

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2016

Niina Aalto

# PIKORNAVIRUSVASTA- AINEIDEN TESTAAMINEN IMMUNOFLUORESENSSI- MIKROSKOPIAA KÄYTTÄEN

Niina Aalto

# PIKORNAVIRUSVASTA-AINEIDEN TESTAAMINEN IMMUNOFLUORESENSSIMIKROSKOPIAA KÄYTTÄEN

Opinnäytetyön aiheena oli testata erilaisten vasta-aineiden kykyä tunnistaa pikornaviruksia käyttäen immunofluoresenssimenetelmää (IFA). Työ tehtiin Turun yliopistossa, Virusopilla AIROPico-projektissa. Pikornavirukset ovat pieniä, vaipattomia RNA-viruksia, jotka aiheuttavat ihmiselle monia erilaisia tauteja, kuten flunssaa ja aseptista aivokalvontulehdusta. Työssä käytettiin pääasiassa pikornavirus-perheeseen kuuluvia rinoviruksia.

Työ sisälsi soluviljelyä, virus-RNA:n puhdistusta, RT-qPCR-tekniikan käyttöä, virusinfektiota, solujen fiksausta, vasta-aineväryystä sekä mikroskopointia. RT-qPCR-menetelmää käytettiin varmentamaan viruksien lisääntymiskykyä. Vasta-aineiden testaus suoritettiin infektoimalla ja fiksaamalla HeLa-E8-soluja 96-kuoppalevyllä, värjäämällä ne vasta-aineilla ja tarkastelemalla tuloksia fluoresenssimikroskoopilla. Värytyt solut kuvannettiin. RT-qPCR:n ja IFA:n tuloksia verrattiin toisiinsa.

Kahdeksan vasta-ainetta testattiin 20 pikornavirustyyppiä vastaan. Eniten viruksia tunnistivat monoklonaaliset vasta-aineet MAb C01698M (7 kpl) ja C01696M (6 kpl). MAb C01698M tunnisti rinovirustyyppit A2, A10, A39, A49, A80, B91 ja kliinisen näytteen #592. MAb C01696M tunnisti rinovirustyyppit A2, A10, B14, A39, A49 ja A80. MAb HRV-16-7 ei tunnistanut yhtään virusta. Loput käytetyistä vasta-aineista tunnistivat 1-4 virusta. Epävarmoja tuloksia oli paljon suuren taustan vuoksi.

## ASIASANAT:

Rinovirus, immunofluoresenssimenetelmä, pikornavirusvasta-aineet, RT-qPCR.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

June 2016 | 21

Niina Aalto

## PICORNAVIRUS ANTIBODY TESTING BY IMMUNOFLUORESCENCE MICROSCOPY

The objective of the thesis was to test the ability of different antibodies to identify picornaviruses by immunofluorescence assay (IFA). The experiments were performed as part of the AIROPico project at the Department of Virology, University of Turku. Picornaviruses are small RNA viruses that do not have a membrane. They inflict various diseases on humans, such as flu and aseptic meningitis. Rhinoviruses that belong to the family *Picornaviridae* were mostly used in this experiment.

The experiment included culturing cells, purifying viral RNA, using the RT-qPCR technique, infecting cells with viruses, cell fixing, antibody dyeing, and microscopy. RT-qPCR was used to confirm the fertility of the viruses. Antibody testing was performed by infecting and fixing HeLa-E8 cells in a 96-well plate, dyeing them with antibodies and inspecting the results with a fluorescence microscope. The dyed cells were imaged. The RT-qPCR and IFA results were compared.

Altogether 8 antibodies were tested against 20 viruses. The best results were obtained with monoclonal antibodies MAb C01698M (7 pcs) and C01696M (6 pcs). MAb C01698M identified rhinovirus types A2, A10, A39, A49, A80, B91 and a clinical sample #592. MAb C01696M identified rhinovirus types A2, A10, B14, A39, A49 and A80. MAb HRV-16-7 did not identify any viruses. The rest of the used antibodies identified 1 to 4 viruses. There were a vast number of uncertain results because of the background.

### KEYWORDS:

Rhinovirus, immunofluorescence assay, picornavirus antibody, RT-qPCR

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 KÄYTETYT MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>8</b>
2.1 Pikornavirukset ja pikornavirusvasta-aineet	8
2.2 RT-qPCR	9
2.3 Immunofluoresenssimenetelmä	9
<b>3 TYÖN SUORITUS</b>	<b>11</b>
3.1 Solujen kasvatus ja ylläpito	11
3.2 RT-qPCR	11
3.3 Virusinfektiot	13
3.4 Solujen värjäys ja kuvantaminen	14
<b>4 TULOKSET</b>	<b>16</b>
4.1 RT-qPCR- ja IFA-tulokset	16
4.2 IFA-kuvat	18
<b>5 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>20</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>22</b>

## KUVAT

Kuva 1. Pikornaviruksen rakenne (ViralZone 2016).	8
Kuva 2. Infektoimattomat ja infektoidut HeLa-E8-solut. Infektoimattomat solut 24 h inkuboinnin jälkeen (A). Infektoimattomat solut 48 h inkuboinnin jälkeen (B). RV-B86-viruksella infektoidut solut 24 h inkuboinnin jälkeen (C). RV-B86-viruksella infektoidut solut 48 h inkuboinnin jälkeen (D).	16
Kuva 3. RT-qPCR-ajon sulamispistekäyrät.	18
Kuva 4. Esimerkki positiivisesta, epävarmasta ja negatiivisesta IFA-tuloksesta. Positiivinen tulos, 20 x suurennos, RV-A39-virus, C01697M-vasta-aine (A-C). Epävarma tulos, 10 x suurennos, RV-A39-virus, HRV-16-7-vasta-aine (D-F). Negatiivinen tulos, 4 x suurennos, RV-C-#592-virus, HRV-16-7-vasta-aine (G-I). DAPI (A, D, G), fluoresenssi (B, E, H) ja yhdistelmä (C, F, I).	19

