyyppi) yhdistelmänä.

Menetelmässä monistettiin VP7- ja VP-4-alueet genotyyppispesifisiä alukkeita käyttäen ja tehtiin PCR-tuotteiden kokoanalyysi. Genotyyppispesifisillä alukkeilla tunnistettiin yleisimmät G- ja P-tyypit: G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10 ja G12 sekä P4, P6, P8, P9, P10 ja P11. Jos G- tai P-tyyppi ei varmistu spesifisillä alukkeilla, voidaan tyyppitys tehdä monistamalla geenialue G- tai P-tyypin konsensus-alukkeilla ja sekvensoimalla saatu PCR-tuote.

Menetelmän alukkeet perustuvat viitteeseen [24] ja menetelmäolosuhteet Dosentti Leena Maunulalta (Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto, Helsingin yliopisto) saatuihin ohjeisiin. Menetelmä on kuvattu myös WHO:n manuaalissa [25].

### Rotavirusten P-tyypitys PCR (VP4)

P-tyypityksessä rotavirus-RNA:sta kopioitiin ensin komplementaarinen DNA (cDNA), jota seuraavaksi monistettiin PCR-menetelmällä genotyyppispesifisten alukkeiden avulla. PCR-menetelmässä käytettiin yksi forward-alue ja useita reverse-alueita (taulukko 9). Reverse-alueiden johdosta saatiin eripituisia tuotteita. Monistuvan alueen pituus riippui rotaviruksen P-tyypistä (P[6] 146 bp, P[11] 191 bp, P[8] 224 bp, P[9] 270 bp, P[4] 362 bp, P[10] 462 bp).

Taulukko 9. P-tyypityksessä käytetyt alukkeet ja niiden sekvenssit.

Koodi	Sekvenssi 5'→3'
VP4F	TAT GCT CCA GTN AAT TGG
P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC
P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA
P[8]	TCT ACT GGR TTR ACN TGC
P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC
P[10]	ATC ATA GTT AGT AGT CGG
P[11]	GTA AAC ATC CAG AAT GTG

P-tyypityksen näytteenä käytettiin cDNA:ta. Työssä käytettiin HotStarTaq Plus Master Mix -kittiä ja reaktioseoksen kaikkia reagensseja säilytettiin kylmäblokissa työskentelyn ajan. PCR-mix-laboratoriossa valmistettiin master mix (taulukko 10).

Taulukko 10. P-tyypityksen pipetointiohje yhdelle reaktiolle.

Reagenssi	Tilavuus (µl/reaktio)
HotStarTaq Plus Master Mix, 2x	10,0
VP4-F (100 µM)	0,1
P[4] (100 µM)	0,1
P[6] (100 µM)	0,1
P[8] (100 µM)	0,1
P[9] (100 µM)	0,1
P[10] (100 µM)	0,1
P[11] (100 µM)	0,1
RNase-vapaa H <sub>2</sub> O	8,3

Sekoitettiin PCR-mix koeputkensekoittajalla ja pipetoitiin 19 µl reaktioseosta 0,5 ml:n eppendorf-putkiin, minkä päälle pantiin 1 µl kutakin cDNA:ta. Sekoitettiin ja spinnattiin näytteet pohjalle. Näytteet ajettiin PTC-200 -laitteen monistusohjelmalla (taulukko 11).

Taulukko 11. P-tyypityksen ajo-ohjelma.

Vaihe	1	2	3	4	5	6
Lämpötila (°C)	95	94	45	72	72	6
Aika	15 min	1 min	2 min	1 min	10 min	∞
				39 sykliä		

### G-tyypitys SEMI-NESTED-PCR:llä (VP7)

G-tyypitys on kaksivaiheinen. Ensimmäisen vaiheen G-tyypityksessä rotavirus-RNA:sta tehtiin ensin RT-PCR G-alueelle genotyyppispesifisten VP7-F (forward-alue) ja VP7-R (reverse-alue) avulla. Monistettavan alueen pituus oli 881 bp. Toisessa vaiheessa käytettiin templaattina ensimmäisen vaiheen RT-PCR-tuotetta, jota monistettiin edelleen semi-nested -periaatteella. Toisessa vaiheessa käytettiin samaa reverse-aluketta kuin ensimmäisessä vaiheessa ja useita genotyyppispesifisiä forward-alukkeita. Taulukossa 12 on esitetty alukkeiden sekvenssit. Monistuvan alueen pituus riippui rotaviruksen G-tyypistä (G8 756 bp, G3 682 bp, G1 618 bp, G2 521 bp, G4 452 bp, G12 396 bp, G10 266 bp, G9 179 bp).

Taulukko 12. G-tyypityksen alukkeet ja sekvenssit

Koodi	Sekvenssi 5'→3'
VP7-F	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC
VP7-R	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC
G1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G
G2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G
G3	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G
G4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G
G8u	TTR TCG CAC CAT TTG TGA AAT
G9	CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC
G10	ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG
G12u	GGT TAT GTA ATC CGA TGG ACG

### Ensimmäisen vaiheen RT-PCR

RT-PCR:ssä käytettiin Qiagen One-Step RT-PCR -kittiä ja reaktioseoksen kaikkia reagensseja säilytettiin kylmäblokissa työskentelyn ajan. PCR-mix-laboratoriossa valmistettiin master mix ohjeiden mukaisesti (taulukko 13).

Taulukko 13. Ensimmäisen vaiheen pipetointiohje yhdelle reaktiolle.

Reagenssi	Tilavuus (µl/reaktio)
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 5x	5,0
dNTP-mix, 10 mM (Qiagen)	1,0
VP7-F (100 µM)	0,2
VP7-R (100 µM)	0,2
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1,0
RNasin Inhibitor, 40 U/µl	0,2
RNase-vapaa H <sub>2</sub> O	12,4

PCR-mix sekoitettiin koeputkensekoittajalla ja siirrettiin templaattilaboratorioon. G-tyypityksen ensimmäisen vaiheen näytteenä käytettiin denaturoitua RNA:ta. 5 µl kutakin RNA:ta denaturoitiin 0,5 ml:n eppendorf-putkissa 5 min +97 °C:seen lämpöblokissa, jonka jälkeen näytteitä jäähdytettiin 5 min jäällä. Kunkin denaturoidun kontrolli- ja näyte-RNA:n joukkoon pipetoitiin 20 µl reaktioseosta. Näytteet sekoitettiin ja spinnattiin pohjalle. Näytteet ajettiin PTC-200 -laitteen monistusohjelmalla (taulukko 14).

Taulukko 14. Ensimmäisen vaiheen ajo-ohjelma.

