



**Kvantitatiivisten reaaliaikaisten EBV- ja BKV-
PCR-menetelmien verifiointi Stratagene
Mx3005P-laitteelle**

Bioanalytiikan koulutusohjelma
Bioanalyttikko
Opinnäytetyö
7.4.2009

Hanna Miettinen
Jannike Vyhtinen

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijät			
Hanna Miettinen ja Jannike Vyhtinen			
Työn nimi			
Kvantitatiivisten reaaliaikaisten EBV- ja BKV-PCR-menetelmien verifiointi Stratagene Mx3005P-laitteelle			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Kevät 2009	37 + 4 liitettä	
TIIVISTELMÄ			
<p>Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR on nopea ja herkkä menetelmä nykypäivän virusdiagnoosissa. Menetelmällä voidaan osoittaa näytteestä hyvinkin pieniä virusmääriä. Epstein-Barrin virus (EBV) ja BK-virus (BKV) ovat kaksisäikeisen DNA:n omaavia yleisiä taudinaiheuttajia. Näiden virusten määrittäminen on tärkeää etenkin elinsiirto- ja syöpäpotilaiden tautidiagnostiikassa.</p> <p>Teimme opinnäytetyömme HUSLABin virologian osastolle. Työmme tarkoituksena oli selvittää kvantitatiivisten reaaliaikaisten EBV- ja BKV-PCR-menetelmien soveltuvuus määritettäväksi Stratagene Mx3005P-laitteella. Määritimme 210 EBV-plasmanäytettä, joista 128 oli positiivisia ja 82 negatiivisia sekä 106 BKV-plasmanäytettä, joista 40 oli positiivisia ja 66 negatiivisia. Toistettavuuden selvittämistä varten valitsimme kaksi eritasoista EBV-näytettä ja kolme eritasoista BKV-näytettä. Työssä tutkitut näytteet olivat pakastettuja potilas- ja laadunvalvontanäytteitä, joiden viruspitoisuudet oli aiemmin määritetty ABI Prism 7900-laitteella. Virusten DNA:n eristämiseen näytteistä käytettiin automaattista nukleiinihappoeristyslaitetta, MagNA Pure LC ja määrittämiseen reaaliaikaista PCR-laitetta, Stratagene Mx3005P. Molempien tutkittavien menetelmien toiminta perustui ns. TaqMan®-menetelmään.</p> <p>Työssä vertailimme saatuja tuloksia ja niiden yhdenmukaisuutta keskenään. Tutkimme menetelmällä saatujen tulosten toistettavuutta, korrelaatiota, herkkyyttä sekä tarkkuutta. Tulokset analysoimme kolmella eri algoritmilla: adaptiivinen normalisoitu (EBV, BKV), non-adaptiivinen normalisoitu (EBV, BKV), non-adaptiivinen ei-normalisoitu (EBV) ja adaptiivinen ei-normalisoitu (BKV).</p> <p>Saamiemme tulosten korrelaatiot olivat erittäin vahvoja ($p=0,000$ EBV ja $p=0,000$ BKV) ja tulokset korreloivat keskenään erittäin voimakkaasti. Sen sijaan toistettavuus ei ollut aivan toivomallamme tasolla, mutta herkkyys ja tarkkuus olivat hyviä. Saadut tulokset tukivat aiempaa olettamusta. Tästä johtuen Stratagene Mx3005P soveltuu mielestämme varalaitteeksi EBV- ja BKV-määrittämiseen.</p>			
Avainsanat			
Epstein- Barrin virus, BK-virus, Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR, Verifiointi			

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services
Authors		
Hanna Miettinen and Jannike Vyhtinen		
Title		
Verification of Quantitative Real-Time PCR Assays for EBV and BKV		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Spring 2009	37 + 4 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>Quantitative real-time PCR (qPCR) can provide a fast and sensitive method in today's viral diagnostics. With this technique one is able to detect specific DNA from even low numbers of viruses in plasma. Epstein-Barr virus (EBV) and BK-virus (BKV) are common pathogens with double-stranded DNA. Detection of these viruses is important in diagnoses of transplant recipients and cancer patients.</p> <p>We made our final project for the HUSLAB Department of Virology. The objective of this study was to determine the suitability of a Stratagene Mx3005P analyzer for EBV and BKV quantitation. We analyzed 210 EBV plasma samples. From the samples 128 were EBV-positive and 82 samples were negative. We also analyzed 106 BKV samples. From these samples 40 were BKV-positive and 66 were negative. To evaluate repeatability, we chose two EBV and three BKV samples of a different level. In this study samples were frozen patient and quality control samples and they were analyzed earlier using an ABI Prism 7900 analyzer. In both assays we used an automated sample preparation system, MagNA Pure LC and real time PCR Stratagene Mx3005P analyzer. The quantification assay was based on TaqMan[®]-detection.</p> <p>We tested the specificity, sensitivity and repeatability. We also compared the results and their correlation. We analyzed the results with three different algorithms: adaptive normalized (EBV, BKV), non-adaptive normalized (EBV, BKV), non-adaptive non-normalized (EBV) and adaptive non-normalized (BKV).</p> <p>Results showed that the correlation between ABI Prism 7900 and Stratagene Mx3005P was statistically significant with both viruses (p=0,000 EBV ja p=0,000 BKV) Repeatability was instead not as good as we expected. Our conclusions supported previous hypotheses and therefore we consider that the Stratagene Mx3005P analyzer is suitable for the quantitative detection of EBV and BKV.</p>		
Keywords		
Epstein-Barr virus, BK-Virus, quantitative real-time PCR, verifying		

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	EPSTEIN-BARRIN VIRUS (EBV).....	2
2.1	Epstein-Barrin viruksen rakenne	2
2.2	Infektiomekanismit ja virologinen diagnostiikka.....	3
2.3	Elinsiirron jälkeinen lymfoproliferatiivinen sairaus, PTLD	3
3	BK-VIRUS (BKV).....	4
3.1	BK-viruksen rakenne	4
3.2	Infektiomekanismit ja virologinen diagnostiikka.....	4
4	TUTKIMUSASETELMA	5
4.1	PCR virusdiagnostiikassa	5
4.2	Menetelmän verifiointi	6
4.3	Verifiointin vaiheet.....	7
4.4	Aiemmat tutkimukset	8
4.4.1	EBV tutkimukset	8
4.4.2	BKV tutkimukset.....	8
4.5	Tutkimusongelmat.....	9
5	KÄYTETYT MENETELMÄT JA LAITTEET	10
5.1	DNA:n eristys MagNA Pure LC:llä	10
5.2	Polymeraasiketjureaktio eli PCR	11
5.3	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	12
5.3.1	Määrittäminen menetelmät	13
5.3.2	Mittauksen kemia	14
5.3.3	ABI Prism 7900HT.....	14
5.3.4	Stratagene Mx3005P.....	15
6	TUTKIMUKSEN SUORITUS	15
6.1	Näytteiden valinta.....	15
6.1.1	EBV-näytteet.....	16
6.1.2	BKV-näytteet	16
6.2	Tutkimuksen suoritus	17
6.2.1	Oligonukleotidien laimennus	17
6.2.2	EBV-työn suoritus	17
6.2.3	BKV-työn suoritus.....	19
7	TULOKSET	20
7.1	Tulosten hyväksyminen	20
7.2	Tulosten analysointi.....	20
7.3	PCR-tulosten käsittely	22
7.4	EBV:n tulokset	24
7.4.1	EBV tulosten korrelaatio.....	24

7.4.2	EBV tulosten toistettavuus	25
7.4.3	EBV-määritysmenetelmän sensitivisyys ja spesifisyys	27
7.5	BKV:n tulokset.....	28
7.5.1	BKV tulosten korrelaatio	28
7.5.2	BKV tulosten toistettavuus	29
7.5.3	BKV-määritysmenetelmän sensitivisyys ja spesifisyys	31
8	TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI.....	31
9	JOHTOPÄÄTÖKSET	32
	LÄHTEET	35

LIITTEET	1–4	1 Tulokset EBV-viruksen näytteiden määrittämisistä
		2 Tulokset BK-viruksen näytteiden määrittämisistä
		3 Käytetyt tarvikkeet, reagenssit ja laitteet
		4 BKV-monistuskäyrät

1 JOHDANTO

Epstein-Barrin virus (EBV) ja BK-virus (BKV) ovat yleisiä taudinaiheuttajia eli patogeenejä. Lähes kaikki ihmiset sairastavat näiden virusten aiheuttamat infektiot jossain elämänsä vaiheessa, yleensä jo varhaisnuoruudessa, ja kantavat näiden virusten vastaaineita veressään loppuelämänsä. Tunnetuin EBV:n aiheuttama tauti on mononukleosi eli ”pusutauti”. BK-viruksen primaari infektio on yleensä oireeton, jonka jälkeen se jää latentiksi elimistöön odottamaan reaktivoitumista.

Näiden kahden viruksen määrittäminen on erittäin tärkeää niin elinsiirron saaneiden kuin syöpää sairastavien henkilöidenkin tautidiagnostiikassa. Ennen elinsiirtoa henkilö saatetaan immunosuppressiotilaan, jolloin ehkäistään elimistön hyljintäreaktio vastaanotettua elintä kohtaan. Immunosuppressio voi laukaista latenttina piilevän viruksen reaktivaation, mikä voi olla hyvinkin kohtalokasta elinsiirron saaneelle tai syöpää sairastavalle potilaalle. (Porkka – Elonen 2007: 450.) Tästä syystä on tärkeää, että laboratoriolle on käytössä hyvät ja toimivat menetelmät, jotta saataisiin luotettavat tulokset reaaliajassa lääkäreiden luettavaksi. HUSLABissa molempien virusten nukleiinihappo-osoituksessa käytetään reaaliaikaista kvantitatiivista polymeerasireaktiota (PCR), jossa sekä geenin monistus että monistetun tuotteen määrittäminen tapahtuvat samanaikaisesti.

Teemme opinnäytetyömme HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueeseen kuuluvalla virologian osastolle. Tutkimusaiheemme on työelämälähtöinen ja sen esitteli virologian osaston mikrobiologi Laura Mannonen. Aiheemme on EBV (Epstein-Barrin virus)- ja BKV (BK-virus)- PCR-määrittämenetelmien siirto ABI Prism 7900-laitteelta Stratagenen Mx3005P-laitteelle. Virologian yksikössä on tällä hetkellä ABI Prism 7900:n varalaitteena vastaava vanhempi laite. Tämä laite on kuitenkin jo sen ikäinen, että siihen ei jatkossa ole muun muassa vara-osia saatavilla. Lisäksi on todettu, että laite ei sovellu BKV:n määrittäykseen. Virologian yksikkö on päättänyt varalaitteen vaihtamiseen, koska Stratagenen laite on halvempi ja käytössä todettu yhtä hyväksi kuin ABI Prism 7900-laite. Stratagenen valintaa puoltaa myös se, että laite on erityisesti suunniteltu ns. multiplex-PCR-reaktiolle, jossa mitataan useampaa fluoresoivaa molekyyliä samasta reaktiosta.

2 EPSTEIN-BARRIN VIRUS (EBV)

Epstein-Barrin virus luokitellaan kuuluvaksi gammaherpesvirusten sukuun ja se on yksi ihmisen yleisimmistä infektioiden aiheuttajista. Sen aiheuttamista taudeista tunnetuin on mononukleoosi, joka tunnetaan paremmin nimellä ”pusutauti”. Sen luonteenomaisin piirre on aiheuttaa latenti infektiot B-lymfosyyteissä. Epstein-Barrin virusta esiintyy yleisesti kaikissa maanosissa. Tiettyjen EBV-infektioon liittyvien tautien levinneisyydessä on maantieteellisiä eroja. (Hukkanen 2007: 479-480.)