## TAULUKOT

Taulukko 1. RT-qPCR:ssä käytetyt virukset.	12
Taulukko 2. cDNA-reaktioseoksen yhtä näytettä kohti käytetyt reagenssit ja reagenssimäärät.	13
Taulukko 3. qPCR-reaktioseoksen yhtä näytettä kohti käytetyt reagenssit ja reagenssimäärät.	13
Taulukko 4. Primaariset vasta-aineet.	15
Taulukko 5. RT-qPCR- ja IFA-tulokset.	17

## KÄYTETYT LYHENTEET

BME	Kasvatusliuos (engl. Basal Medium Eagle)
BSA	Naudan seerumin albumiini
cDNA	Komplementaarinen DNA
CPE	Sytopaattinen vaikutus
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
FBS	Naudan sikiöseerumi
HeLa-E8	Muunneltu kohdunkaulan syöpäsolulinja
IFA	Immunofluoresenssimenetelmä
MAb	Monoklonaalinen vasta-aine
PAb	Polyklonaalinen vasta-aine
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
RNA	Ribonukleiinihappo
RT-qPCR	Kvantitatiivinen reaaliaikainen käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella Virusopin oppiaineessa AIROPico-projektissa, jossa kehitetään nopeaa diagnostiikkaa ihmisen pikornaviruksien tunnistamiseksi. Opinnäytetyön aiheena oli testata erilaisten kaupallisten ja ns. in-house vasta-aineiden kykyä tunnistaa pikornaviruksia käyttäen immunofluoresenssimenetelmää.

Pikornavirukset ovat pieniä, vaipattomia RNA-viruksia, joista suuri joukko infektoi ihmisiä. Ne aiheuttavat monia erilaisia tauteja, kuten flunssaa ja aseptista aivokalvontulehdusta. Työssä käytettiin pääasiassa pikornavirus-perheeseen kuuluvia rinoviruksia, jotka ovat yleisimpiä tavallisen flunssan aiheuttajia. (Turun yliopisto 2016)

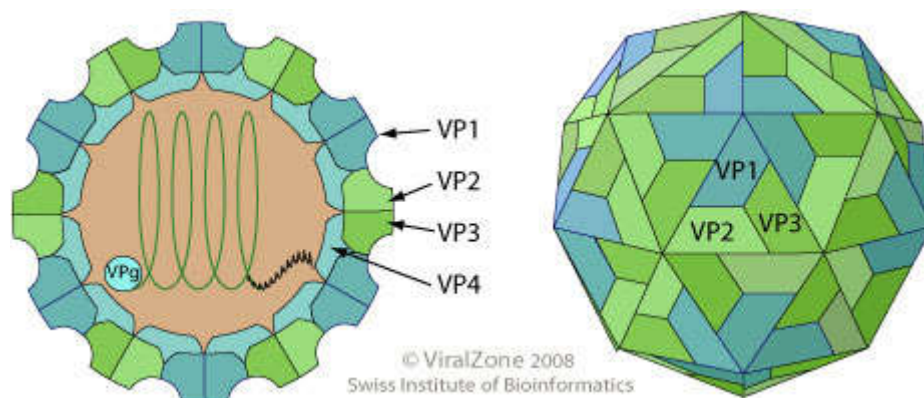
Työ sisälsi soluviljelyä, virus-RNA:n puhdistusta, RT-qPCR-tekniikan käyttöä, virusinfektiota, solujen fiksausta, vasta-aineväryystä sekä mikroskopointia. Työssä käytettiin kuvantamiseen sopivia (mustia) 96-kuoppalevyjä ja Virusopin EVOS FL AUTO -mikroskooppia. Viruksien lisääntyminen varmennettiin RT-qPCR-menetelmällä. Infektiokykyiset virukset pipetoitiin solulinjoihin ja solut fiksattiin vasta-aineväryyksiä varten. Värytyt solut kuvannettiin ja tuloksista tehtiin johtopäätökset.

## 2 KÄYTETYT MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1 Pikornavirukset ja pikornavirusvasta-aineet

Ihmisiä infektioivia pikornavirustyypppejä tunnetaan yli 270. Tunnetuimpia ovat poliovirus, rinovirus ja enterovirus. Pikornaviruksia vastaan ei ole lääkkeitä ja rokotteitakin on olemassa vain muutamille pikornavirustyypeille. Perusterveydenhuollon kannalta olisi erittäin hyödyllistä, jos pikornaviruksia pystyttäisiin tunnistamaan nopeasti. Pikornaviruksia tunnistavia vasta-aineita tarvitaan tutkimuskäyttöön ja antigeeninosoitustestien kehittämiseen. Vasta-ainekehitystyö tapahtuu esimerkiksi käyttäen perinteisiä menetelmiä, joissa monoklonaalisia vasta-aineita (MAb) tuotetaan hybridomasoluissa, jotka on saatu fuusioimalla immunisoidun hiiren pernasoluja myelomasolujen kanssa. (Turun yliopisto 2016)

Pikornavirukset ovat pieniä, pallomaisia, vaipattomia RNA-virusia. Niiden genomia, joka muodostuu positiivisesta RNA:sta, ympäröi kapsidi, joka on noin 30 nm halkaisijaltaan. Kapsidi koostuu 60 rakenneyksiköstä, joista jokainen sisältää neljä polypeptidiä; VP1, VP2, VP3 ja VP4. Pikornaviruksen rakenne on esitetty kuvassa 1. VP1, VP2 ja VP3 sijaitsevat kapsidin ulkoreunalla ja VP4 sen sisäpuolella. (Microbiology and Immunology On-line 2016; ViralZone 2016)



Kuva 1. Pikornaviruksen rakenne (ViralZone 2016).