Vaihe	1	2	3	4	5	6	7
Lämpötila (°C)	42	95	94	50	72	72	6
Aika	60 min	15 min	1 min	1 min	1 min	10 min	∞
	35 sykliä						

### Toisen vaiheen PCR

Työssä käytettiin Qiagen HotStarTaq Plus Master Mix -kittiä ja reaktioseoksen kaikkia reagensseja säilytettiin kylmäblokissa työskentelyn ajan. PCR-mix-laboratoriossa valmistettiin master mix ohjeiden mukaisesti (taulukko 15).

Taulukko 15. Toisen vaiheen pipetointiohje yhdelle reaktiolle.

Reagenssi	Tilavuus (µl/reaktio)
HotStarTaq Plus Master Mix, 2 x	10,0
VP7-R (100 µM)	0,1
G1 (100 µM)	0,1
G2 (100 µM)	0,1
G3 (100 µM)	0,1
G4 (100 µM)	0,1
G8u (100 µM)	0,1
G9 (100 µM)	0,1
G10 (100 µM)	0,1
G12u (100 µM)	0,1
RNAasi-vapaa H <sub>2</sub> O	8,1

PCR-mix sekoitettiin koeputkensekoittajalla ja 19 µl reaktioseosta pipetoitiin 0,5 ml:n eppendorf-putkiin. Reaktioputket ja G-tyypityksen ensimmäisen vaiheen RT-PCR-tuotteet otettiin mukaan nested-PCR-laboratorioon. 1 µl tuotetta pipetoitiin seoksen joukkoon. Näytteet sekoitettiin ja spinnattiin pohjalle. Näytteet ajettiin PTC-200 -laitteen monistusohjelmalla (taulukko 16).

Taulukko 16. Toisen vaiheen ajo-ohjelma.

Vaihe	1	2	3	4	5	6
Lämpötila (°C)	95	94	42	72	72	6
Aika	5 min	1 min	2 min	1 min	10 min	∞
30 sykliä						

#### 4.8 Agaroosigeelielektroforeesi

Työssä valmistettiin agaroosigeeli, johon lisättiin etidiumbromidia valmistusvaiheessa. Geelin kaivoihin pipetoitiin DNA-näytteitä. Elektroforeesin aikana DNA-näytteet liikkuvat geelissä virran vaikutuksesta siten, että pienimmät DNA:t liikkuvat nopeammin ja isoimmat hitaammin. Samalla etidiumbromidi sitoutui DNA:han. Elektroforeesiajon jälkeen DNA:t detektoitiin UV-valolla. DNA-fragmenttien kokoa verrattiin geelille pipetoi-

tuun DNA-kokomarkkeriin. Näytteet pysyvät geelin kaivojen pohjalla 5 x loading puskurin ansiosta.

P- ja G-tyypityksen näytteet valmistettiin pipetoimalla 5 µl PCR-tuotetta ja 2 µl loading puskuria kuoppalevyille. Työtä varten valmistettiin 2 % geeli 1 x TBE-puskuriin, johon lisättiin 0,5 µg/ml (4 tippaa/200 ml agarosigeeliluosta) etidiumbromidia tippapullosta. PCR-tuotteet ajettiin geelille pipetoimalla kokonaisuudessaan 7 µl näytettä geelin eri kaivoihin. Ensimmäiseen ja viimeiseen kaivoon pipetoitiin 7 µl 100 bp DNA-kokomarkkeria. Elektroforeesi ajettiin 140 mA:n virralla 30–50 min ajan ajosuunnan ollessa negatiivisesta navasta positiiviseen. Ajopuskurina käytettiin 1 x TBE-puskuria.

G- ja P-tyypityksen PCR-tuotefragmenttien kokoa verrattiin tyyppispesifisiin amplikonikokoihin vertaamalla fragmenttien sijaintia lisättyyn DNA-kokomarkkeriin. DNA-kokomarkkerina käytettiin Generuler 100 bp DNA kokomarkkeria, jonka keskimäinen fragmentti erottui kirkkaampana kuin toiset ja oli kooltaan 500 bp. Muut fragmentit olivat 100 bp:n välein. Tulokset tulkittiin G- ja P- tyyppityksen amplikonikokojen perusteella (liite 1).

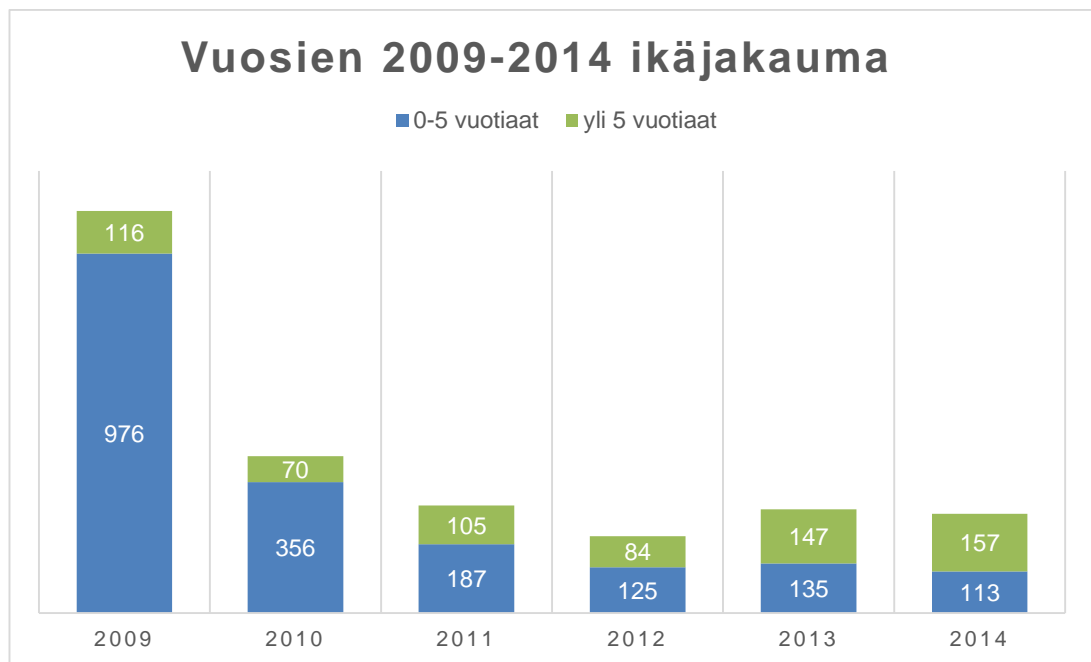
## 5 Tulokset

Rotavirusrokote on tullut Suomen markkinoille kokeiltavaksi vuodesta 2006. Kolmen vuoden siirtymävaiheen jälkeen huomattiin rotavirusrokotteen vähentävän lasten suolistotulehdusten määrää. Näin ollen päätettiin vuonna 2009 ottaa rokote kansalliseen rokotusohjelmaan. Rokotteen ei odoteta suojaavan kaikilta rotavirusinfektioilta vaan lieventävän oireita. Rokotusohjelman kattavuus on tällä hetkellä 95 % [26]. Rotavirusinfektioiden määrä ilmoitetaan THL:n Tartuntatautirekisteriin (TTR).