Jopa 90–95 % nuorista aikuisista saa EBV-infektion elämänsä aikana. Varhaisessa lapsuudessa sairastettu EBV-infektio on usein oireeton tai vähäoireinen ja jää sen takia huomaamatta. Tutkimuksilla on osoitettu, että EBV:n tarttuvuus ihmisestä toiseen on hyvin vähäinen. EBV:n tartuntatietä on pääasiassa sylki. Tartunta voi tapahtua esimerkiksi limakalvokontaktissa tai syljen kontaminoimista ruokavälineistä. Tartunta voi myös tapahtua verensiirron välityksellä, mutta se on erittäin harvinaista. EBV-infektion jälkeen noin 15–20 % oireettomista viruksen kantajista erittää virusta sylkeen vielä kuu-kausien ajan. (Hukkanen 2007: 482.)

2.1 Epstein-Barrin viruksen rakenne

EBV:n virionin rakenne on samanlainen kuin muidenkin herpesvirusten. Virus on muodoltaan pyöreä noudattaen ikosahedraalista symmetriaa ja siinä on 162 kapsomeeriä eli viruksen rakenneyksikköä. Sen kapsidia ympäröi tegumentti-materiaali ja tätä vaippa, jossa on viruksen glykoproteiineja. Viruksen genomi on lineaarinen, kaksisäikeinen DNA ja siinä on EBV:lle ominaisia sisäisiä toistojaksoja, sekä genomissa on lyhyet toistojaksot (TR, terminal repeat), joiden välityksellä DNA muuttuu infektoituneessa solussa rengasmaiseksi molekyyliseksi eli episomiksi. Viruksen DNA on kooltaan noin 172 000 emäsparia. EBV:llä on kaksi serotyyppiä, EBV-1 ja EBV-2, joilla on anti-geenistä eroa EBNA-2- ja 3-proteiineissa. Euroopassa ja Yhdysvalloissa EBV-1 on yleisempi kuin EBV-2, kun taas Afrikassa serotyypit 1 ja 2 ovat yhtä yleisiä. (Hukkanen – Leinikki – Linnavuori – Suni 1998: 724–725; Lennette 1995: 905–907; Hukkanen 2007: 482.)

2.2 Infektiomekanismit ja virologinen diagnostiikka

Virus replikoituu sylkirauhastiehyiden soluissa ja nielun epiteelisoluissa. Se infektoi myös B-soluja jo hyvin varhaisessa vaiheessa ja aiheuttaa niihin latentin infektion. EBV-reseptorina B-solun pinnalla toimii CD21, joka on komplementin C3d-komponentin reseptori. Viruksen glykoproteiini gp350/220 on CD21-molekyylisiin tarttuva ligandi. Glykoproteiini vastaa myös viruksen tunkeutumisesta solun sisään. Infektioituneessa solussa seuraa joko lyyttinen tai latentti infektio. (Hukkanen 2007: 479–480; Loginov 2007: 31.)

EBV-infektioiden ja etenkin EBV-mononukleosin virologinen diagnostiikka on hyvin yksinkertaista. Lähes aina riittää IgM-luokan vasta-aineiden määrittäminen EBV:lle. Tämä tutkimus tehtävissä yhdestä verinäytteestä. Näitä EBV-IgM-testejä tehdään virologian laboratorioissa. Muut testit ovat epäspesifisempiä tai sopivat paremmin epidemiologiseen ja syöpäimmunologiseen tutkimukseen. Virusviljely ei ole EBV- diagnostiikassa mahdollista. (Hukkanen 2007: 484; Hukkanen ym. 1998: 729.)

PCR ja suora nukleiinihappomääritys ovat tutkimuksen hyviä apuvälineitä. Elinsiirto potilaiden lymfoproliferatiivisten tilojen selvittelyssä käytetään kvantitatiivista EBV-PCR-määrittystä verinäytteistä. HUSLAB käyttää tässä kvantitatiivista reaaliaikaista geenimonistusta PCR:ää. Pääsääntöisesti tutkimuksiin käytetään plasmaa, mutta myös seerumia ja kokoverta voidaan käyttää. Tutkimuksen tarkoituksena on osoittaa verestä EBV-infektion aktiivisuus (replikaatio). Tulokseksi saadaan plasman DNA-genomiekvivalenttimäärä, joka kuvastaa EBV-infektion vakavuusastetta. Lisäksi virusantigeneja voidaan määrittää myös imusolmukkeista, pernasta, maksasta ja kasvainten biopsianäytteistä. (Hukkanen 2007: 484; HUSLAB 2008a; Lennette 1995: 905–907.)

2.3 Elinsiirron jälkeinen lymfoproliferatiivinen sairaus, PTLD

Epstein-Barrin virus on liitetty useisiin pahanlaatuisiin tauteihin, joista parhaiten tunnettuja ovat EBV-lymfoomat ja elinsiirron jälkeinen lymfoproliferatiivinen sairaus, PTLD. PTLD nimi tulee englanninkielisistä sanoista post-transplant lymfoproliferative disorders ja tarkoittaa imusolujen kasvaimenomaista leviämistä. EBV-infektio elinsiirron jälkeen voi olla todella vaarallinen ja se voi johtaa elinsiirron jälkeiseen lymfoproliferatiiviseen sairauteen. Yleisesti tauti todetaan noin vuosi elinsiirron jälkeen. PTLD:tä tavataan 1-10 %:lla elinsiirtojen jälkeen. Ennen elinsiirtoa potilas saatetaan immunosup-

pressiotilaan esimerkiksi säteilyn tai lääkkeiden avulla, näin pyritään ehkäisemään mahdollinen hyljintäreaktio. Immunosuppressiopotilaat ovat alttiimpia saamaan infektioita. (Porkka – Elonen 2007: 450.)

3 BK-VIRUS (BKV)

BK-virus on ensimmäisen kerran pystytty määrittämään munuaissiirron saaneelta potilaalta vuonna 1971 ja se on saanut nimensä tämän henkilön nimikirjainten mukaan. BK-virus kuuluu polyoomaviruksiin. Ihmisen polyoomavirukset taas kuuluvat papovavirusten heimoon. Polyoomaviruksiin kuuluvat BK-viruksen lisäksi JC-virus ja Simian virus 40 (SV40) sekä vuonna 2007 löydetty Ki- ja Wu-virukset. Nämä virukset on luokiteltu yhteen kokonsa, kapsidin muodon sekä antigeenisen samankaltaisuutensa perusteella. (Munksgaard 2004; Jartti – Hedman - Söderlund-Venermo – Hyypiä – Ruuskanen 2008: 2313–2319.)

3.1 BK-viruksen rakenne

BK-viruksella on ikosahedraalinen rakenne ja kaksisäikeinen DNA, joka sisältää n. 5000 nukleotidiparia. Kapsidi on halkaisijaltaan 38 – 44 nm ja se on muodostunut 72 kapsomeerista. Lisäksi BK-viruksella on kyky hemagglutinoida punasoluja. (Major 1995: 1090–1095; Frisque 1999: 876.)

3.2 Infektiomekanismit ja virologinen diagnostiikka

Suurella osalla aikuisväestöstä on polyoomavirus vasta-aineita. Maailmanlaajuinen seroprevalenssitapausten määrä aikuisilla on 60 – 80 %. Ensimmäinen tartunta saadaan yleensä lapsuudessa hengitysteiden kautta ja virus jää latentiksi virtsa- ja sukupuolielinten alueelle tai munuasiin. BK-virus vasta-aineita on löydetty jopa 50 %:lla 3-vuotiaista lapsista. Primaari-infektio on yleensä oireeton. Mikäli oireita esiintyy, ne ovat yleensä hengitysteiden oireita. Latentin viruksen voi aktivoida esimerkiksi lääkitys tai immunosuppressio. BK-viruksen reaktivaation on todettu olevan yksi syy vakavaan munuaisen toimintahäiriöön etenkin munuaissiirron saaneilla potilailla sekä luuydinsiirtopotilailla. Reaktivaatio voi myös aiheuttaa immunosuppressiopotilailla hemorragisen kystii-

tin eli verivirtsaisuuden. (Auvinen – Vaheri 2007: 598; Weiskittel 2002; Munksgaard 2004; Forber - Sahm - Weissfeld 1998: 974.)

BK-viruksen tarkka tartuntareitti on tuntematon. Vaikuttaisi kuitenkin siltä, että virus tarttuu ihmisestä toiseen hengitysteiden eritteiden välityksellä. Tosin PCR-tekniikalla ei tutkimuksissa ole havaittu viruksen DNA:ta lasten sylki- ja nenänielunäytteissä. (Munksgaard 2004.) PCR on kuitenkin tärkeä menetelmä viruksen määrittämisessä etenkin plasma- tai seeruminäytteistä, sillä PCR:llä pystytään määrittämään spesifistä DNA:ta pienistäkin viruspitoisuuden omaavista näytteistä (Weiskittel 2002).

4 TUTKIMUSASETELMA

Opinnäyttemme on muodoltaan tutkielma, jonka tarkoituksena on verifioida uusi laite virologian yksikköön sekä tuottaa verifiointin vaiheista ja tuloksista kirjallinen raportti. Tässä kappaleessa kuvaamme verifiointin periaatteita ja vaiheita sekä käymme läpi muutaman työmme teoriaosuudessa käyttämämme aiemmin julkaistun artikkelin EBV- ja BKV-määrittämisestä.

4.1 PCR virusdiagnostiikassa

Geenimonistusmenetelmien etuja muihin perinteisempiin virusdiagnostisiin menetelmiin on herkkyys ja se, että niillä voidaan osoittaa näytteestä hyvinkin pieniä virusmääriä. Menetelmällä on teoriassa mahdollista todeta 100 mikrolitrasta näytettä yksi viruspartikkeli. (Vuorinen 2005: 33–34.) Vaikka geenimonistusmenetelmien herkkyys on suuri etu, voidaan sitä pitää myös menetelmän haittapuolena, sillä se lisää kontaminaatoriskiä ja näin ollen myös väärin positiivisten tulosten riskiä (Heikkilä ym. 2005: 96–97).

PCR on menetelmänä nopea ja pääsääntöisesti tulos saadaan yhden työpäivän kuluessa. Lisäksi menetelmällä pystytään määrittämään sellaisia viruksia, joita ei syystä tai toisesta kyetä kasvattamaan virusviljelmissä. PCR:llä voidaan monistaa virusta monenlaisista näytelaaduista. Yleisesti käytetään seerumi-, plasma- tai virtsanäytteitä näytteenoton helppouden vuoksi. Näytteitä voidaan ottaa myös sieltä, missä potilaan oireet ilmenevät, kuten selkäydinnesteestä. Koska PCR on herkkä menetelmä, tulisi näytteenottoon kiin-

nittää erityistä huomiota kontaminaation välttämiseksi. Näytteet tulisi ottaa tehdaspuh-taisiin näytteenottoputkiin. Putkia ei pitäisi avata näytteenoton jälkeen eikä näytettä saisi kaataa putkesta toiseen. (Vuorinen 2005: 33–34.)