Viruksen muoto vaikuttaa siihen, miten vasta-aine pystyy kiinnittymään virukseen. Vasta-aine kiinnittyy aina tunnistamaansa antigeeniin. Useat tässä työssä käytetyistä vasta-aineista sitoutuvat valmistajalta saatujen tietojen mukaan viruksien VP3-proteiineihin (taulukko 4).



## 2.2 RT-qPCR

PCR tulee englannin kielen sanoista polymerase chain reaction eli polymeerasiketjureaktio. PCR:n tarkoituksena on monistaa DNA:ta lämpöä kestävä DNA-polymeerasin avulla. Reaktiot tehdään tavallisesti mikrosentrifuugiputkissa tai kuoppalevyillä ja ajo tapahtuu PCR-laitteessa, joka kontrolloi näytteiden lämpötilaa. (Suominen ym. 2010, 153)

Periaatteena on käyttää kahta tarkalleen tunnettua DNA-jaksoa eli aluketta, joiden välissä sijaitsee monistettava DNA-jakso. Reaktiossa käytetään myös kaksinauhaista templaatti-DNA:ta, jonka eri juosteisiin vastakkaisiin päihin alukkeet kiinnittyvät. Lisäksi tarvitaan nukleotideja rakennuspalikoiksi sekä DNAasi-inhibiittoreita, jotta näyte ei hajoaisi. (Suominen ym. 2010, 153-154)

Templaatti täytyy ensin denaturoida kuumentamalla ja sitten lämpötilaa laskea, jotta alukkeet voivat kiinnittyä siihen. Alukkeiden kiinnitystä kutsutaan annealing-reaktioksi. Lämpötilaa pidetään vain lyhyen aikaa alhaisempana, koska silloin alukkeita suurempi templaatti ei ehdi renaturoitumaan. Lämpötilaa nostetaan taas, jolloin DNA-polymeerasi alkaa rakentaa mallin mukaista DNA:ta. Tätä kutsutaan ekstensioksi. Tämän jälkeen PCR-sykli aloitetaan alusta. Sykliin kuuluu siis denaturointi, annealing-reaktio ja ekstensio. Jokaisen syklin seurauksena templaatti-DNA:n määrä kaksinkertaistuu. (Suominen ym. 2010, 154)

RT-PCR eli reverse transcription PCR merkitsee käänteistranskriptio-PCR:ää. Tätä tekniikkaa käytetään silloin, kun PCR:n lähtömateriaalina on RNA. Ennen monistusreaktioita RNA täytyy kääntää cDNA-muotoon (engl. complementary DNA) käänteistranskriptasilla. qPCR tarkoittaa kvantitatiivista reaaliaikaista PCR:ää. Reaaliaikaisessa PCR:ssä syntyvän DNA:n määrää voidaan seurata fluoresoivan merkkiaineen avulla reaktion aikana. (Suominen ym. 2010, 154, 166, 169)

## 2.3 Immunofluoresenssimenetelmä

Biolääketieteellisissä tutkimuksissa ja diagnostiikassa hyödynnetään immunofluoresenssitekniikkaa. Sitä sovelletaan pääasiassa proteiinien ja muiden biomolekyylien havaitsemiseen soluissa ja kudoksissa. Immunofluoresenssi perustuu vasta-aineiden korkeaan selektiivisyyteen ja affiniteettiin niiden antigeeneihin sekä

menetelmässä käytettäviin fluoresoiviin merkkiaineisiin. Optimaaliseen havaitsemiseen vaikuttaa esimerkiksi vasta-aineen laatu, tutkittavien kudosten tai solujen säilyminen, menetelmän herkkyys ja käytettävien laitteiden laatu. (Fritschy & Härtig 2001)

Opinnäytetyössä käytettiin epäsuoraa immunofluoresenssimenetelmää. Tässä tekniikassa kohdemolekyyleihin sitoutuvat primaariset vasta-aineet ovat leimaamattomia. Leimatut sekundaariset vasta-aineet sitoutuvat primaarisiin vasta-aineisiin. Sekundaariset vasta-aineet on leimattu fluorokromeilla. (Fritschy & Härtig 2001)

Fluoresenssimikroskoopin perusideana on, että siinä on valonlähde, joka virittää fluorokromin (käytetään nimitystä eksitaatio) ja siitä vapautuva emissiovalo ohjataan detektorille, jossa syntyy kuva. Fluoresenssimikroskopian spesifisyydestä ja herkkyydestä johtuen solujen rakenteita voi tutkia suurella erotuskyvyllä, jolloin on mahdollista saada tarkka kuva antigeenin sijainnista. Tosin usein riittää, että saadaan tietää, onko valittua merkkiainetta tutkittavassa kudoksessa tai soluissa. (Fritschy & Härtig 2001)

## 3 TYÖN SUORITUS

### 3.1 Solujen kasvatus ja ylläpito

Soluviljely on virustutkimuksessa yleisesti käytetty menetelmä. Soluviljelysoluina käytetään usein ns. adherentteja eli alustaan kiinnittyviä syöpäsoluja, koska ne kasvavat hyvin ja niitä on helppo käsitellä. Tässä työssä käytettiin HeLa-E8-soluja, jotka ovat muunneltuja ihmisen kohdunkaulan syöpäsoluja. (Bochkov ym. 2015)

Soluja kasvatettiin ja ylläpidettiin T-75-pulloissa Sanyo CO<sub>2</sub>-inkubaattorissa (malli MCO-18AIC) 37 °C:ssa 5 %:ssa CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa. Kasvatusliuokseen BME (engl. Basal Medium Eagle) lisättiin 7 %:sta inaktivoitua naudan sikiöseerumia (FBS, engl. Fetal Bovine Serum) ja gentamysiini-antibioottia.

Solut jaettiin kaksi kertaa viikossa. Vanha medium kaadettiin pois ja solut huuhdeltiin kaksi kertaa PBS-liuoksella (Engl. phosphate-buffered saline). Solujen irrottamiseksi pulloon lisättiin 0,025 %:sta verseneä ja pulloa inkuboitii 5-10 min CO<sub>2</sub>-inkubaattorissa ja soluja tarkasteltiin mikroskoopilla. Inkuboinnin jälkeen pulloon lisättiin mediumia ja solut puskuteltiin irti pipetin avulla. Solususpensiota ja mediumia pipetoitiin uuteen T-pulloon tietyssä suhteessa, yleensä 1:10.