### 5.1 Tartuntatautirekisteriin ilmoitetut rotavirusinfektiot

TTR:n mukaan Suomessa todettiin rotavirusinfektioita vuonna 2013 yhteensä 282. Näistä 135 tapausta (47,9 %) olivat alle 5-vuotiaita, joista 74 tapausta (54,8 %) olivat poikia ja 61 tapausta (45,2 %) olivat tyttöjä. Vanhemmissa ikäryhmissä infektioita esiintyy tasaisesti vuosina 2013 ja 2014. Kun pienet lapset enenevästi rokotetaan, jäljelle jäävistä tapauksista suurempi osuus esiintyy vanhemmissa ikäryhmissä. 147 tapausta

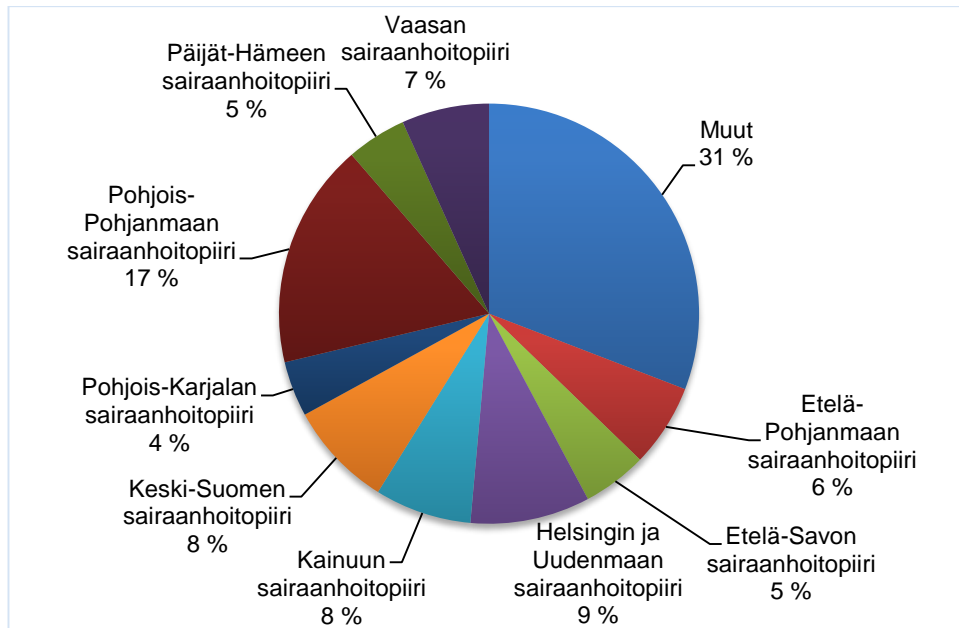
(52,1 %) oli vanhempaa ikäryhmää. Tilastotietokannan mukaan infektiot ovat laskeneet rokotamisen jälkeen alle 5-vuotiaissa lapsissa vuonna 2010 (kuva 7).



Kuva 7. Tartuntatautirekisteriin ilmoitettujen rotavirustapausten ikäjakaumat.

Sairaanhoitopiirien tapausilmoitusten mukaan rotavirusinfektiot, korkeasta rokotuskattavuudesta huolimatta, ovat havaittavissa ympäri Suomea (kuva 8). Ennen vuotta 2009 tapauksia oli ollut eniten Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirissä. Vuoden 2013 ja 2014 aikana eniten infektoita oli Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiirissä. Toiseksi yleisimmät alueet olivat Keski-Suomen sairaanhoitopiiri ja Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri.





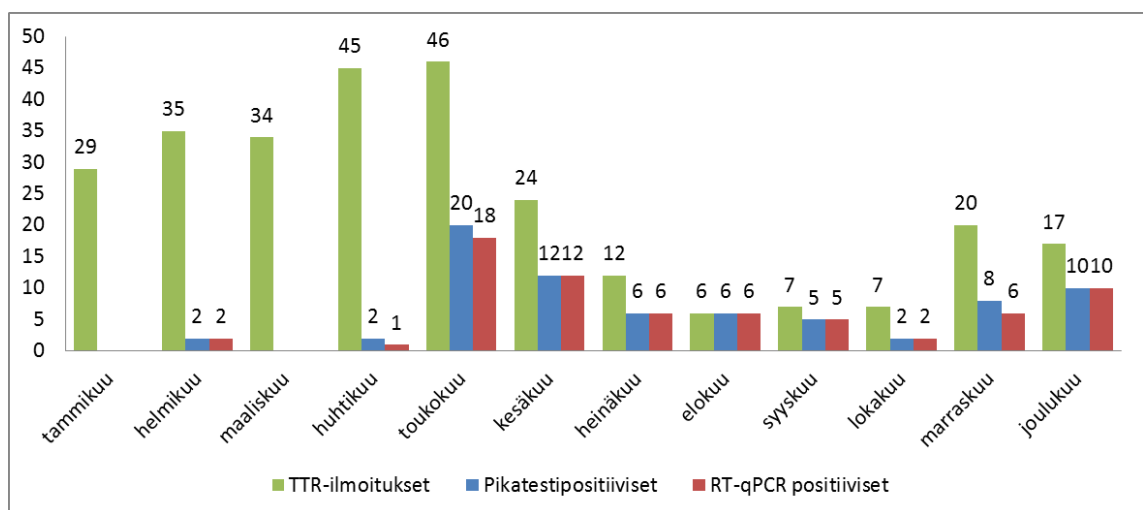
Kuva 8. Vuoden 2013 rotavirusinfektiot sairaanhoitopiireittäin (lähde TTR).

## 5.2 Rotaviruskantakokoelmanäytteet

Epidemian aiheuttajavirusten genotyypitys on tärkeää paitsi epidemiaselvityksen kannalta, myös väestössä liikkuvien viruskantojen seuraamiseksi. Rotavirusta seurataan mikrobikantakokoelmanäytteenä 1.5.2013 alkaen nojautuen tartuntatautilakiin ja -asetukseen. Kaikki rotaviruspositiiviset näytteet lähetetään THL:n Virusinfektiot-yksikköön kantakokoelmaan. Edellä mainituista 282 tapauksesta oli vuonna 2013 saapunut Virusinfektiot-yksikköön 73 (25,9 %) rotaviruspositiivista kantakokoelmanäytettä. Eniten näytteitä saatiin THL:ään touko- ja kesäkuun aikana (kuva 9), tartuntatautilain astuttua voimaan. Seuraavina kuukausina näytemäärä oli ollut vaihteleva. Vähäinen näytemäärä verrattuna TTR:n tilastotietokantaan tehtyihin ilmoituksiin voisi johtua siitä, että tartuntatautilaki oli astunut voimaan epidemiakauden jälkeen ja/tai diagnostiikkaa tekevät laboratoriot eivät lähettäneet positiivisia rotavirusnäytteitä. 73 rotaviruskantakokoelmanäytteistä 35 tapausta (47,9 %) oli alle 5-vuotiailta lapsilta. Alle 5-vuotiaiden tapausten suhde on sama verrattuna TTR:n tilastotietokantaan (47,9 %). Tyttöjen suhde poikiin oli 18 (51,4 %) ja 17 (48,5 %) tapausta. Vanhemman ikäryhmän osuus oli 38 tapausta eli 52,1 %. Alle 5-vuotiaista 24 potilaasta ei ole lähetetty rokotustietoa, 7 potilasta ei ollut saanut rotavirusrokotetta ja 5 oli saanut rotavirusrokotteen. Rokotuksesta huolimatta siis viidellä lapsella todettiin pikatestin avulla rotavirusinfektio.