Veressä on PCR-reaktion inhibiittoreita, joten muun muassa sen vuoksi plasma tai see-rumi tulisi sentrifugoida 24 tunnin kuluessa näytteenotosta. Yksi tehokkaimmista inhi-biittoreista on hepariini, joten hepariiniveri ei kelpaa PCR-määrittelyyn. Näytteet tulisi säilyttää jääkaappilämpötilassa, mikäli niitä ei pystytä toimittamaan tutkivaan laborato-rioon näytteenottopäivänä. (Vuorinen 2005: 33–34.) Erottelu vuorokauden kuluessa näytteenotosta on oleellista, jotta vältetään vääriä positiivisilta tuloksilta. Reaaliaika-PCR:llä määritetään aktiivista virusta, joka näytteessä sijaitsee solun ulkopuolella, eli tässä tapauksessa plasmassa. Mikäli erottelu viivästyy, pääsee mahdollisesti solun sisäl-lä oleva ei-aktiivinen virus solun ulkopuolelle ja tuloksena on väärä positiivinen tulos.

Useiden mikrobien kohdalla kvalitatiivinen tieto on riittävä. Mikäli on tarvetta kvantita-tiiviselle tulokselle, saadaan tulos vertaamalla näytteen monistumista vakioihin. Lisäksi monistusmenetelmillä saatua nukleiinihappoa on mahdollista edelleen tyyppittää käyttä-mällä eri koettimia. (Pasternack 2002: 17–18.)

4.2 Menetelmän verifiointi

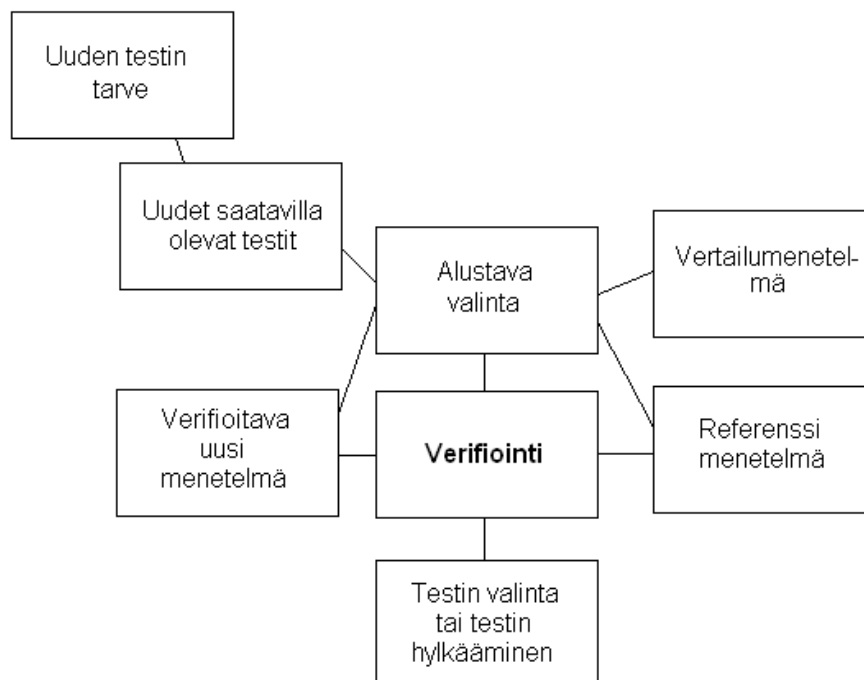
Validointi on menetelmän kelpoistamista. Validoinnilla ja verifioinnilla varmistetaan, että menetelmällä saadaan luotettavia ja toistettavia tuloksia. Perusvalidointi eli primää-rinen validointi tehdään, jos kyseessä on kokonaan uusi menetelmä tai menetelmää on muutettu. Verifiointi eli sekundaarinen validointi tehdään, kun halutaan varmistaa, että jo validoitu menetelmä toimii odotusten mukaisesti. (Liimatainen 2002: 12–13.) Vali-doinnilla varmistetaan menetelmän kyky antaa oikeita tuloksia. Lisäksi pyritään rinnak-kaismittausten avulla selvittämään menetelmän toistettavuus. Laboratorion laadunvar-mistuksen tärkeimpiä tavoitteita on tulosten virheettömyys. Niinpä tärkein validoinnin ja verifiointin yhteydessä tarkasteltava ominaisuus on tulosten tarkkuus aiotussa käyttö-tarkoituksessa. (Jaarinen – Niiranen 1997: 16–18, 30–35.)

Mikrobiologiassa ei ole käytössä varsinaisia standardimenetelmiä, joihin uutta mene-telmää voisi verrata. Myöskään käytännön toteuttamiselle ei ole olemassa yleisesti hy-väksytyjä suosituksia. Lisäksi ongelmana on positiivisten näytteiden niukkuus, jolloin saatetaan joutua valmistamaan positiiviset näytteet itse. Validoinnin ja verifiointin li-

säksi menetelmien toimivuutta tulee jatkossa seurata sisäisten kontrollien ja ulkoisten laadunarviointinäytteiden avulla. (Liimatainen 2002: 12–13.) Validoinnista tai verifiointista on tehtävä raportti, josta ilmenee mitä ja miten on testattu, ajankohta, tulokset ja johtopäätökset. Parametreja joita tutkitaan, ovat muun muassa herkkyys eli sensitiivisyys, tarkkuus eli spesifisyys ja toistettavuus. (Ikäheimo 2002: 13–14.)

4.3 Verifiointin vaiheet

Kuviossa 1. on esitetty Ikäheimon artikkelia mukaillen verifiointin vaiheet. Verifiointin ensimmäisessä vaiheessa huomataan tarve esimerkiksi uudelle menetelmälle tai laitteelle. Tämän jälkeen lähdetään selvittämään minkälaisia uusia menetelmiä tai laitteita on laboratorion saatavilla ja tehdään alustava valinta. Tässä vaiheessa tulisi myös olla tiedossa minkälaista näyttemateriaalia käytetään testaukseen ja mikä on riittävä näytemäärä, jotta pystytään luotettavasti määrittämään uuden ja vanhan menetelmän tai laitteen tulosten yhtäpitävyys. Viimeisessä vaiheessa päätetään tulosten ja johtopäätösten perusteella hyväksytäänkö vai hylätäänkö kyseisen menetelmän tai laitteen käyttöönotto.



KUVIO 1. Verifiointin vaiheet (Ikäheimo 2002: 14).

4.4 Aiemmat tutkimukset

EBV:tä ja BKV:tä on tutkittu melko paljon, tutkimuksista suurin osa on tehty ulkomail- la. Useimmat näistä tutkimuksista liittyivät elinsiirron saaneiden potilaiden diagnostiikkaan ja eri PCR-menetelmien soveltuvuuteen EBV- ja BKV-määrityksissä. Seuraavissa kappaleissa on esitelty muutama Suomessa ja ulkomailla tehty tutkimus koskien tutki- miamme viruksia.

4.4.1 EBV tutkimukset

Epstein-Barrin viruksesta on tehty monia tutkimuksia ja julkaisuja. EBV:tä on tutkinut myös Klaus Hedmanin työryhmä vuonna 2003. Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää kantasolusiirtoihin liittyvän PTLD:n ja EBV:n liittymistä toisiinsa sekä onko kvantita- tiivinen reaaliaikainen PCR käyttökelpoinen menetelmä tutkittaessa EBV- DNA:ta see- ruminäytteistä. Tutkimuksessa käytettiin 103 PTLD-potilaan seeruminäytettä. Tutki- musmenetelminä työryhmä käytti reaaliaikaisen PCR:n lisäksi EBV:n *in situ*-hybridi- saatiota (*in situ*-hybridisaatio = DNA:n tai RNA:n osoittaminen soluista tai kudoksista) (Solunetti 2006), B-solu klonalisuuden tutkimista ja serologisia menetelmiä. Tutki- muksessa saatujen tulosten mukaan kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR soveltuu erin- omaisesti PTLD-potilaiden Epstein-Barrin viruksen kopioluvun seurantaan. (Aalto ym. 2003: 275–283.)

Epstein-Barrin viruksen määrittämistä on tutkinut Paula Marttinen vuonna 2007 opin- näytetyönään. Marttisen työn tarkoitus oli koestaa ja verifioida plasman Epstein-Barrin viruksen kvantitatiiviselle nukleinihappomääritykselle kaupallinen varamenetelmä. Työssä määritettiin 100 plasmanäytettä, joista osa oli tunnettuja EBV-positiivisia ja osa tunnettuja EBV-negatiivisia. Määritykset tehtiin sekä ”in-house”-menetelmällä että Qiagenin kaupallisella menetelmällä. Tutkimuksessa saadut tulokset osoittivat Qiagenin menetelmän soveltuvan hyvin P-EBV_{Nh}-tutkimukseen ja se voitiin ottaa varamenetel- mäksi. (Marttinen 2007.)

4.4.2 BKV tutkimukset

BK-viruksen määrittämisestä on olemassa jonkin verran aiempaa tutkimusta. Yksi tuo- reimista on Kanadassa tehty ja vuonna 2007 julkaistu tutkimus (Pang – Doucette – LeBlanc – Cockfield – Preiksaitis: 2007: 3568–3573.), jossa oli käytetty kvantitatiivista

reaaliaika PCR-analyysia. Menetelmällä pystyttiin määrittämään ja kineettisesti tarkkailemaan BK-viruksen esiintymistä virtsassa sekä veressä munuaisen siirron saaneilla potilailla. Tutkimuksessa käytettiin 607 virtsa- ja 223 plasmanäytettä, jotka oli kerätty 203 henkilöltä. Osalla tutkittavista oli BK-virus infektiioon liittyvä munuaissairaus, osa oli munuaisensiirron jälkeisessä tarkkailussa, osalla oli krooninen munuaissairaus ja osa terveitä luovuttajia. Tässä tutkimuksessa analyysit tehtiin LightCycler-laitteella.

Saadut tulokset osoittivat, että analyysi oli hyvin herkkä laajalla kvantitaatioalueella, lisäksi tarkkuus oli erittäin hyvä. Tutkimuksessa todettiin, että JC-virus, SV40, Epstein-Barrin virus ja sytomegalovirus eivät aiheuttaneet ristireaktiota määritettäessä BK-virusta. Reaaliaikainen PCR on tehokas keino määrittää BK-viruksen määrää virtsassa ja plasmassa munuaisen siirron saaneilla potilailla. Lisäksi menetelmällä pystytään tunnistamaan potilaan riski saada BK-virus-infektioon liittyvä munuaissairaus ja valvoamaan virologista vastetta hoitoon. Tutkimus selvitti myös, että reaaliaikainen PCR-menetelmä osoitti erinomaista herkkyyttä BK-virus määrityksissä verrattuna elektronimikroskoopilla tai sytologisesti tehtyihin tutkimuksiin.

Tämän lisäksi on muitakin tutkimuksia, joissa todetaan reaaliaika-PCR:n olevan hyvin käyttökelpoinen menetelmä määritettäessä BK-virusta, etenkin tilanteissa joihin liittyy potilaan riski saada infektiioon liittyvä munuaissairaus tai kun halutaan selvittää hoidon vastetta. Esimerkkinä tästä ovat Herman ym. vuonna 2001 ja Limaye ym. vuonna 2004 tekemät tutkimukset: Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipient: Evaluation using a quantitative real-time PCR technique sekä Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients.

4.5 Tutkimusongelmat

Työmme tarkoituksena on verifioida Stratagene Mx3005P-laitte virologian osaston käyttöön EB- ja BK-virusten osalta. Kyseisellä laitteella tehdään tällä hetkellä Noro- sekä influenssa A-virustutkimuksia. Lisäksi osastolla ollaan ottamassa käyttöön myös Pikorna-virusmääritys kyseisellä laitteella.