### 3.2 RT-qPCR

RT-qPCR:ää varten virusnäytteiden RNA täytyy eristää. Eristämiseen käytettiin Qiagen QIAamp Viral RNA Mini -kittiä. RNA eristettiin kitin ohjeiden mukaan. Näytetilavuus oli 150 µl ja RNA eluoitiin 60 µl:n tilavuuteen kitin mukana tulleeseen puskuriin. RT-qPCR:ään käytettiin ENRI-testiä, jolla voidaan tunnistaa entero- ja rinovirusia. ENRI-testillä ei saada erotettua näitä viruksia toisistaan, mutta tarkoitus oli osoittaa, oliko näytteessä virusta ja kuinka paljon. RT-qPCR:ssä käytetyt virukset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. RT-qPCR:ssä käytetyt virukset.

<b>RT-qPCR, virukset</b>
RV-A1
RV-A2
RV-A10
RV-A12
RV-A16
RV-A39
RV-A49
RV-A60
RV-A80
RV-B14
RV-B17
RV-B48
RV-B70
RV-B86
RV-B91
RV-C (592)
RV-C (RÖ)

ENRI-testi suoritettiin Virusopilta saatujen ohjeiden mukaan (Lönnrot ym. 1999; Peltola ym. 2008). Aluksi valmistettiin cDNA-reaktioseos (taulukko 2), jota jaettiin 30 µl reaktioputkiin. Putkiin lisättiin 10 µl näytteitä. Valmistettiin myös vesikontrolli, johon pipetoitiin näytteen sijasta 10 µl vettä. cDNA-reaktioputkia inkuboitii n. 1 h 42 °C:ssa lämpölokissa. Valmistettiin qPCR-reaktioseos (taulukko 3), jota jaettiin 20 µl varsinaisiin PCR-putkiin. Putkiin lisättiin 5 µl näytteitä cDNA-putkista. Lisäksi valmistettiin PCR-vesikontrolli, johon pipetoitiin näytteen sijasta 5 µl vettä. PCR-ajoon käytettiin Qiagen Rotor-Gene Q -laitetta ja Maxima ENRI -ohjelmaa.

Taulukko 2. cDNA-reaktioseoksen yhtä näytettä kohti käytetyt reagenssit ja reagenssimäärät.

Reagenssit	Tilavuus (µl)
Aqua	8,9
5*puskuri	8
dNTP's (10 mM)	8
ENRI (4-)	4,9
RNasin inhibiittori	0,1
RT-entsyymi	0,1
Yhteensä	30

Taulukko 3. qPCR-reaktioseoksen yhtä näytettä kohti käytetyt reagenssit ja reagenssimäärät.

Reagenssit	Tilavuus (µl)
Aqua	6,5
ENRI (4-)	0,5
ENRI (3+)	0,5
Maxima SYBR Green	12,5
Yhteensä	20

### 3.3 Virusinfektiot

Virusinfektioita varten HeLa-E8-soluja jaettiin mustille 96-kuoppalevyille. Tätä varten solujen määrä laskettiin mikroskooppisesti käyttämällä Bürkerin kammiota. Solususpensiota ja mediumia pipetoitiin levyille sopivassa suhteessa (15 000 solua / kuoppa). Vuorokauden inkuboinnin jälkeen kuopat olivat valmiita infektoinnille. Kuopista poistettiin medium ja niihin pipetoitiin 100 µl mediumiin tehtyä viruslaimennosta. Levyjä inkuboitiin 33 °C:ssa 24 h. Virusnäytteet olivat muuten samoja, joita käytettiin RT-qPCR:ssä (taulukko 1), mutta niiden lisäksi mukaan valittiin CV-A2, E-3 ja HPeV-1.

Kuopat pestiin kerran PBS:llä. PBS poistettiin ja kuoppiin lisättiin 100 µl 4 %:sta PBS:ään tehtyä formaldehydiä solujen fiksaamiseksi. Formaldehydi saa näytteen proteiinit kiinnittymään toisiinsa ja samalla virus inaktivoituu. Levyjä inkuboitin huoneenlämmössä 15 min. Formaldehydi poistettiin ja kuopat pestiin kolme kertaa 5 min PBS:llä. Tämän jälkeen kuoppiin lisättiin 200 µl 0,5 % PBS:ään tehtyä Triton X-100 -detergenttiä. Levyjä inkuboitin 10 min. Triton X-100 poistettiin ja kuopat pestiin kolme kertaa 5 min PBS-T:llä. Triton X-100 tekee soluihin reikiä, joiden kautta värjäysvasta-aine pääsee solun sisään. Tritonia ja PBS-T-liuoksia käytetään myös estämään epäspesifistä sitoutumista. Lopuksi kuoppiin lisättiin 200 µl PBS:ää ja levyt varastoitin 4 °C:een ennen värjäystä.

### 3.4 Solujen värjäys ja kuvantaminen

Värjäystä varten valmistettiin vasta-ainelaimennokset 3 %:een BSA:han PBS:ssä. Vasta-aineita käytettiin 1:100 laimennoksina, paitsi MAb LD -vasta-aine laimennettiin 1:20. Kuopista poistettiin PBS ja niihin lisättiin 60 µl primaarista vasta-ainelaimennosta. Levyjä inkuboitin huoneenlämmössä n. 1 h. Laimennos poistettiin ja kuopat pestiin kolme kertaa PBS:llä. Kuoppiin lisättiin 60 µl sekundaarista vasta-ainelaimennosta. Levyjä inkuboitin huoneenlämmössä, pimeässä n. 1 h. Laimennos poistettiin ja kuopat pestiin kuten edellä. Kuopista poistettiin PBS ja lisättiin 60 µl DAPI-väriä (sininen tumaväri) 1:2000 laimennoksena tehtynä 3 % BSA:han PBS:ään. Levyjä inkuboitin n. 10 min. Pesut toistettiin kuten edellä ja kuoppiin lisättiin 200 µl PBS:ää. Levyt varastoitin 4 °C:een ennen kuvantamista. Solut kuvannettiin Virusopin EVOS FL AUTO -mikroskoopilla.