### 5.2.1 Pikatestipositiivisten näytteiden varmistus RT-qPCR:llä

Rotavirusdiagnoosiikkaa tekevät laboratoriot tutkivat näytteet pääasiassa käyttäen pikatestejä. Pikatesteissä ristireagoimisen takia voi tulla vääriä positiivisia tuloksia, siksi näytteiden positiivisuus varmistettiin aluksi reaaliaikaisen RT-PCR:n avulla. Saatujen positiivisten näytteiden C<sub>q</sub>-arvojen vaihteluväli oli 13,99–33,31. Pieni C<sub>q</sub>-arvo tarkoittaa, että näytteessä on suuri virusmäärä. 73 kantakokoelmanäytteestä 5 (6,8 %) oli negatiivisia. Kuvassa 9 nähdään kuukausikohtaiset näytemäärät, TTR-ilmoitukset, pikatestipositiiviset näytteet ja RT-qPCR:n avulla Virusinfektioyksikössä varmistetut positiiviset näytteet.



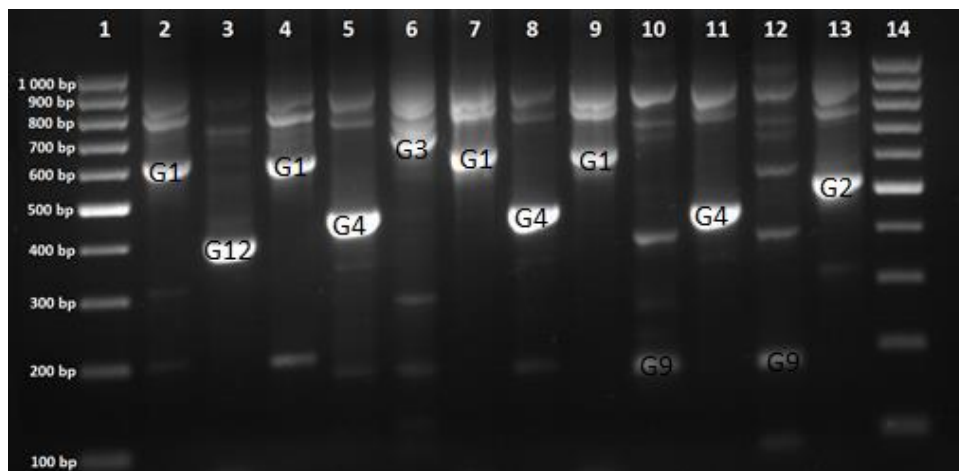
Kuva 9. Vuoden 2013 kantakokoelmanäytemäärät ja varmistetut positiiviset näytteet.

Negatiivisten näytteiden joukossa oli kaksi näytettä, mitkä saatiin alle 5-vuotialta rokotteen saaneilta lapsilta. Rotaviruksen osoitus pikatestillä (esim. RIDA®QUICK Rotavirus/Adenovirus Combi) antaa 97,8 % herkkyuden ja 94,4 % spesifisyyden verrattuna PCR:ään [27]. Näiden potilaiden taudin oli mahdollisesti aiheuttanut jokin muu virus kuin rotavirus.

### 5.2.2 Kantakokoelmanäytteiden tyypitys kahdessa laboratoriossa

Kantakokoelmanäytteet tutkittiin aluksi THL:ssä vuoden 2013 aikana ja 2014 vuoden alkuun asti. Tyypityksessä käytettiin RT-PCR-menetelmiä, jotka perustuvat tuotteiden kokoanalyysiin.

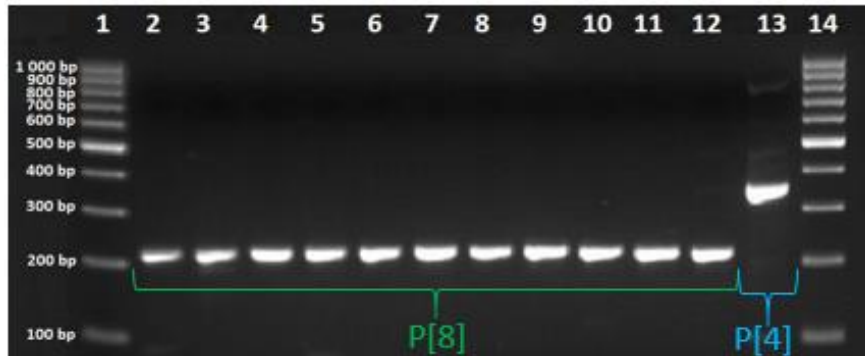
G-tyypitys tehtiin kahdessa vaiheessa eri RT-PCR:llä. Ensimmäisessä kierroksessa monistettiin VP7-alue. Saatu templaatti toimi toisen kierroksen semi-nested-PCR:ssä, missä saatiin geeni jakautumaan pienempiin fragmentteihin. Fragmenttien koot olivat G-tyypille spesifisiä. Agarosigeelielektroforeesijon jälkeen fragmentteja verrattiin DNA:n kokomarkkeriin ja tyyppispesifisiin amplikonikokoihin (liite 1). G-tyypityksen agarosigeelijaon fragmentit näkyvät mallikuvassa 10. Geelikuvaa tulkittiin niin, että vahvin monistunut fragmentti luettiin. Näytteiden tulkittamisen apuna laidoissa oli DNA-kokomarkkeri (kuvassa 10 numerot 1 ja 14). Markkerin keskimääräinen fragmentti erottui kirkkaana ja oli kooltaan 500 bp. Muut fragmentit olivat 100 bp:n välein.



Kuva 10. G-tyypityksen geelin mallikuva ja fragmenttien tulkinta.

Geelikuvan perusteella epäselväksi jääneiden näytteiden G-tyypit voitiin varmistaa sekvensoimalla haluttu fragmentti. Esimerkiksi kuvan 11 näytteet 10 ja 12 sekvensoitiin, koska yhtä vahvaa monistumista havaittiin sekä 179 bp:n kohdassa että 396 bp:n kohdassa. Sekvensoinnin perusteella tulokseksi saatiin G9.