Tässä työssä pyrimme vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

- Kuinka ABI Prism 7900-laitteella saadut EBV- ja BKV-näytteiden tulokset yhtenevät Stratagene Mx3005P-laitteella saatujen tulosten kanssa? Minkälainen korrelaatio on tuloksilla?
- Minkälainen toistettavuus Stratagene Mx3005P-laitteella määritetyillä EBV- ja BKV-toistonäytteillä on?
- Minkälainen sensitivisyys ja spesifisyys EBV- ja BKV-menetelmillä on määritettäessä näytteitä Stratagene Mx3005P-laitteella?

5 KÄYTETYT MENETELMÄT JA LAITTEET

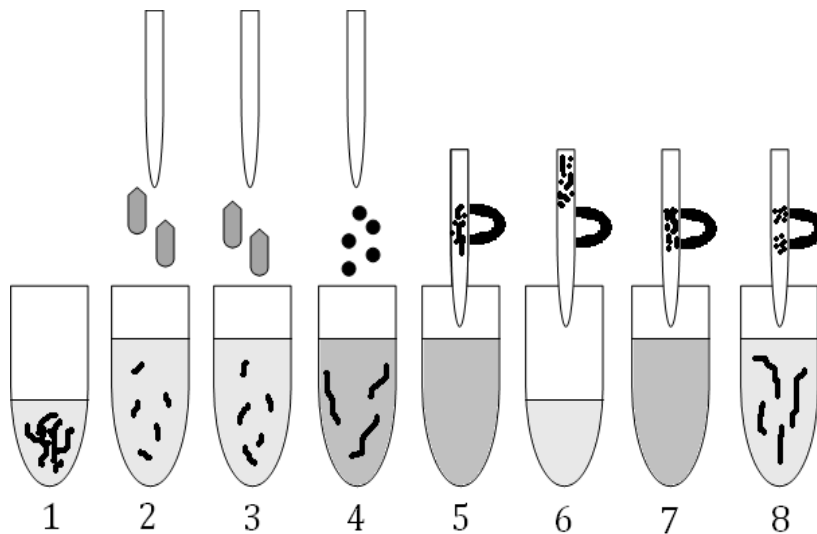
Nukleiinihappomonistus on tullut yhä yleisemmäksi mikrobien osoitusmenetelmäksi. Mikrobien genomissa on osia, joiden emäsjärjestys on tyypillinen kyseiselle mikrobille tai ryhmälle, johon mikrobi kuuluu. Pääsääntöisesti nukleiinihappojen osoitus perustuu tunnetun jakson entyymaattiseen monistamiseen viruksen genomista, esimerkkinä tästä polymeerasiketjureaktio eli PCR. (Pasternack 2002: 17–18; Heikkilä ym. 2005: 96–97.)

5.1 DNA:n eristys MagNA Pure LC:llä

Ennen PCR-määrittystä tulee monistettava DNA eristää ja puhdistaa reaktiota häiritsevistä tekijöistä, kuten proteiinista ja hemoglobiinista. DNA:ta voidaan eristää useilla menetelmillä, esimerkiksi fenoli-kloroformiuutolla, etanolisaostuksella, silikapylväs-menetelmällä tai automatisoidulla magneettipartikkeleihin perustuvalla laitteella, kuten MagNA Purella. (Suominen – Ollikka 2003: 61–65; Lappalainen ym. 1999.)

MagNA Pure LC on automatisoitu laite, jossa eristys perustuu silikapinnotettuihin magneettipartikkeleihin, jotka sitovat itseensä nukleiinihappoa. MagNA Purella pystytään eristämään DNA:ta, RNA:ta ja mRNA:ta. Kuviossa 2 on kerrottu MagNA Puren toimintaperiaate vaihe vaiheelta. Näytteet pipetoidaan ensin näyterasiaan (sample cartridge) (kohta 1). Sen jälkeen laite lisää näytteisiin hajotuspuskuria (Lysis Buffer), jonka tarkoituksena on hajottaa solut ja vapauttaa nukleiinihappo soluista (kohta 2) sekä proteinaasi K:ta, joka hajottaa näytteessä olevat proteiinit (kohta 3). Nukleiinihapot sitoutuvat näyt-

teeseen lisättäviin silikapinnotettuihin magneettipartikkeleihin (kohta 4), joista laite erottelee ne magneettisesti muusta hajonneesta materiaalista (kohta 5). Magneettipartikkeleihin tarttunutta nukleiinihappoa pestään useamman kerran, jotta sitoutumattomat aineet kuten proteiinit ja solukalvon osat, sekä PCR:ää inhiboivat aineet kuten hepariini tai hemoglobiini saadaan poistettua eristettävästä näytteestä (kohdat 6 ja 7). Laite eluoi puhdistetun nukleiinihapon magneettipartikkeleista, puskuriliuokseen korkean lämpötilan sekä matalan suolapitoisuuden avulla. Laite poistaa magneettipartikkelit eristetystä näytteestä magneettisesti (kohta 8). (Fiebelkorn – Lee – Caliendo – Nolte 2002; Roche Applied Science 2007.)

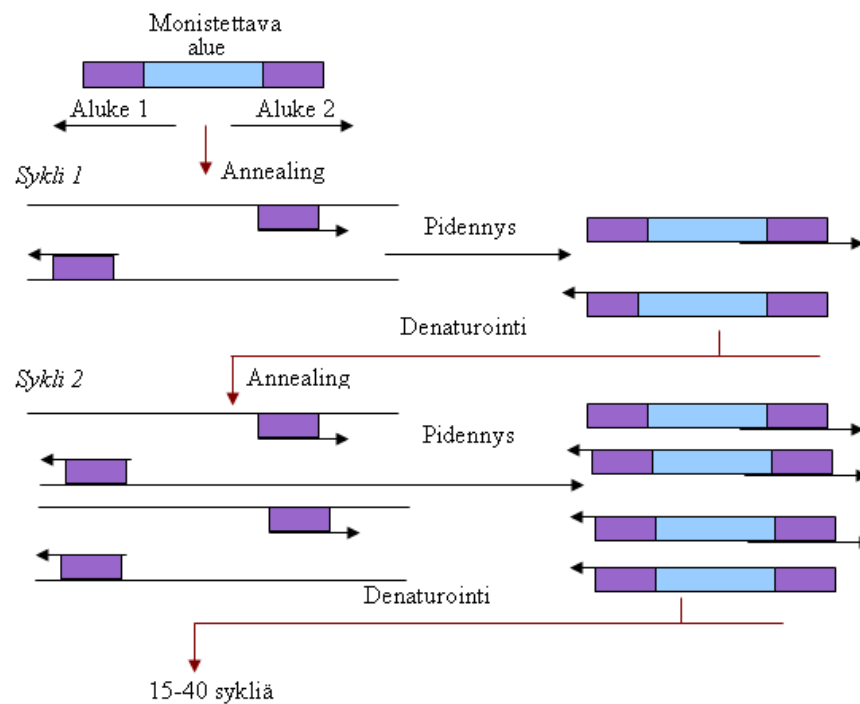


KUVIO 2. MagNA Pure LC:n toiminta periaate

5.2 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

DNA:n monistaminen PCR:llä edellyttää monistettavan jakson alku- ja loppupään nukleotidisekvenssien tuntemista, koska monistusta varten tarvitaan kaksi oligonukleotidialuketta (primer). Alukkeiden kiinnittyminen vaatii sekvenssien komplementaarisuutta eli sekvenssin on oltava sitoutuvalle juosteelle vastakkainen. Alukkeiden lisäksi PCR-reaktiota varten tarvitaan mallina toimiva DNA-jakso eli templaatti ja lämpöä kestävä DNA-polymeraasientsyymi, yleisimmin Taq-polymeraasi. (Suominen – Ollikka 2003: 107–109.)

Kuviossa 3. on esitetty PCR-reaktion eteneminen. Aluksi templaatin juosteet saatetaan erille toisistaan kuumennuskäsittelyllä (noin 95 °C) eli denaturoimalla. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkeksi (40-65 °C, noin 30 sekuntia), jotta alukkeet saadaan kiinnittymään templaattiin. Tätä kutsutaan annealing-vaiheeksi. Kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan DNA-polymeraasin optimilämpötilaan (noin 72 °C), joka on riippuvainen käytetystä entsyymistä. Tämän pidennysreaktion aikana templaatin kummallekin nauhalle syntyy vastin-nauha kummankin alukkeen avulla. Kun nauhan synteesi on valmis, lämpötilaa jälleen nostetaan (noin 95 °C). Denaturointi-annealing-pidennys sarjaa kutsutaan sykliksi, jonka aikana DNA-nauhan määrä kaksinkertaistuu. PCR-määrityksen aikana syklejä toistetaan useita kertoja peräkkäin, yleensä 15-40 kertaa. (Suominen – Ollikka; Aittomäki ym.2002: 68–70.)



KUVIO 3. PCR-reaktion vaiheet.

5.3 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Reaaliaikaisessa PCR:ssä (Real-Time PCR) monistus ja mittaus tapahtuu automatisoidulla laitteella, jossa termosyklerin ja PCR-reaktioblokin lisäksi on fluorometri. Reaaliaikainen PCR perustuu erilaisiin spesifisiin tai epäspesifisiin kemioihin. Yhteistä näille on käytettyjen fluoroforien lähettämän signaalin vahvuuden verrannollisuus syntyneen tuotteen määrään. (Kubista ym. 2006.) Reaaliaikainen PCR on menetelmänä nopea, sillä kohdesekvenssin monistuminen ja määrittäminen tapahtuvat samanaikaisesti. Lisäksi mene-

telmä on suljettu ja tästä syystä kontaminaation riski on pienentynyt. Reaaliaikaiset PCR-laitteet mittaavat fluoresenssia useammalla eri aallonpituudella. Tämä mahdollistaa muun muassa sisäisen kontrollin käytön, kun koettimet leimataan erilaisilla fluoresoivilla leimoilla. (Kuopion Yliopisto 2005; Gene Link™.) Fluoresenssi on ilmiö, jossa molekyyli absorboi fotonin eli valohiukkasen ja emittoi toisen fotonin. Valon absorptiolla saadaan aikaan viritystila, jossa tutkittavan näytteen molekyylit siirtyvät ylempälle energiatasolle (eksitaatio). Kun tämä viritystila purkautuu, syntyy emissio ja fotonit vapautuu. Emittoituneen valon aallonpituus on aina suurempi kuin absorboituneen valon. Tämä johtuu siitä, että atomin emittoiman fotonin ja absorboituneen fotonin energia eivät ole yhtä suuret. (Jaarinen – Niiranen 1997: 65; Gene Link™.)