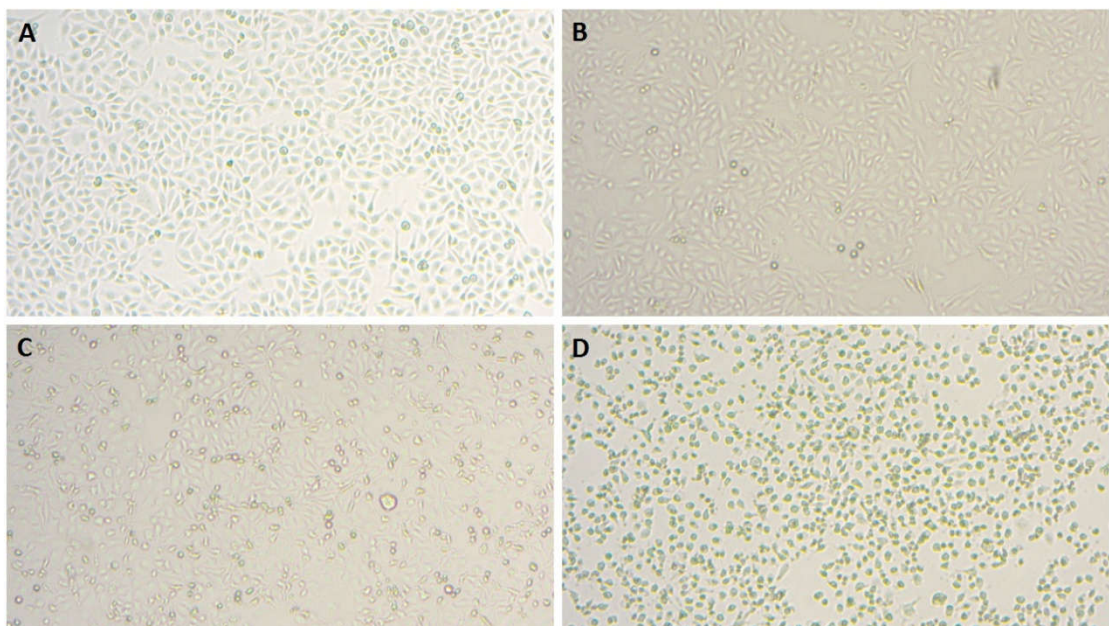
Taulukossa 4 on esitetty työssä käytetyt primaariset vasta-aineet sekä tarkempaa tietoa niistä. K316 on Virusopin ns. in-house polyklonaalinen vasta-aine (PAb), joka on tehty immunisoimalla kani puhdistetulla ihmisen parechovirus 1 (Harris) -isolaatilla. Muut primaariset vasta-aineet ovat monoklonaalisia. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary -vasta-ainetta ja polyklonaalisen vasta-aineen kanssa Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit -vasta-ainetta.

Taulukko 4. Primaariset vasta-aineet.

<b>Vasta-aine ja koodinumero</b>	<b>Valmistaja</b>	<b>Immunogeeni</b>	<b>Virukset, jotka valmistaja lupaa tunnistettavan</b>
MAb C01696M	Meridian	VP3	RV-A1, RV-A2, RV-A16, RV-B14, RV-B17 ja RV-B70
MAb C01697M (Clone B1578M)	Meridian	VP3	RV-A1, RV-A2, RV-A16, RV-A80, RV-B14, RV-B17 ja RV-B70
MAb C01698M (Clone B1579M)	Meridian	VP3	RV-A1, RV-A2, RV-A16, RV-A80, RV-B14, RV-B17 ja RV-B70
MAb C01700M (Clone B1591M)	Meridian	VP3	Useat enterovirustyyppit; 9 rinovirusta, 6 coxsackie B -virusta, 6 echovirusta, 4 coxsackie A -virusta, enterovirus 71 ja poliovirus
MAb HRV-16-7	QED Bioscience	VP2	RV-A1, RV-A16 ja RV-A39
MAb J2	English and Scientific Consulting Kft	dsRNA	Tunnistaa 2-nauhaisen RNA:n
MAb LD (Clone 9D5)	Millipore	-	Useat enterovirustyyppit; 8 coxsackie A -virusta, 6 coxsackie B -virusta, 13 echovirusta, 2 enterovirusta ja 3 poliovirusta
PAb K316	in-house	-	Tunnistaa parechovirustyyppit 1-6

## 4 TULOKSET

HeLa-E8-soluja infektoitiin ensin 6 h, sitten 24 h ja 48 h ajan. Infektion etenemistä seurattiin mikroskooppisesti ja infektiio näkyi ns. sytopaattisena vaikutuksena (CPE), jossa solut alkavat pyöristyä ja lopulta irtoavat kuopan pohjalta sekä hajoavat. Kuvassa 2 on esitetty infektoimattomat ja RV-B86-viruksella infektoidut solut 24 h ja 48 h aikapisteissä. Kuvasta näkyy selkeästi, että solut ovat pyöristyneet 24 h kohdalla merkkinä CPE:stä ja virusinfektiosta. Tämän perusteella valittiin 24 h aikapiste käytettäväksi IFA-kokeissa.



Kuva 2. Infektoimattomat ja infektoidut HeLa-E8-solut. Infektoimattomat solut 24 h inkuboinnin jälkeen (A). Infektoimattomat solut 48 h inkuboinnin jälkeen (B). RV-B86-viruksella infektoidut solut 24 h inkuboinnin jälkeen (C). RV-B86-viruksella infektoidut solut 48 h inkuboinnin jälkeen (D).