P-tyypityksessä rotaviruksen RNA:sta kopioitiin ensin cDNA, jota monistettiin PCR-menetelmällä spesifisten alukkeiden avulla. Kyseinen alue oli VP4-alueesta. Monistuva alue riippui rotaviruksen tyypistä. P-genotyyppi saatiin visualisoitua geelielektroforeesilla. Mallikuvan 11 näytteissä esiintyi vain kahta muotoa. Numerot 2–12 olivat P[8]-tyyppiä ja numero 13 oli P[4]-tyyppiä. P-tyypityksen tyyppispesifiset amplikonikokojen tulkintataulukko löytyy liitteestä 1. Laidoissa oleva DNA-kokomarkkeri havainnollistaa paremmin fragmenttien kokoja.



Kuva 11. P-tyypityksen geelin mallikuva ja fragmenttien tulkinta.

Myöhemmin vuonna 2014 tehtiin sopimus, jonka perusteella rotavirusten molekyylligeeneettiset tutkimukset eli virusten tyypitykset tekee THL:n ja aluehallintoviraston lupamenettelyn mukaisen hyväksynnän saanut Tampereen yliopiston Rokotetutkimuskeskus (TRTK). THL:ssä tyypitetyt vuoden 2013 näytteet tutkittiin myös TRTK:ssä. TRTK tutki näytteet RT-PCR:n lisäksi sekvensoimalla. Sekvensointiin perustuva tyypitysmenetelmä on tarkempi kuin kokoanalyysimenetelmä. THL:n ja TRTK:n tyypitystulosten välillä oli 15 (20 %) näytteen eroavaisuus. Jatkossa opinnäytetyössä käsitellään TRTK:n saamia sekvensointiin perustuvia tuloksia, eroavien taulukossa 17 olevien tulosten osalta.

Reaaliaikaisella PCR:llä THL:ssä varmistetuista pikatestiposiitivisista näytteistä 5 oli jäänyt negatiiviseksi. Kuitenkin TRTK oli saanut yhden näytteen tyypitettyä, joten negatiivisten näytteiden lukumäärä oli 4/73. Tämän näytteen näytteenottopäivämäärä oli ollut 10.4.2012.

Näytekoodeilla olevista ROV13-0029, -0038, -0039, -0044 ja -0055 -näytteistä oli saatu yhteneväinen tulos THL:ssä ja TRTK:ssä joko G-tyypin tai P-tyypin kannalta. G1 (618 bp) ja G3 (682 bp) amplikonikoot ovat hyvin lähekkäin toisiaan. Mikäli tuotteet eivät ole tarpeeksi ajautuneet toisistaan agarosigeelissä, niin saattaa olla vaikeaa tulkita tulos ainoastaan geelikuvan perusteella. Todennäköisesti sen takia oli tullut eroavaisuuksia RoV13-0056-0059 -näytteissä THL:n ja TRTK:n välillä.

Taulukko 17. Kantakokoelmanäytteiden tulosten eroavaisuudet.

Näytekoodi	TRTK (Sekvensointi)	THL (RT-PCR)
ROV13-0020	G4P[8]	G4P[10]
ROV13-0029	G1P[8]	G1
ROV13-0036	P[14]	ei tuotetta
ROV13-0038	G1P[8]	G1
ROV13-0039	G3P[8]	G3
ROV13-0044	G2P[4]	P[4]
ROV13-0049	G3P[9]	ei tuotetta
ROV13-0055	G2P[4]	P[4]
ROV13-0054	RotaTeq G1+G4+P[8]	G4P[8]
ROV13-0056	G1P[8]	G3P[8]
ROV13-0057	G1P[8]	G3P[8]
ROV13-0058	G1P[8]	G3P[8]
ROV13-0059	G1P[8]	G3P[8]
ROV13-0065	G9P[8]	ei tuotetta
ROV13-0071	G8	G12P[8]

### 5.2.3 Vallitsevat genotyypit ja niiden alueellinen jakauma Suomessa

Tyypitystulos ilmoitettiin aina VP7-alueen ja VP4-alueen yhdistelmänä. Vuoden 2013 kantakokoelmanäytteissä yleisin löydetty genotyyppi oli G1P[8] 21 (28,8 %). Muita enimmäkseen tavattuja genotyyppisiä olivat G2P[4], G9P[8], G4P[8] ja G3P[8]. Lisäksi löydettiin vähäinen määrä G12P[8] -tyyppiä sekä yksittäinen G3P[9]. Yhdestä näytteestä löytyi TRTK:n menetelmällä rokoteperäinen (RotaTeq G1+G4+P[8]) virus. Taulukossa 18 on koottu kantakokoelmanäytteissä esiintyvät eri genotyypit ja niiden määrät. Rokoteperäinen rotavirus oli saatu selville sekvensoimalla VP6-alue, joka erottaa ihmisen ja vasikan rotaviruksen toisistaan. On huomattavaa, että rokotteessa käytetään ihmisen pintaproteiineja VP7 ja VP4, mutta viruksen sisällä olevat proteiinit ovat peräisin vasikan rotaviruksesta.