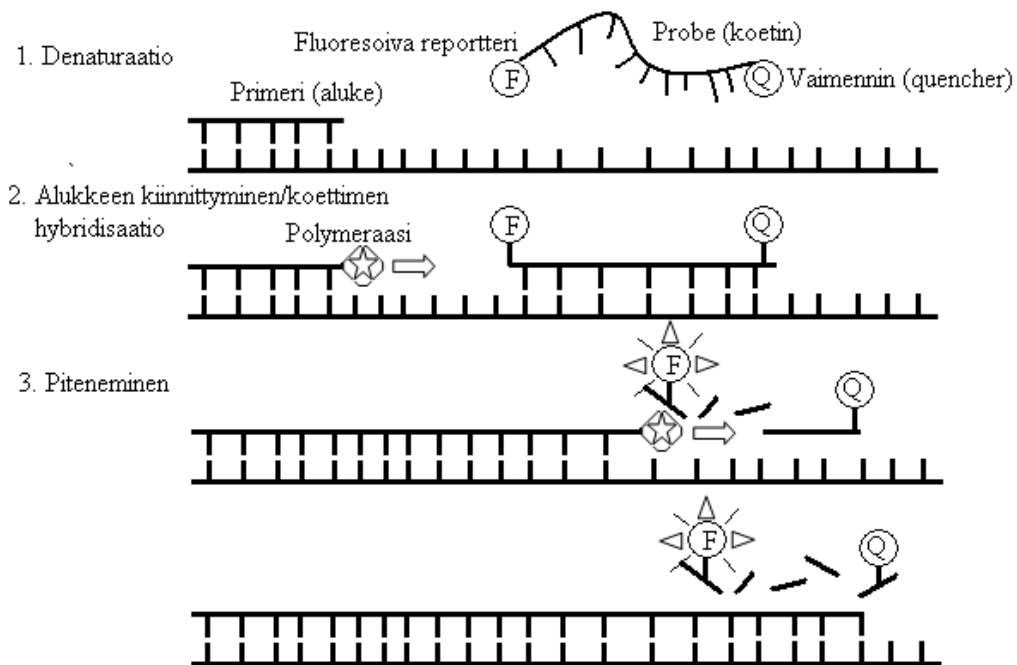
Menetelmä mahdollistaa lisäksi nukleiinihapon luotettavamman kvantifioinnin sekä mahdollisen näytteessä olevan viruksen osoituksen monistusreaktion aikana (Lappalainen ym. 1999). Reaaliaikainen PCR soveltuu kvantitatiivisiin mittauksiin, silloin kun käytössä on kohde-DNA:ta sisältäviä, konsentraatioltaan tunnettuja standardeja. Saadun standardisuoran perusteella laite määrittää viruksen genomien määrän näytteessä .

5.3.1 Määrittäminen menetelmät

Määrittämisessä voidaan käyttää DNA:han suoraan sitoutuvaa leima-ainetta eli fluoroforia tai leimattuja koettimia (probe). Ensin mainitusta voidaan käyttää myös nimitystä ei-spesifinen kemia, jossa yksi yleisimmistä käytetyistä väreistä on SYBR® Green I. Jälkimmäisessä eli spesifisessä kemiassa, on jokaiselle amplikonille suunniteltu fluoresoiva koetin, josta tunnetuin on TaqMan®-koetin. TaqMan®-koetin sisältää kaksi erilaista leimaa; reportterin (reporter) ja sammuttajan (quencher). Koetin pilkkoutuu samalla, kun polymeraasi valmistaa uutta juostetta. Koettimen pilkkoutuessa reportteri ja sammuttaja erkanevat, jolloin sammuttaja ei pysty enää vaimentamaan reportterin fluoresoivaa signaalia ja fluoresenssi vapautuu (kuvio 4.). Tämä fluoresenssin lisääntyminen mitataan ja sen määrä nousee monistusreaktioiden edetessä. (Kuopion Yliopisto 2005, Gene Link™.)

5.3.2 Mittauksen kemia

Molempien tutkittavien menetelmien toiminta perustuu ns. TaqMan®-menetelmään. Koettimen 5'-päässä on fluorofori, tässä tapauksessa FAM (fluoresiini) ja 3'-päässä on fluoresenssin estävä vaimennin, TAMRA. Laitteissa passiivisena referenssiväriä toimii ROX, jonka avulla tehdään fluoresenssitason normalisointi. Passiivinen referenssiväri ei osallistu PCR-reaktioon eikä sen fluoresenssitaso muutu reaktion aikana. Lisäksi ROX-väri fluoresoi sellaisella aallonpituusalueella, joka ei häiritse kvantitointia. Valmistajan (Stratagene) ilmoittama ROX-värin absorbtion korkein aallonpituus on 585 nm ja emis-sion korkein aallonpituus on 610 nm. (Stratagene; Gene Link™.)



KUVIO 4. Reaaliaikaisen PCR:n toimintaperiaate (TaqMan®).

5.3.3 ABI Prism 7900HT

Laitteessa on valonlähteenä laser. Fluoresenssin määrittäminen tapahtuu CCD-kennolla (Charge-Coupled Device) varustetulla kameralla, joka ”ottaa kuvan” levyn yläpuolelta ja näin mittaa näytteen lähettämän fluoresenssin. Laitteeseen sopivat sekä perinteiset 96 kuoppaiset levyt, että 384 kuoppaiset levyt. (Applied Biosystems 2008a.)

5.3.4 Stratagene Mx3005P

Laitteessa oleva halogeenivalo tuottaa herätevaloa, joka johdetaan näytteeseen valokaapelin avulla. Valokaapelin kuitukimppu on koaksiaalinen eli se kuljettaa herätevaloa ja samanaikaisesti tunnistaa näytteen lähettämän fluoresenssin. Havaittu valo kuljetetaan valomonistinputkelle (PMT, Photomultiplier Tube) valokaapelin kautta. Laitteeseen on mahdollista asentaa viisi erilaista eksitaatio-suodatinta käyttötarpeen mukaan. Laitteeseen sopivat sekä perinteiset 96 kuoppaiset levyt, että 384 kuoppaiset levyt. (Stratagene.) Taulukossa 1. on vertailtu ABI Prism- ja Stratagene-laitteita.

TAULUKKO 1. ABI Prism 7900 ja Stratagene Mx3005P laitteiden vertailu

	ABI Prism 7900	Stratagene Mx3005P
Menetelmä	TaqMan®	TaqMan®
Valonlähde	Laser	Halogeenivalo
Mittaus	CCD-kenno + kamera	Valokaapeli + valomonistinputki (PMT)
Kuoppalevyt	96 ja 384	96 ja 384

6 TUTKIMUKSEN SUORITUS

Seuraavissa luvuissa kuvataan tutkimukseen käytettyjen näytteiden valintaperusteita sekä kerrotaan itse tutkimuksen suorituksesta vaiheineen.

6.1 Näytteiden valinta

Positiiviset näytteet valittiin ohjaajamme Laura Mannosen ehdotusten perusteella, niin että EBV-näytteitä tulisi neljästä eri tasoryhmästä. BKV-näytteiden vähyyden vuoksi otimme tutkittavaksi kaikki olemassa olevat positiiviset potilasnäytteet sekä laaduntarkkailunäytteitä. Negatiiviset näytteet olivat molempien virusten osalta vuodelta 2008. Valitsimme kyseiset näytteet potilastietojärjestelmässä olevan tuloksen perusteella niin, että hyväksyimme vain sellaiset näytteet, joissa rinnakkaismääritysten molemmat tulokset olivat negatiivisia.

Tutkimukseen emme tarvinneet eettisen toimikunnan lupaa, koska käyttämistämme näytteistä oli jo tehty P-EBV_{Nh}- tai P-BKV_{Nh}-määritys, ja koska näytteistä tehtiin ainoastaan sitä määrittystä mitä niistä alun perin oli pyydetty. Lisäksi käsitelimme näytteitä nimettöminä, käyttäen putkessa olevaa numerosarjaa.

6.1.1 EBV-näytteet

P-EBV_{Nh}-määritys tehdään joko EDTA- tai ACD-plasmasta (HUSLAB 2008b). Tutkimuksessa käytimme pakastettuja plasmanäytteitä, joista P-EBV_{Nh}-tulos oli jo entuudestaan tiedossa. Otimme tutkimukseemme yhteensä 128 positiivista potilasnäytettä, jotka olivat pitoisuuksiltaan eri vahvuisia. Negatiivisia näytteitä oli 82, yhteensä siis 210 näytettä (taulukko 2.). Lisäksi jokaiseen ajoon kuului kaksi toistettavuusnäytettä (matala ja korkea) sekä positiivinen potilaskontrollinäyte. Näytteet olivat vuosilta 2007- 2009 ja ne oli säilytetty -20 °C:ssa.

TAULUKKO 2. EBV:n näytemäärät ja näytteistä määritettyjen EBV-genomien määrät.

Näytemäärät	Näytteiden EBV-genomimäärät
49 näytettä	500 – 1500 geq/ml
29 näytettä	1501 – 10 000 geq/ml
38 näytettä	10 001 – 100 000 geq/ml
12 näytettä	> 100 000 geq/ml
82 näytettä	Negatiiviset (< 500 geq/ml)
Yht.: 210 näytettä	

6.1.2 BKV-näytteet

P-BKV_{Nh}-määritys tehdään EDTA-plasmasta (HUSLAB 2007). Tutkimuksessamme käytimme pakastettuja plasmanäytteitä, joiden P-BKV_{Nh}-tulos oli jo tiedossa. Tutkimukseemme otimme kaikki 13.1.2009 mennessä tulleet positiiviset potilasnäytteet, joita oli yhteensä 31. Laaduntarkkailunäytteitä oli 10 ja loput näytteet olivat negatiivisia potilasnäytteitä, näytteiden kokonaismäärän ollessa 106 (taulukko 3.). Näytteet oli säilytetty -20 °C:ssa. Lisäksi jokaiseen määrittyskertaan kuului kolme toistettavuusnäytettä sekä positiivinen potilaskontrollinäyte.

TAULUKKO 3. BKV:n näytemäärät ja näytteistä määritettyjen BKV-genomien määrät.

Näytemäärät	Näytteiden BKV-genomimäärät
31 näytettä	Positiiviset (> 400 kopiota/ml)
65 näytettä	Negatiiviset (< 400 kopiota/ml)
10 näytettä	Laaduntarkkailunäytteet (> 400 kopiota/ml ja < 400 kopiota/ml)
Yht. 106 näytettä	

6.2 Tutkimuksen suoritus

Seuraavassa on esitetty standardien ja oligonukleotidien (Applied Biosystems'in valmistamat synteettiset alukkeet ja koetin) laimennus sekä eristyksen ja PCR-määrityksen työn suoritus virus kohtaisesti. Työssä tarvittavat tarvikkeet, reagenssit ja laitteet on esitetty liitteessä 3.

6.2.1 Oligonukleotidien laimennus

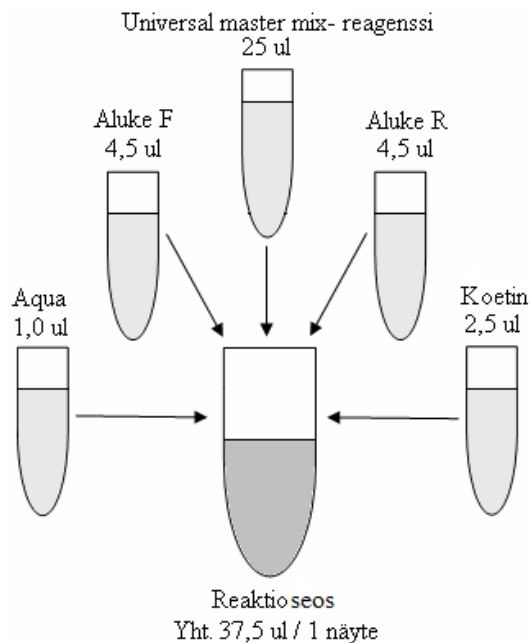
Kylmäkuivatut oligonukleotidit liuotettiin 100 µM:ksi, jaettiin alikvaatteihin ja pakastettiin -20 °C. Alikvaateista laimennettiin käyttöliuokset niin, että alukkeiden pitoisuudeksi tuli 10 µM, EBV-koettimen pitoisuudeksi 5 µM ja BKV-koettimen pitoisuudeksi 2,5 µM.