### 4.1 RT-qPCR- ja IFA-tulokset

Koska työssä ei ollut käytettävissä ns. kontrollivasta-ainetta, oli käytetyt virukset testattava RT-qPCR:llä virus-RNA:n suhteellisen kopia-luvun määrittämiseksi, ja tätä tulosta verrattiin IFA-tuloksiin. Työssä käytettiin aiemmin soluviljelmissä kasvatettuja pikornaviruksia, joiden RNA-genomin kopia-luku määritettiin RT-qPCR:n avulla. RT-qPCR- ja IFA-tulokset on esitetty taulukossa 5. RT-qPCR:n osalta on merkitty Ct-arvot.

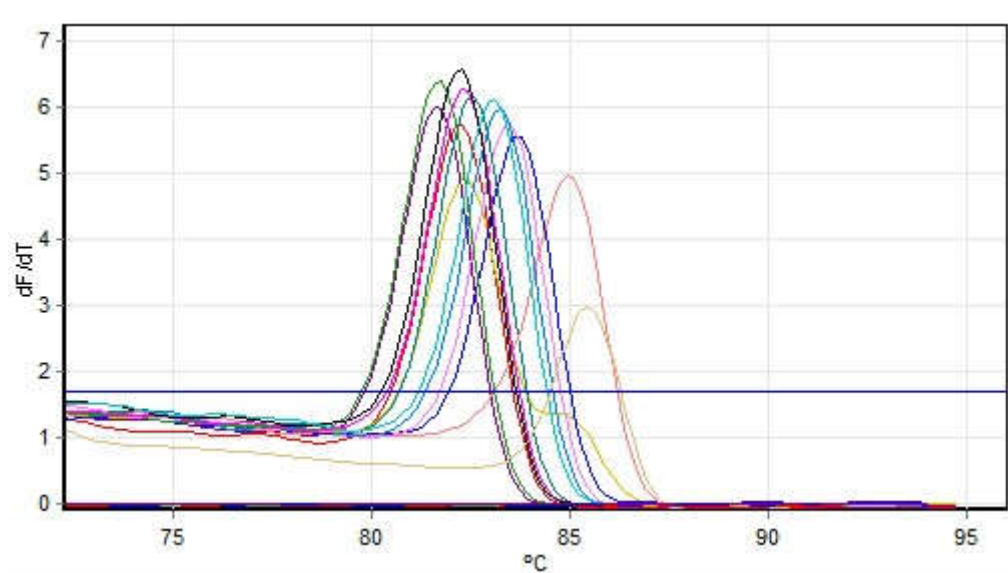


Ct (engl. threshold cycle) tarkoittaa kynnysyksiä, jonka signaali ylittää tietyn kynnysarvon (Suominen ym. 2010, 167). Mitä pienempi Ct-arvo on, sitä enemmän RNA:ta on ollut lähtötilanteessa. IFA-tulokset on merkitty siten, että + merkitsee positiivista tulosta, - negatiivista tulosta ja + / - epävarmaa tulosta. Positiivinen tulos tarkoittaa siis sitä, että vasta-aine on tunnistanut viruksen.

Taulukko 5. RT-qPCR- ja IFA-tulokset.

Virukset	Ct-arvot	Vasta-aineet							
		IFA-tulos: +, positiivinen; -, negatiivinen; + / -, epävarma							
		MAb C01696M	MAb C01697M	MAb C01698M	MAb C01700M	MAb HRV-16-7	MAb J2	MAb LD	PAb K316
CV-A2	-	-	-	-	-	-	+ / -	+ / -	-
E-3	-	-	-	-	+ / -	-	+ / -	+ / -	-
HPeV-1-A549	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RV-A1	10,05	+ / -	-	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-A2	16,69	+	+ / -	+	+	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-A10	19,87	+	+	+	+	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-A12	20,01	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-A16	18,52	+ / -	+ / -	-	-	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-A39	17,23	+	+	+	+	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-A49	13,29	+	+ / -	+	+ / -	-	+ / -	+ / -	-
RV-A60	15,23	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-	+ / -	+ / -	-
RV-A80	19,10	+	+ / -	+	+ / -	+ / -	+ / -	+	-
RV-B14	12,28	+	+ / -	+ / -	-	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-B17	11,33	+ / -	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-B48	16,87	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-	-
RV-B70	14,32	+ / -	-	+ / -	-	+ / -	+ / -	-	-
RV-B86	11,47	+ / -	+ / -	+ / -	-	+ / -	+ / -	+ / -	-
RV-B91	10,41	+ / -	-	+	+ / -	-	+ / -	+ / -	-
RV-C (592)	26,60	+ / -	+ / -	+	+	-	+	+	-
RV-C (RÖ)	26,00	-	-	-	-	-	-	-	-

Työssä mitattiin ensin virusnäytteiden kopioluku käyttäen diagnostista RT-qPCR-menetelmää, jota kutsutaan ENRI-nimellä. Koska käytettävissä ei ollut tarkkaa kopiolukua mittaavaa kontrollia, tuloksia tarkasteltiin Ct-arvon ja ns. sulamispistekäyrän avulla. Ct-arvot erosivat negatiivisista kontrolleista kaikkien näytteiden osalta vähintään 8,3-yksikköä, mitä voidaan pitää merkinä siitä, että kaikki näytteet ovat positiivisia. Testin sisäisenä kopioluvun muutoksena pidetään yleisesti arvoa 3,3 eli 3,3-Ct-arvon muutos vastaa 10-kertaista muutosta kopioluvussa. Sulamispistekäyriä tarkastelemalla voidaan todeta, että kaikissa näytteissä oli pikornaviruksille tyypillinen sulamispiste 81-84 °C lämpötiloissa. RT-qPCR-ajot suoritettiin kahdessa erässä ja kuvassa 3 on esitetty toisen ajon sulamispistekäyrät.