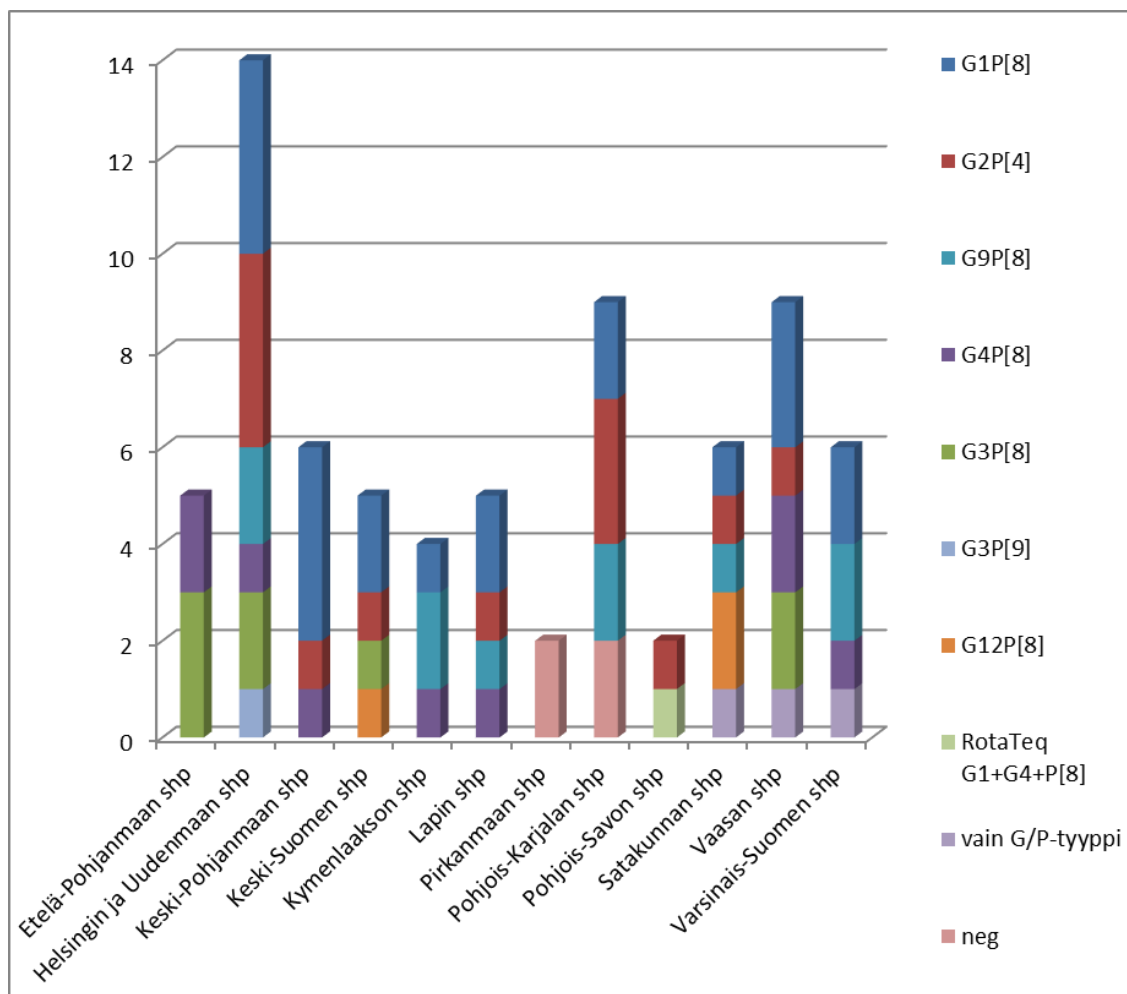
Maailmalla eniten epidemioita aiheuttanut G1P[8] esiintyy myös Suomessa kaikissa ikäryhmissä. G2-genotyyppi sisältyy rokotteeseen. Tutkituista näytteistä 13 potilaassa esiintynyt G2P[4] oli aiheuttanut vain kolme infektiota alle 5-vuotiailla lapsilla. Vähäinen infektiomäärä viittaa rokotteen antamaan suojaan. G12P[8] oli aiheuttanut infektiota kolmessa alle 5-vuotiaissa lapsissa. Kaikkien kolmen lapsipotilaan näytteet oli kerätty toukokuussa, kahdelta paikkakunnalta (Satakunnan ja Keski-Suomien shp). Lain astuessa voimaan epidemiakauden ulkopuolella ei voida tietää, oliko G12P[8] aiheuttanut

epidemiaa vuoden 2012/2013 aikana, sillä näytteitä ei ollut tullut THL:ään lakia edeltävänä kautena. Yksi rokotettu lapsi oli saanut G4P[8]-genotyypin olevan infektion, vaikka lapsi oli saanut kaikki kolme rokoteannosta. Rokotteeseen sisältyy G4P[8], mutta lapsella ei ollut rokotesuojaa kyseistä viruskantaan vastaan. Tutkitun näytemateriaalin muut viruskannat olivat esiintyneet yhtä lailla molemmissa ikäryhmissä (taulukko 18).

Taulukko 18. Kantakokoelmanäytteissä esiintyvien eri genotyyppien määrät.

Genotyyppi	Alle 5-vuotiaat	Yli 5-vuotiaat	Yhteensä
G1P[8]	9	12	21
G2P[4]	3	10	13
G9P[8]	5	5	10
G4P[8]	7	2	9
G3P[8]	2	6	8
G12P[8]	3	0	3
G3P[9]	0	1	1
RotaTeq G1+G4+P[8]	1	0	1
Vain G/P-tyyppi	1	2	3
negatiiviset	4	0	4

Suomen asukasluku vaihtelee etelästä pohjoiseen mentäessä. Etelä-Suomessa on eniten asukkaita Pohjois-Suomeen verrattuna. Asukasluvun vaihtelu ei kuitenkaan vaikuta rotavirusten genotyyppien jakaumaan (kuva 12). Eniten genotyyppiä oli löydetty Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiristä, 6 erilaista genotyyppiä. Lapista löydettiin 4 erilaista genotyyppiä. Muista sairaanhoitopiireistä oli löydetty 2–5 eri genotyyppiä.



Kuva 12. Suomen sairaanhoitopiireissä esiintyvät genotyypit.

Vallitseva genotyyppi eli G1P[8] esiintyy 9/12 sairaanhoitopiirissä. G1P[8] on eniten epidemioita aiheuttanut ympäri maailmaa. Muita eniten sairaanhoitopiiristä löydettyjä genotyyppiä olivat G2P[4] 8/12, G4P[8] 7/12 ja G9P[8] 6/12. Myös muita satunnaisia genotyyppiä oli tavattu. Kahdessa eri sairaanhoitopiirissä esiintyvää G12P[8] oli tyypitetty kolmesta näytteestä. G12P[8] esiintyy harvoin, mikä tarkoittaa sitä, että G12P[8] yleistyy myös Suomessa rokoteikäikäyhteydessä. Saattaa olla, että G12-tyyppi voisi olla tulos zoonoottisesta infektiosta. On todettu, että rotavirukset voivat siirtyä eläimiltä ihmisiin, jolloin eläinten tartunnat voivat olla zoonoottinen riski ihmisille ja erityisesti pienille lapsille. Eläimet voivat myös toimia rotavirusten reservuaarina. [28.]

Vuoden 2014 aikana saatiin Virusinfektiot-yksikköön 176 näytettä, mikä on jo yli puolet enemmän kuin edellisellä vuonna. Tartuntatautirekisteriin oli ilmoitettu vuoden aikana yhteensä 274 rotavirustartuntaa. Alustavien tulosten mukaan kantakokoelmanäytteiden yleisimmät genotyypit eivät ole muuttuneet verrattuna edelliseen vuoteen. Suomessa

kiertävät edelleen vuonna 2014 samat genotyypit kuin vuonna 2013 eli G1P[8] (yleisin), G2P[4], G3P[8], G4P[8] ja G9P[8].