6.2.2 EBV-työn suoritus

Työ aloitettiin eristämällä näytteet MagNA Pure LC-laitteella. MagNA Pure sample cartridge -näyterasiaan pipetoitiin 200 µl plasmaa pipetointikaavion mukaisesti. Jokaiseen määrittyskertaan otettiin lisäksi mukaan vesikontrolli sekä positiivinen potilasnäytekontrolli. Eristysajon aikana valmistettiin puhtaassa huoneessa EBV-reaktioseosputket. Reaktioseosta varten varattiin riittävä määrä eppendorf-putkia, niin että jokaiselle näytteelle, standardeille (5 kpl) sekä nk. non templaatti kontrollia (NTC) varten varattiin yksi putki. EBV:n PCR-reaktiot tehtiin rinnakkaisina, joten reaktioseosta valmistettiin 2,25 kertaa putkien määrä. Lisäksi otettiin huomioon pipetointivara.

Reaktioseos valmistettiin 5 ml:n eppendorf-putkeen (kuvio 5.), josta seosta jaettiin 1,5 ml:n eppendor-putkiin. Yhteen PCR-reaktioon tarvittava määrä oli 37,5 µl. Koska jokainen näyte ajettiin rinnakkaisina, yhteen putkeen pipetoitava määrä oli 84 µl. Lisäksi NTC-putkeen pipetoitiin 28 µl vettä ($12,5 \times 2,25 = 28 \mu\text{l}$).

Eristettyä EBV-templaattia pipetoitiin rinnakkaisina, kuten edellä vettä NTC-putkeen eli 28 µl. Myös standardeja pipetoitiin 28 µl putkea kohti. Tämän jälkeen putket sekoitettiin hyvin vortexilla ja sentrifugoitiin. Seuraavaksi pipetoitiin 50 µl reaktioseos-templaatti seosta kuoppalevylle pipetointisuunnitelman mukaisesti. Pipetoinnin jälkeen kuopat suljettiin korkeilla ja ennen määritystä kuoppalevy sentrifugoitiin levysentrifugaalilla. (Menetelmäohje 2007.)



KUVIO 5. EBV-reaktioseos.

Stratagene Mx3005P ohjelmoitiin erillisen laiteohjeen mukaisesti. PCR-ohjelma eteni seuraavasti:

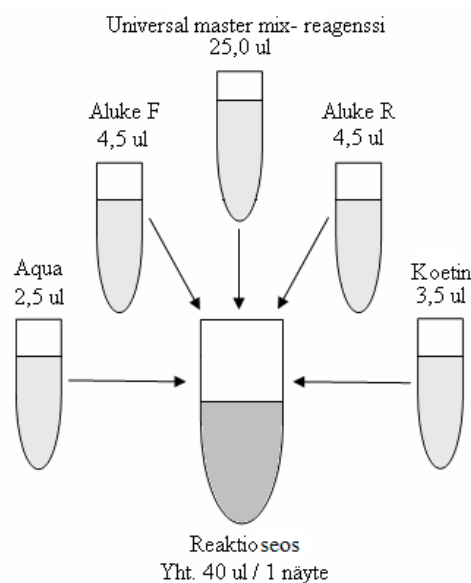
- 1) 50°C 2 minuuttia
- 2) 95°C 10 minuuttia
- 3) 95°C 15 sekuntia
- 4) 60°C 1 minuutti → vaiheita 3 ja 4 toistetaan 45 kertaa (Menetelmä ohje 2007.)

6.2.3 BKV-työn suoritus

Työ aloitettiin eristämällä näytteet MagNA Pure LC-laitteella. MagNA Pure sample cartridge -näyterasiaan pipetoitiin 200 µl plasmaa pipetointikaavion mukaisesti. Jokaiseen määrittyskertaan otettiin lisäksi mukaan vesikontrolli sekä positiivinen potilasnäytekontrolli. Eristysajon aikana valmistettiin puhtaassa huoneessa BKV reaktioseosputket. Reaktioseosta varten varattiin riittävä määrä eppendorf-putkia, niin että jokaiselle näytteelle, standardeille (5 kpl) sekä non templaatti kontrollia (NTC) varten varattiin yksi putki. BKV:n PCR-reaktiot tehtiin rinnakkaisina, joten reaktioseosta valmistettiin 2,25 kertaa putkien määrä. Lisäksi otettiin huomioon pipetointivara.

Reaktioseos valmistettiin 5 ml:n eppendorf-putkeen, josta seosta jaettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin (kuvio 6.). Yhteen PCR-reaktioon tarvittava määrä oli 40 µl. Koska jokainen näyte ajettiin rinnakkaisina, yhteen putkeen pipetoitava määrä oli 90 µl. Lisäksi NTC-putkeen pipetoitiin 28 µl vettä (10 x 2,25 = 22,5 µl).

Eristettyä BKV-templaattia pipetoitiin rinnakkaisina, kuten edellä vettä NTC-putkeen eli 22,5 µl. Myös standardeja pipetoitiin 22,5 µl putkea kohti. Tämän jälkeen putket sekoitettiin hyvin vortexilla ja sentrifugoitiin. Seuraavaksi pipetoitiin 50 µl reaktioseos-templaatti seosta kuoppalevylle pipetointisuunnitelman mukaisesti. Pipetoinnin jälkeen kuopat suljettiin korkeilla. Ennen ajoa kuoppalevy sentrifugoitiin levysentrifuugilla.



KUVIO 6. BKV-reaktioseos.

Stratagene Mx3005P ohjelmoitiin erillisen laiteohjeen mukaisesti. PCR-ohjelma eteni seuraavasti:

- 1) 50°C 2 minuuttia
- 2) 95°C 10 minuuttia
- 3) 95°C 15 sekuntia
- 4) 60°C 1 minuutti → vaiheita 3 ja 4 toistetaan 45 kertaa

7 TULOKSET

Tässä luvussa on esitetty tulosten analysointiin liittyviä parametreja sekä tulokset analysoimistamme näytteistä. Molempien virusten kohdalla olemme arvioineet tulosten korrelaatiota, toistettavuutta, sensitiivisyyttä (herkkyyttä) sekä spesifisyyttä (tarkkuutta).

7.1 Tulosten hyväksyminen

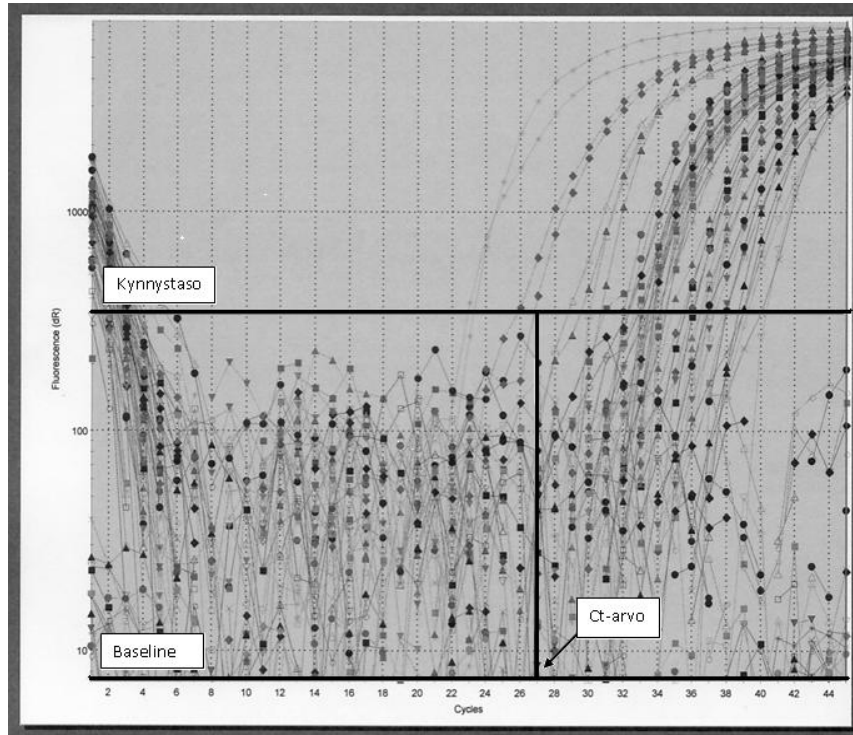
Kvantitatiiviset PCR-menetelmät ovat hyvin herkkiä menetelmiä ja tästä syystä saatujen tulosten välillä on aina jonkin verran variaatiota. Näytteet määritimme rinnakkaisina ja kahden rinnakkaisen kuopan välillä ero saa olla yhden kierros-syklin (CT-sykli) verran. Tilastollisissa laskuissa käytimme rinnakkaiskuoppien keskiarvoja. Saadut tulokset hyväksyttiin jos tulos oli verrattavissa aikaisemmin saatuun tulokseen. Jos virusten kopiomäärät poikkesivat alkuperäisestä tuloksesta kaksinkertaisesti, kyseinen näyte uusittiin. Seuraavassa on esitetty tulosten analysointiin liittyviä parametreja sekä tulokset analysoimistamme näytteistä.

7.2 Tulosten analysointi

Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR:ssä tulokset analysoidaan laitteen ohjelman mittaamien parametrien perusteella. Tarkempaa tarkastelua varten kirjasimme ja analysoimme tulokset Excel- ja SPSS-taulukkolaskentaohjelmien avulla.

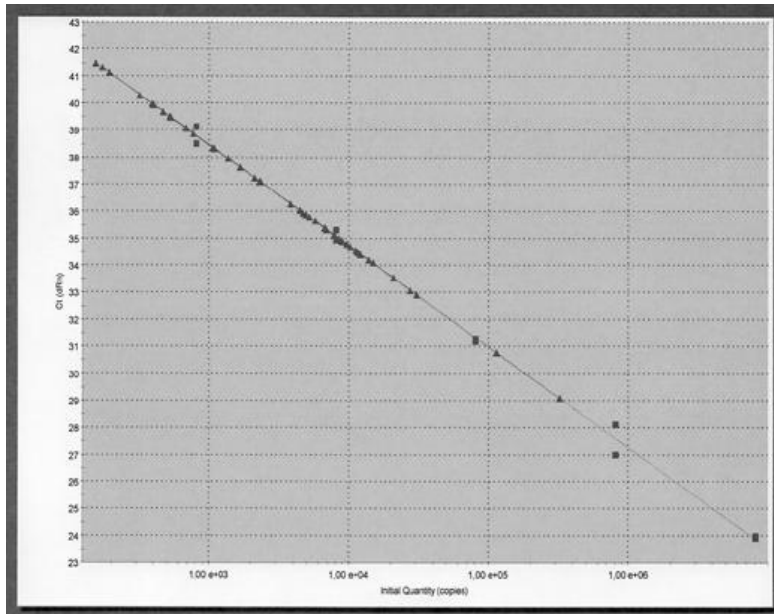
Kynnysyksi eli Threshold cycle (Ct) on se kierrosten määrä, jolloin näytteen lähettämän fluoresenssin taso ylittää asetetun kynnystason (Threshold line). Mitä enemmän monistuvaa tuotetta reaktiossa on, sitä aikaisemmin muodostunut spesifi fluoresenssi havaitaan. Kynnystaso on se taso, jossa näytteen antama fluoresenssi nousee taustafluo-

resenssin yläpuolelle. Kynnystaso on mahdollista määrittää laitteen ohjelman avulla ja se tulisi asettaa pohjaviivan yläpuolelle, monistuskäyrän eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen (kuvio 7.) (Applied Biosystems 2008b.)



KUVIO 7. Kynnystason ja Ct-arvon määrittäminen.