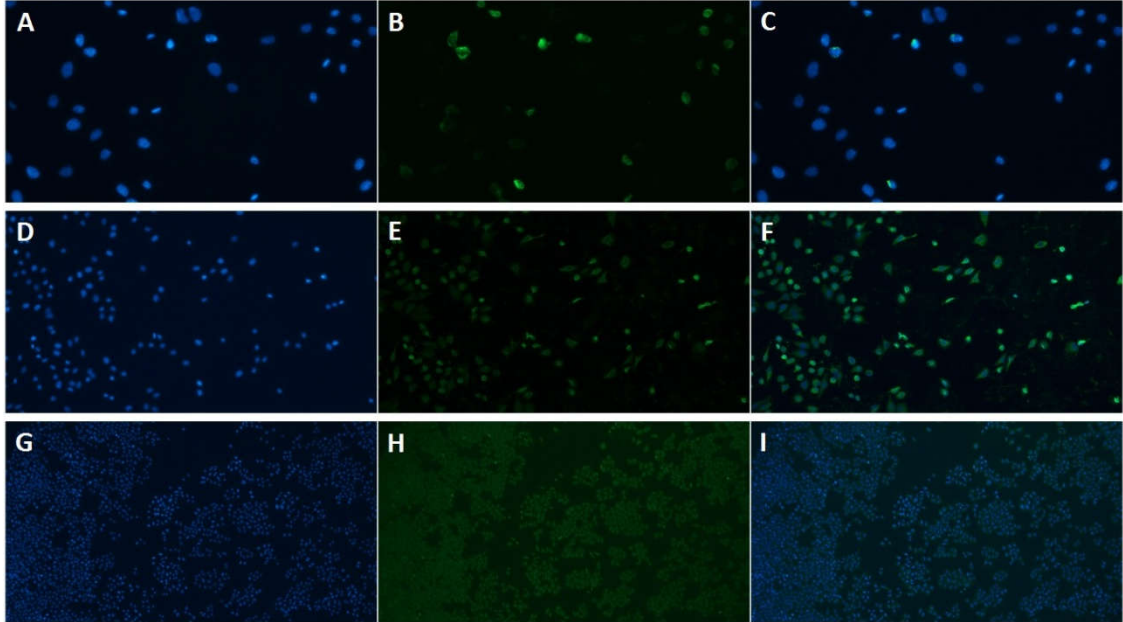


Kuva 3. RT-qPCR-ajon sulamispistekäyrät.

#### 4.2 IFA-kuvat

Vasta-aineessa oleva merkkiaine näkyy vihreänä värinä kuvissa ja sitä pitäisi periaatteessa erottua vain infektioituneissa soluissa, jotka vasta-aine on tunnistanut. Vihreää väriä näkyy kuitenkin kaikissa soluissa kuvissa, jotka on otettu fluoresenssi-kanavalla, mutta suurin osa siitä on taustaa. Mikäli vasta-aine on tunnistanut viruksen, vihreän värin tulisi erottua selvästi taustasta kuvassa. Tulos on epävarma, kun vihreää väriä erottuu taustasta, mutta ei selkeästi. Negatiivisessa tuloksessa taustasta ei erotu kirkkaampaa vihreää ollenkaan. Solujen tumat on värjätty sinisellä, joten sininen väri kertoo solujen sijainnin kuvissa. Kuvia on otettu kolmella eri kanavalla; sellaisella, jossa

näkyvät sininen tumaväri, sellaisella jossa näkyy vihreä fluoresenssi ja sellaisella, jossa näkyy näiden kahden yhdistelmä. Kuvassa 4 on esitetty esimerkki positiivisesta, epävarmasta ja negatiivisesta tuloksesta.



Kuva 4. Esimerkki positiivisesta, epävarmasta ja negatiivisesta IFA-tuloksesta. Positiivinen tulos, 20 x suurennos, RV-A39-virus, C01697M-vasta-aine (A-C). Epävarma tulos, 10 x suurennos, RV-A39-virus, HRV-16-7-vasta-aine (D-F). Negatiivinen tulos, 4 x suurennos, RV-C-#592-virus, HRV-16-7-vasta-aine (G-I). DAPI (A, D, G), fluoresenssi (B, E, H) ja yhdistelmä (C, F, I).

Kahdeksan eri vasta-ainetta testattiin 20 pikornavirustyyppiä vastaan (taulukko 5). MAb C01698M tunnisti virukset RV-A2, RV-A10, RV-A39, RV-A49, RV-A80, RV-B91 ja RV-C-#592. MAb C01696M tunnisti virukset RV-A2, RV-A10, RV-A39, RV-A49, RV-A80 ja RV-B14. MAb C01700M tunnisti virukset RV-A2, RV-A10, RV-A39 ja RV-C-#592. MAb LD tunnisti virukset RV-A80 ja RV-C-#592. MAb C01697M tunnisti virukset RV-A10 ja RV-A39 (kuva 4). MAb J2 tunnisti viruksen RV-C-#592. PAb K316 tunnisti viruksen HPeV-1-A549. MAb HRV-16-7 ei tunnistanut yhtään virusta. Epävarmoja tuloksia oli paljon suuren taustan vuoksi.

## 5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä testattiin kahdeksan vasta-ainetta 20 pikornavirustyyppiä vastaan. MAb C01698M ja MAb C01696M tunnistivat eniten viruksia. MAb C01698M tunnisti kaksi viruksista, jotka valmistaja oli ilmoittanut. Niiden lisäksi MAb C01698M tunnisti viisi muuta virusta, joita valmistaja ei ilmeisesti ole aiemmin testannut. MAb C01698M ei tunnistanut viittä virusta, jotka valmistajan mukaan olisi pitänyt pystyä tunnistamaan. Kolmella näistä viruksista saatiin epävarma tulos. MAb C01696M tunnisti myös kaksi valmistajan ilmoittamista viruksista. Niiden lisäksi MAb C01696M tunnisti neljä muuta virusta. MAb C01696M ei tunnistanut neljää virusta, jotka valmistajan mukaan olisi pitänyt pystyä tunnistamaan, kaikilla näillä viruksilla saatiin epävarma IFA-tulos.