## 6 Päätelmät

Rotavirusrokote on ollut osana kansallista ohjelmaa Suomessa vuodesta 2009. Rotaviruspositiivisten tapausten osuus kaikista suolistotulehduksista väheni merkittävästi rokotuksen jälkeen verrattuna aikaan ennen rokotuskautta. Rotavirusten esiintyvyyttä on tärkeää seurata, sillä rotavirusten kannat voivat korvautua toisilla viruskannoilla rokotteen vaikutuksesta. Virukset voivat myös reassortoitua, minkä seurauksena voi olla täysin uusien genotyyppien synty. On mahdollista, että aikaisemmin yleisintä tautia aiheuttavat virukset tulevat harventumaan ja korvautumaan uusilla mahdollisesti muuntuneilla viruksilla. Suomessa tehtävän seurannan tavoitteena on selvittää kiertävien rotavirusten genotyypit, tunnistaa epidemiat ja arvioida rotavirusten infektioitaakka. Seurannan tuloksilla on merkitystä sekä kansallisesti että kansainvälisesti. Jatkossa tullaan selvittämään, korvautuvatko rokotuksilla vähentyneet tai jo hävitetyt viruskannat vähitellen toisilla viruskannoilla ja miten käy luonnossa kiertävien villityypin rotavirusten. Uusiin viruksiin rokote ei tehoa.

Opinnäytetyössä tutkittiin vuoden 2013 kantakokoelmanäytteet ja selvitettiin niissä esiintyvät genotyypit, ikäjakaumat ja tapausten sairaanhoitopiirit. Vielä vuonna 2009 alle 5-vuotiaiden lasten riski saada rotavirusinfektio oli suuri. Kansalliseen ohjelmaan tullut rokote antaa hyvän suojan ja pienten lasten sairaalakäynnit ovat selvästi vähentyneet. Pienten lasten rokottamisen seurauksena yhä suurempi määrä infektioita esiintyy myös heitä vanhemmassa ikäryhmässä. Tämä on todettu myös tämän opinnäytetyön tulosten perusteella tarkasteltaessa näytemääriä ja ikäryhmiä.

Rotaviruksella on monta G- ja P-tyyppiä. Maailmalla on viisi yleisintä G-tyyppiä (G1, G2, G3, G4 ja G5) ja kolme yleistä P-tyyppiä (P[8], P[4] ja P[6]) [29,30]. Myös opinnäytetyön tutkituista näytteistä 83,6 % kuului yleisiin G-tyyppeihin. Lisäksi 87,7 % kuului yleisiin P-tyyppeihin. Yleisimmät G-tyypit kantakokoelmanäytteissä olivat G1 (28,8 %), G2 (17,8 %) ja G9 (13,7 %). Yleisimmät G-tyypit vaihtelevat maantieteellisen paikan mukaan vuosi vuodelta. Esimerkiksi 70 % tapauksista Pohjois-Amerikassa, Euroopassa ja Australiassa oli aiheuttanut G1-tyyppi, kun taas G1-tyyppi aiheutti vain 30 % tapauksista Etelä-Amerikassa, Aasiassa ja Afrikassa vuosina 1989–2004 [31]. Uudessa



tutkimuksessa Tansaniassa näyttää, että vallitsevat tyypit ovat G1, G8, G12 ja G4 [32]. Brasiliassa G1-tyyppi on ollut vallitsevin tyyppi ennen rokotusta ja rokotuksen jälkeen G1-tyyppi oli vaihtunut G2-tyypillä [29]. Vuosina 2009–2013 tehdyssä tanskalaisessa tutkimuksessa havaittiin, että yleisin tautia aiheuttanut G1-genotyyppi oli vaihtunut G9:ksi ajan myötä. G9:n vaihto oli tapahtunut vuodesta 2011 alkaen. Lisäksi oli huomattu, että Tanskassa oli selvä G4 ja G3 nousu infektioiden määrässä [33]. Suomessa genotyyppien muutos on odotettavissa lähivuosina luonnonvalinnan ja rokotteen paineen takia.

Rokotteesta huolimatta kantakokoelmanäytteistä kolme alle 5-vuotiasta lasta olivat saaneet rotavirusinfektion. Infektion saaneet lapset olivat 10 kk, 2- ja 3-vuotiaita. Näytteissä löytyneet genotyypit olivat G4P[8], G8 ja G9P[8]. Suomessa käytettävä rokote RotaTeq® antaa suojan G1, G2, G3, G4 ja P[8] -genotyyppijä vastaan. Ensimmäisessä tapauksessa lapsen rokote ei ollut antanut riittävää suojaa virusta vastaan. Lapsen taustaa ei tiedetä, mutta mahdollinen immuunipuutesairaus voi aiheuttaa sen, että virusvastetta ei kehity. Lisäksi tiedetään, että rotavirusrokote ei välttämättä suojaa rokotettua lasta vaan ainoastaan lieventäisi sairautta. Syy voisi myös olla se, että lapsi ei ole saanut kaikkia kolmea rokoteannosta. Rokotevalmistaja suosittelee antamaan kaikki kolme rokoteannosta, sillä vasta kolmannen annoksen jälkeen lapsella on täysi suoja. Toisessa ja kolmannessa tapauksessa rokote ei mahdollisesti antaisi suojaa G8- ja G9-tyyppejä vastaan. On otettava huomioon myös se, että syy saattaisi olla immuunipuolustuksessa tai että vasta-aineita ei ole ehtinyt muodostua.

Opinnäytetyön aikana suuren hyödyn antoivat käynnit Tampereen Rokotetutkimuskeskuksessa ja HUSLABin Virologian yksikössä, jolloin tutustuttiin eri laboratorioihin ja eri rotaviruksen tunnistukseen käytettäviin menetelmiin. Diagnostiikkaa tekevä HUSLAB sai potilaan ollessa akuutissa infektiossa diagnoosin todettua hyvinkin nopeasti. Heillä on käytössä EM ja EIA:han perustuvia pikatestianalyysijä. Tampereen Rokotetutkimuskeskus tekee G- ja P-tyypityksen RT-PCR:t kaksivaiheisina ja lisäksi he voivat erottaa ihmisen ja vasikan rotaviruksen VP6 RT-PCR:n avulla.