Standardisuora on monistuskierrosten lukumäärän ja standardinäytteen pitoisuuden logaritmin funktiosta saatu lineaarinen regressiosuora (kuvio 8.). Kuvaajan kulmakerroin (slope) ilmaisee monistuksen kinetiikkaa. Laite piirtää suoran standardien pitoisuuksia ja niiden saamia Ct-arvoja käyttäen. Stratagene määrittää standardisuoran avulla myös reaktion tehokkuuden (efficiency). Suositusten mukaan tehokkuuden tulisi olla välillä 90 – 110%, joka vastaa slope-arvoja välillä -3,6 ja -3,1. (Kubista ym. 2006.)



KUVIO 8. Standardisuora.

Normalisoinnin avulla pystytään kompensoimaan esimerkiksi näytteiden fluoresenssitasen vaihteluita, jotka eivät johdu PCR-reaktiosta vaan esimerkiksi pipetointivirheestä. Laitteessa oleva tietokoneohjelma suorittaa normalisoinnin jakamalla reportterin emission intensiteetin passiivisen referenssivärin emission intensiteetillä. Tämän avulla saadaan suhdeluku, jota kuvataan R_n :lla (normalisoitu reportteri). Delta R_n on R_n , josta on vähennetty baseline ($\Delta R_n = R_n - \text{baseline}$). Ei-normalisoitu (ΔR) on baseline:en korjattu fluoresenssi. Tällöin laite asettaa baseline:lle arvon 0 jokaiselle monistuskäyrälle. (Applied Biosystems 2008b.)

7.3 PCR-tulosten käsittely

Tässä luvussa on esitetty miten käsitelimme EBV- ja BKV-näytteiden tuloksia. Fluoresenssimittausten perusteella laitteelta saatiin monistuskäyrä, jossa x-akselilla on syklit ja y-akselilla fluoresenssin suuruus (ΔR tai ΔR_n). Monistuskäyrät tulostettiin niin, että y-akselin asteikko oli logaritminen. Tämä helpotti reaktion lineaarisen vaiheen erottamista ja näin myös kynnystaso oli helpompi asettaa.

EBV-näytteitä määritimme yhteensä 210, joista 128 oli positiivisia ja 82 negatiivisia, joista 10 näytettä jouduimme määrittämään uudestaan. Jouduimme muuttamaan hieman alkuperäisen suunnitelman mukaisia näytemääriä, koska osa näytteistä oli otettu positiiviseksi potilaskontrolliksi tai näytettä oli liian vähän. Valitsimme tähän työhön vain

sellaiset näytteet, joita oli riittävä määrä (vähintään 400 µl) mahdollisen uusintamäärityksen varalta. BKV-näytteitä oli kaiken kaikkiaan 106, joista 40 oli positiivisia ja loput negatiivisia. Positiivisista näytteistä 10 oli laaduntarkkailunäyteitä, loput olivat potilasnäytteitä.

Kaikki näytteet oli aikaisemmin määritetty ABI Prism- laitteella, jonka jälkeen ne oli pakastettu. Liitteissä 1 ja 2 on esitetty saadut tulokset PCR-määrityksistä. Tulokset on ilmoitettu kolmella eri algoritmilla; **1)** adaptiivinen normalisoitu, **2)** non-adaptiivinen normalisoitu ja **3)** adaptiivinen ei-normalisoitu (BKV)/ non-adaptiivinen ei-normalisoitu (EBV). Tästä eteenpäin käsittelemme algoritmeja nimillä adaptiivinen (1), non-adaptiivinen (2) ja ei-normalisoitu (3) asetus. Adaptiivisella asetuksella laite määrittää jokaiselle näytteelle oman baselinen. Non-adaptiivisessa baseline on käyttäjän toimesta asetettu tietylle tasolle. Tässä työssä non-adaptiivinen baseline asetettiin ABI Prism-laitteen oletusarvojen mukaisesti monistussyklialueelle 3–15 .

EBV-tuloksissa käytetyt asetukset non-adaptiivinen ei-normalisoitu sekä non-adaptiivinen normalisoitu eivät olleet BKV:n yhteydessä käyttökelpoisia, sillä kyseisillä asetuksilla ei saatu hyväksyttäviä monistuskäyriä, esimerkit näistä kuvioista on liitteessä 4. Liitteessä 4 liitekuva 1. on esimerkki hyväksyttävästä monistuskäyrästä asetuksella adaptiivinen ei-normalisoitu. BKV tuloksia vertailtaessa adaptiivinen normalisoitu-asetus antoi seitsemän ja adaptiivinen ei-normalisoitu-asetus kymmenen näytteen kohdalla tuloksen, jossa rinnakaiset arvot ylittivät yhden Ct-arvon erotuksen. Non-adaptiivisella asetuksella yli yhden Ct-arvon ylityksiä oli 22:n näytteen kohdalla. Yli yhden Ct-arvon ylittäneistä tuloksista suurin osa antoi ABI Prism-laitteella saatua tulosta suuremman arvon. Kyseisten näytteiden virusgenomien määrät vaihtelivat matalasta korkeaan. Vaikka non-adaptiivisella asetuksella saadut monistuskäyrät eivät olleetkaan hyväksyttäviä, olemme kuitenkin käsitelleet kyseisiä tuloksia normaalisti, koska kvantitaatiot olivat samaa luokkaa kuin ABI Prism-laitteelta saadut tulokset.

Menetelmien yhdenmukaisuuden vertailussa käytimme Pearsonin korrelaatiokerrointa, jolla mitataan lineaarista riippuvuutta muuttujien ollessa suhteesteikollisia. Kun korrelaatiokerroin on lähellä arvoa +1 tai -1, voidaan katsoa muuttujien välillä olevan voimakas korrelaatio. Toistettavuutta tarkastelimme CV %:n eli variaatiokertoimen avulla. Toistettavuudella ilmaistaan samoissa mittaolosuhteissa, samasta näytteestä ja samalla menetelmällä saatujen koetulosten keskihajontaa. Variaatiokerroin määrittää havain-

toarvojen suhteellisen hajonnan prosentteina. Se siis osoittaa, kuinka paljon saadut tulokset keskimäärin vaihtelevat havaintoarvojen keskiarvon ympärillä. Mitä pienempi variaatiokerroin, sitä parempi toistettavuus menetelmällä on. (Tilastokeskus 2007.)

Saatujen tulosten perusteella laskimme molempien virusten määrittämenetelmille herkkyuden eli sensitiivisyyden sekä tarkkuuden eli spesifisyyden. Herkkyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa. Menetelmän herkkyys ilmoitetaan yleensä menetelmän antamien positiivisten tulosten prosenttiosuutena. Tarkkuudella tarkoitetaan mitatun arvon ja oletetun arvon välistä yhteensopivuutta.

7.4 EBV:n tulokset

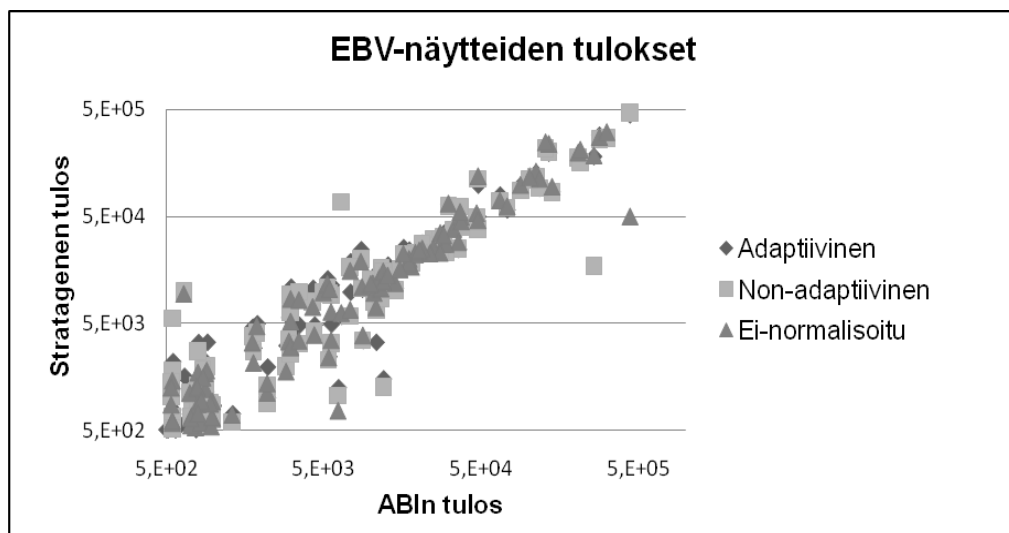
Seuraavissa kappaleissa on esitetty Stratagene- ja ABI Prism-laitteilla saatujen EBV-kvantitaatioiden korrelaatio, toistettavuusnäytteiden tulokset sekä menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys.

7.4.1 EBV tulosten korrelaatio

Taulukossa 4. sekä kuviossa 9. on esitetty Stratagenella määritettyjen EBV genomiekvivalenttien määrän/ml (geq/ml) korrelaatio ABI Prism-laitteella määritettyjen genomiekvivalenttien määrän/ml plasmaa. Taulukosta nähdään, että korrelaatiokerroin vaihtelee välillä 0,81 ja 0,97. Korrelaatiokertoimet ovat lähellä arvoa 1, joten muuttujien välillä voidaan todeta olevan erittäin vahvaa korrelaatiota. Tilastollisesti tulokset ovat erittäin merkitseviä, koska merkitsevyysluku $p=0,000$ on hyvin pieni (alle 0,1 %). Kolmella eri asetuksella otetuista tuloksista normalisoidut tulokset näyttivät korreloivan paremmin ABI Prism-laitteen tuloksiin, kuin ei-normalisoitu. Parhaimman tuloksen näyttäisi antavan adaptiivinen normalisoitu aset.

TAULUKKO 4. Stratagene- ja ABI Prism-laitteilla saatujen EBV-kvantitaatioiden korrelaatio.

	Stratagenen tulos Adaptiivinen normalisoitu
Pearson Correlation	,970(**)
Sig. (2-tailed)	,000
N	129
	Stratagenen tulos Non-adaptiivinen normalisoitu
Pearson Correlation	,914(**)
Sig. (2-tailed)	,000
N	129
	Stratagenen tulos Non-adaptiivinen ei-normalisoitu
Pearson Correlation	,810(**)
Sig. (2-tailed)	,000
N	129



KUVIO 9. Stratagenen antamien EBV-tulosten korrelaatio ABI Prism-laitteen antamiin tuloksiin.