20 testatusta viruksesta tunnistui yhdeksän virusta. Testatuista viruksista 15 oli A- ja B-lajin rinoviruksia, joista tunnistui seitsemän virusta. Jos ajatellaan, että A- ja B-lajin rinoviruksia on yhteensä sata, niin tilastollisesti käytetyillä vasta-aineilla tämän työn perusteella tunnistuisi 47 A- ja B-lajin rinovirusta. Todellisen tuloksen saisi jatkamalla vasta-aineiden ja viruksien testaamista.

Infektoitaessa kaikki solut eivät infektoidu käytetyllä virusmäärällä. Tämä tieto auttaa IFA-tuloksien tulkitsemisessä. Jos kaikissa soluissa näkyy kirkkaan vihreää, niin voi päätellä, että väri on taustaa. Epävarmoja tuloksia on paljon, sillä useissa kuvissa näkyy taustasta erottuvaa vihreää, mutta ei kuitenkaan kovin selkeästi. Lisäksi useissa näistä kuvista niissä, joissa näkyy molemmat värit, ei erotu vihreää, mikä hankaloittaa tuloksen tulkitsemistä.

RT-qPCR-tuloksista voi nähdä, että viruksia todella on näytteissä, sillä RNA on monistunut. Virusopilla on käytössä tapa, jossa 3,3 Ct-yksikköä vastaa 10-kertaista eroa kopioluvussa. Tämän avulla RT-qPCR- ja IFA-tuloksia voi suhteuttaa toisiinsa. Useat IFA:n positiivisista tuloksista on saatu viruksilla, joilla on korkea Ct-arvo. Näin ollen virusta on ollut näissä näytteissä vähemmän kuin matalamman Ct-arvon omaavissa näytteissä. Useat IFA:n negatiivisista tuloksista on taas saatu viruksilla, joilla on matala Ct-arvo. Tulos vaikuttaa varmalta, kun viruksia on näytteessä paljon ja tulos on negatiivinen tai kun viruksia on vähemmän ja tulos on silti positiivinen. Viruksilla RV-A12, RV-A16, RV-B48 ja RV-C (RÖ) oli suuret Ct-arvot verrattuna muihin käytettyihin viruksiin ja lisäksi paljon epävarmoja tai negatiivisia tuloksia. Suurentamalla näiden viruksien määrää voisi saada varmempia tuloksia lisätesteissä.

Virusien infektiivisyydestä olisi saatu varmempaa tietoa virustitrauksella ja tätä yritettiin, mutta työ epäonnistui ja rajallisen ajankäytön vuoksi ei ehditty tekemään uutta virustitrausta. Virustitrauksessa levyille jaetut konfluentit solut infektoidaan eri laimennoksilla viruksia, jonka jälkeen levyä inkuboidaan usean päivän ajan ja tarkkaillaan CPE:tä. Osan soluista voi jättää infektoimatta, koska silloin voidaan verrata infektoituneita soluja terveisiin soluihin.

Virusinfektion jälkeinen inkubointiaika vaikuttaa tulokseen. Työssä testattiin 6 h, 24 h ja 48 h inkubointiaikoja ja todettiin, että 24 h inkubointi oli toimivin vaihtoehto. On mahdollista, että positiivisia tuloksia on enemmän, sillä suuren taustan vuoksi IFA:n kuvia on voitu tulkita väärin ja esimerkiksi osa epäselvistä tuloksista voi olla positiivisia. Käytettyjen levyjen ja fluoresenssimikroskoopin laatu vaikuttavat IFA-tuloksien tulkinnassa. Tässä työssä käytetyllä mikroskoopilla sai tarkkoja kuvia. Myös vasta-ainelaimennos ja viruksen määrä vaikuttaa tulokseen, joten testaamalla eri laimennoksia voisi saada varmempaa tietoa. Uusissa testeissä voisi kokeilla myös eri solulinjoja, vaikka tässä työssä käytetyt solut vaikuttivat toimivan hyvin. Kaiken kaikkiaan opinnäytetyön tuloksena saatiin lisätietoa pikornavirusvasta-aineiden toimivuudesta ja tuloksia voidaan käyttää apuna jatkotutkimuksissa.

## LÄHTEET

Bochkov, Y.; Watters, K.; Ashraf, S.; Griggs, T.; Devries, M.; Jackson, D.; Palmenberg, A. & Gern, J. 2015. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. Viitattu 17.5.2016  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4418890/>.

Fritschy, J-M. & Härtig, W. 2001. Immunofluorescence. Viitattu 6.5.2016  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001174/full>.

Lönnrot, M.; Sjöroos, M.; Salminen, K.; Maaronen, M.; Hyypiä, T. & Hyöty, H. 1999. Diagnosis of Enterovirus and Rhinovirus Infections by RT-PCR and Time-Resolved Fluorometry With Lanthanide Chelate Labeled Probes. *Journal of Medical Virology* 3/1999, 378-384.

Microbiology and Immunology On-line 2016. Virology. Viitattu 28.4.2016  
<http://www.microbiologybook.org/virol/picorna.htm>.

Peltola, V.; Waris, M.; Österback, R.; Susi, P.; Ruuskanen, O. & Hyypiä, T. 2008. Rhinovirus Transmission within Families with Children: Incidence of Symptomatic and Asymptomatic Infections. *Journal of Infectious Diseases*, 2008 Feb 1;197:382-389.

Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Turun yliopisto 2016. Pikornavirusten tropismi ja patogeneesi. Viitattu 28.4.2016  
<https://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/Virusoppi/tutkimus/pikorna/Sivut/home.aspx>.

ViralZone 2016. Picornaviridae. Viitattu 28.4.2016  
[http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/33.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/33.html).