## Lähteet

1. Bishop R.F. Davidson G.P. Holmes I.H. & Ruck B.J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* Dec 8;2(7841). s, 1281–1283.
2. Flewett T.H. Bryden A.S. & Davies H. 1973. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* Dec 29;2(7844). s, 1497.
3. Von Bonsdorff C-H. Vesikari T. & Maunula L. 2010. Gastroenteriittiä aiheuttavat virukset. Teoksessa *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Ensimmäinen painos. Hedman K. Heikkinen T. Huovinen P. Järvinen A. Meri S. & Vaara M. Jyväskylä. WS Bookwell Oy. s, 591–603.
4. Viralzone. 2010. Rotavirus. Verkkodokumentti. [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/107.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html). Luettu 2.10.2014.
5. Estes M.K. & Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological reviews*. Vol.53.No.4. Dec;53(4). s, 410–411.
6. Estes M.K. & Kapikian A. 2007. Rotaviruses. Knipe D, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, Straus S, editors. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health; Lippincott, Williams and Wilkins. s, 1917.
7. Matthijnssens J. Ciarlet M. McDonald S.M. Attoui H. Banyai K. Brister J.R & ym. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* Aug;156(8) s,1397–1413.
8. Al-Hello H. Roivainen M. Leino T. Elonsalo U. & Pirhonen J. 2014. Rotavirusinfektioiden seurantakäsikirja. Ensimmäinen painos Tampere: Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino Oy.
9. Desselberger U. 2014. Rotaviruses. *Virus Research*. Sep 22;190 s,75–96.
10. Kapikian A. Hoshino Y. & Chanock R. 2001. Rotaviruses. In: Knipe D.M. Howley P.M. editors. *Fields Virology* Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.
11. Renko M. Alalaurila E. Rautanen T. & ym. 2007. Kansanterveyslaitoksen asettaman lasten rotavirusrokotusryhmän selvitys 26.11.2007. Helsinki: Kansanterveyslaitos.
12. Infektiotaudit. 2013. Rotavirus. Verkkodokumentti. <http://www.thl.fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/rotavirus>. Luettu 22.9.2014.
13. Hulkko T. Lyytikäinen O. Kuusi M. Seppälä S. Ruutu P. & ym. 2010. Tartuntataudit Suomessa 1995–2009. Helsinki: Yliopistopaino.

14. Klaukka T. Helin-Salmivaara A. Huupponen R. & Idänpään-Heikkilä J.E. 2006. Rotavirusrokotteelle on selvä käyttöaihe myös Suomessa. Suomen lääkärilehti (20). s, 2242.
15. Jaakola S. Lyytikäinen O. Rimhanen-Finne R. Salmenlinna S. Savolainen-Kopra C. Pirhonen J. Vuopio J. & ym. 2014. Tartuntataudit Suomessa 2013. Tampere: Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino Oy.
16. Agocs M.M. Serhan F. Yen C. Mwenda J.M. de Oliveira L.H. Teleb N. & ym. 2012. WHO global rotavirus surveillance network: a strategic review of the first 5 years, 2008-2012. MMWR Morb. Mortal. Jul 25;63(29). s, 634–637.
17. Estes M.K. Graham D.Y. Smith E.M. & Gerba C.P. 1979. Rotavirus stability and inactivation. J. Gen. Virol. May;43(2). s, 403–409.
18. Tampereen yliopisto. 2013. Uusi tutkimus kehittää kehitysmaihin soveltuvaa rotavirusrokotetta. Verkkodokumentti. <http://www.uta.fi/med/ajankohtainen.html?id=88828>. Luettu 23.11.2014.
19. Rotavirusrokote. 2013. Verkkodokumentti. <http://www.thl.fi/fi/web/rokottaminen/rokotteet/rotavirusrokote>. Luettu 23.11.2014.
20. Maunula L. & Järvinen A. 2011. Maha-suolikanavan infektiot ja ripulitauti. Teoksessa Infektiosairaudet. 3.painos. Hedman K. Heikkinen T. Huovinen P. Järvinen A. Meri S. & Vaara M. Helsinki: Kustannus oy Duodecim. s, 475–503.
21. Tampereen yliopisto. 2014. Rotaviruksen aiheuttama ripuli. Verkkodokumentti. <http://rokotetutkimus.fi/rokotteet/infektiotaudit/rotavirus.html>. Luettu 8.2.2015.
22. 75 countries have introduced rotavirus vaccines in their national immunization programs. 2015. Verkkodokumentti. <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/rotavirus-vaccines/>. Luettu 7.1.2015.
23. Gutierrez-Aguirre I. Steyer A. Boben J. Gruden K. Poljsak-Prijatelj M. & Ravnikar M. 2008. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. J. Clin. Microbiol. Aug;46(8).s, 2547–2554.
24. Rotavirus Detection and Typing. 2009. Verkkodokumentti. <http://www.eurorota.net/>. Luettu 11.1.2015.
25. Manual of rotavirus detection and characterization methods. 2009. Verkkodokumentti. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who\\_ivb\\_08.17\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who_ivb_08.17_eng.pdf). Luettu 11.1.2015.
26. Lasten rokotusohjelman rokotuskattavuusraportti. 2014. Verkkodokumentti. <http://www.thl.fi/roko/rokotusrekisteri/kattavuusraportit2014/reports/raportti2014aava.pdf?filename=reports%2Fraportti2014aava.pdf>. Luettu 11.1.2015.
27. RIDA@QUICK Rotavirus/Adenovirus Combi. Verkkodokumentti. <http://www.r-biopharm.com/products/clinical-diagnostics/antigen-detection/viruses/item/ridaquick-rotavirusadenovirus-combi-dipsticks>. Luettu 8.2.2015.

28. Nakagomi O. & Nakagomi T. 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch. Virol.* 120(1-2) s,43–55.

29. da Silva Soares L. de Fatima Dos Santos Guerra S. do Socorro Lima de Oliveira A. da Silva Dos Santos F. de Fatima Costa de Menezes E.M. Mascarenhas J. & ym. 2014. Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype. *J. Med. Virol.* Jun;86(6). s, 1065–1072.

30. Oh H.K. Hong S.H. Ahn B.Y. & Min H.K. 2012. Phylogenetic Analysis of the Rotavirus Genotypes Originated from Children < 5 Years of Age in 16 Cities in South Korea, between 2000 and 2004. *Osong Public. Health. Res. Perspect.* Mar;3(1). s, 36–42.

31. Dennehy P.H. 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin. Microbiol. Rev.* Jan;21(1). s,198–208.

32. Moyo S.J. Blomberg B. Hanevik K. Kommedal O. Vainio K. Maselle S.Y. & ym. 2014. Genetic diversity of circulating rotavirus strains in Tanzania prior to the introduction of vaccination. *PLoS One* May 20;9(5):e97562.

33. Midgley S. Bottiger B. Jensen T.G. Friis-Moller A. Person L.K. Nielsen L. & ym. 2014. Human group A rotavirus infections in children in Denmark: detection of reassortant G9 strains and zoonotic P[14] strains. *Infect. Genet. Evol.* Oct;27. s,114–120.

34. Burden of disease. Verkkodokumentti. <http://eurorota.net/burden.php>. Luettu 8.2.2015.

## G- ja P-tyyppin amplikonikokojen tulkinta

Taulukko 1. VP7 (G-tyyppi) tyyppispesifiset amplikonikoot.

G-tyyppi	Amplikonikoko (bp)
G9	179
G10	266
G12	396
G4	452
G2	521
G1	618
G3	682
G8	756

Taulukko 2. VP4 (P-tyyppi) tyyppispesifiset amplikonikoot.

P-tyyppi	Amplikonikoko (bp)
P[6]	146
P[11]	191
P[8]	224
P[9]	270
P[4]	362
P[10]	462