7.4.2 EBV tulosten toistettavuus

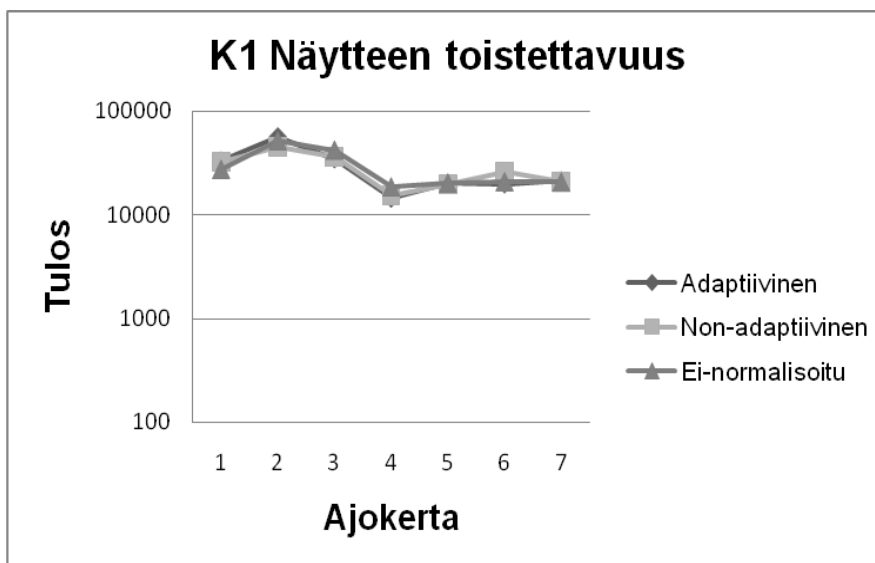
Ensimmäiseen EBV-määrittelyyn valitsimme neljä toistettavuusnäyte-ehdokasta. Kaksi niistä oli matalaa ja kaksi korkeaa. Kyseisten näytteiden kopiomäärät olivat 28700 geq/ml (K1), 25000 geq /ml (K2), 610 geq /ml (M1) ja 540 geq /ml (M2). Laura Mannosen avustuksella valitsimme toistettavuusnäytteiksi näytteet, joiden kopiomäärät olivat 28700 geq /ml (K1) ja 610 geq /ml (M1). Matalatasoinen näyte valittiin mahdollisimman läheltä määritysrajaa 500 geq /ml, mutta ei kuitenkaan liian läheltä, ja korkeampi näyte mahdollisimman läheltä positiivisen potilaskontrollin pitoisuutta. Molemmat toistettavuusnäytteet määritimme jokaisella määrityskerralla, yhteensä seitsemän kertaa.

Liitteessä 1 sivulla kuusi on taulukoitu toistettavuus näytteiden tulokset määrityskohtaisesti.

K1-näytteen variaatiokertoimet vaihtelivat jonkin verran riippuen asetuksesta, jolla tulokset otettiin. Näytteen variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 37 % ja 50 % (taulukko 5.) ja ne olivat odotettua korkeammat. Non-adaptiivinen asetusta antaa parhaimman variaatiokerroin-tuloksen. Taulukossa 5. ja kuviossa 10. on esitetty eri asetuksilla saadut tulokset. Non-adaptiivinen base-line-asetusta antaa parhaimman variaatiokertoimen. Kuten kuviosta 10. huomaa, nousee käyrä huomattavasti toisen määrityskerran kohdalla. Tähän luultavimmin on syynä näytteiden unohtunut sekoittaminen (vortexointi). Toinen määrityskerta antoi kaikista tuloksista huomattavasti alkuperäistä korkeammat tulokset. K1-näytteen variaatiokertoimia muutti selkeästi paremmaksi epäonnistuneen määrityksen poistaminen tulostenkäsittelystä (liitteessä 1 näytteet 11–38). Tällöin variaatiokertoimet K1-näytteellä olivat 34 %, 31% ja 35 %, jotka olivat lähempänä toivomiamme arvoja.

TAULUKKO 5. K1-näytteen toistettavuus (suluissa muuttuneet arvot toisen määrityskerran poistamisen jälkeen).

K1	Adaptiivinen	Non-adaptiivinen	Ei-normalisoitu
Keskiarvo	28574 (23893)	27812 (24966)	28922 (25118)
Keskihajonta	14439 (8132)	10385 (7834)	12899 (8836)
CV%	50 % (34%)	37 % (31%)	44,5 % (35%)

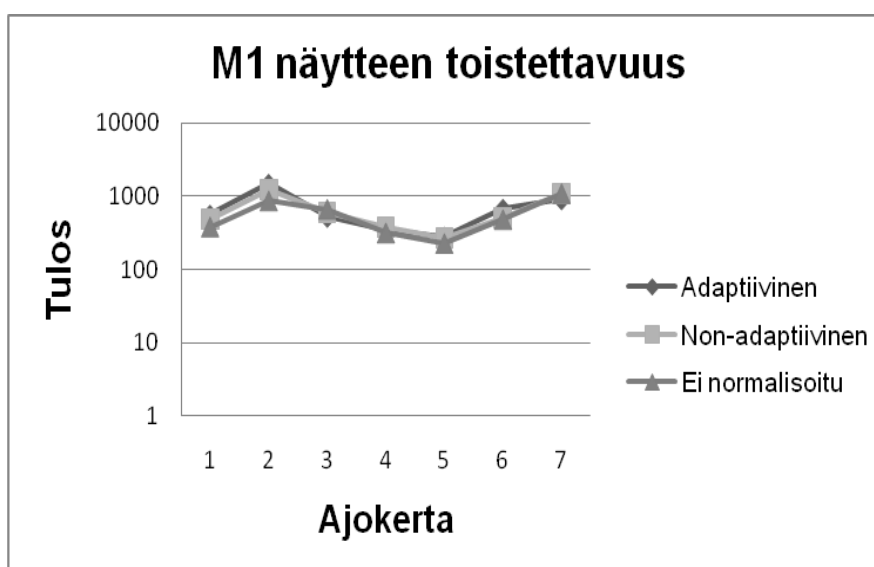


KUVIO 10. Toistettavuusnäyte K1 tulokset määritys- ja algoritmikohtaisesti.

M1-näytteen variaatiokertoimet olivat välillä 53,5 % ja 60 % (taulukko 6). Myös tästä matalan EBV-DNA:n määrän sisältävästä toistonäytteestä saadut kertoimet ovat jonkin verran odotettua korkeammat. Tämän voidaan olettaa johtuvan siitä, että PCR-tulosten pienimmistä kopiomääristä tulee herkemmin variaatiota. Kuviossa 11. on esitetty M1-näytteen toistettavuus tulokset graafisesti eri algoritmeilla. Toisen määrittämissä tuloksista paransi huomattavasti M1-näytteen adaptiivisen asetuksen variaatiokerrointa. M1-näytteen variaatiokertoimet olivat määrittämissä tulosten jälkeen seuraavat: adaptiivinen 41%, non-adaptiivinen 51% ja ei-normalisoitu 59%.

TAULUKKO 6. M1 näytteen toistettavuus (suluissa muuttuneet arvot toisen määrittämissä tulosten jälkeen).

M1	Adaptiivinen	Non-adaptiivinen	Ei-normalisoitu
Keskiarvo	684 (549)	679 (556)	580 (531)
Keskihajonta	411 (226)	390 (284)	315 (315)
CV%	60% (41%)	57,5% (51%)	54,4% (59%)



KUVIO 11. Toistettavuusnäyte M1 tulokset määrittämissä- ja algoritmikohtaisesti.

7.4.3 EBV-määrittämissämenetelmän sensitivisyys ja spesifisyys

Epstein-Barrin viruksen nukleinihappomäärittämissä menetelmän määrittämissärajana on 500 geq/ml. ABI Prism-laitteella <500 geq/ml tuloksen saaneita näytteitä meillä oli yhteensä 82, 128 näytettä oli eritasoisia positiivisia. Taulukossa 7. nähdään, että menetelmän sensitivisyys oli 89,9 % ja spesifisyys 100 % määrittämissäessä EBV-nukleinihappoa

Stratagenella. Näytteistä 13 oli Stratagenella negatiivisia ja ABI Prism-laitteella positiivisia. Nämä 13 näytettä olivat ABI Prism-laitteella alunperin välillä 500-700 geq/ml. Stratagenen antamat tulokset näille näytteille olivat välillä noin 200-480 geq/ml. Näytteet jäivät juuri negatiivisen rajan alapuolelle. Kaikki tulokset jotka ABI Prism-laitteella olivat <500 eli negatiivisia oli myös Stratagenella negatiivisia.

TAULUKKO 7. Menetelmän spesifisyys ja herkkyys Stratagenella (EBV). 2x2 taulukossa kun määritysrajana 500 geq/ml.

Stratagene- laitteen tulos	ABI Prism-laitteen tulos			
		>500	<500	Yht.
>500		115	0	115
<500		13	82	95
Yht.		128	82	210

Sensitiivisyys (%): $115/128 = 89,9 \%$

Spesifisyys (%): $82/82 = 100 \%$

7.5 BKV:n tulokset

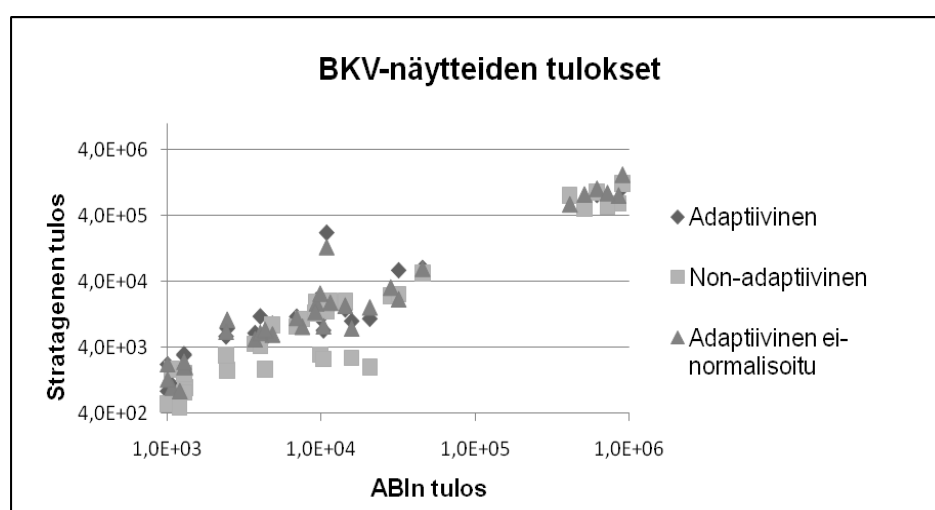
Seuraavissa luvuissa on esitetty Stratagene- ja ABI Prism-laitteilla saatujen BKV-
kvantitaatioiden korrelaatio, toistettavuusnäytteiden tulokset sekä menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys.

7.5.1 BKV tulosten korrelaatio

ABI Prism- ja Stratagene-laitteilta saatujen tulosten välinen riippuvuus oli Pearsonin korrelaatiokerroimen perusteella vahvaa ja korrelaatiokerroin oli välillä 0,964 ja 0,970. Tilastollisesti tulokset ovat erittäin merkitseviä, koska merkitsevyysluku $p=0,000$ on hyvin pieni (alle 0,1 %). Korrelaatiokerrointen perusteella voidaan todeta, että asetusten (adaptiivinen, non-adaptiivinen ja ei-normalisoitu) välillä ei ole merkittävää eroa (taulukko 8.). Kuvioista 12. nähdään, että tulokset asettuvat muutamaa poikkeusta lukuunottamatta melko hyvin samalle linjalle. Non-adaptiivisella asetuksella saaduissa tuloksissa vaikuttaisi kuvion perusteella olevan hajontaa hieman enemmän kuin muissa asetuksissa.

TAULUKKO 8. Stratagene- ja ABI Prism-laitteilla saatujen BKV-kvantitaatioiden korrelaatio.

Stratagenen tulos Adaptiivinen normalisoitu	
Pearson Correlation	,968(**)
Sig. (2-tailed)	,000
N	40
Stratagenen tulos Non-adaptiivinen normalisoitu	
Pearson Correlation	,964(**)
Sig. (2-tailed)	,000
N	40
Stratagenen tulos Ei-normalisoitu	
Pearson Correlation	,970(**)
Sig. (2-tailed)	,000
N	40



KUVIO 12. Stratagenen antamien BKV-tulosten korrelaatio ABI Prism-laitteen antamiin tuloksiin.

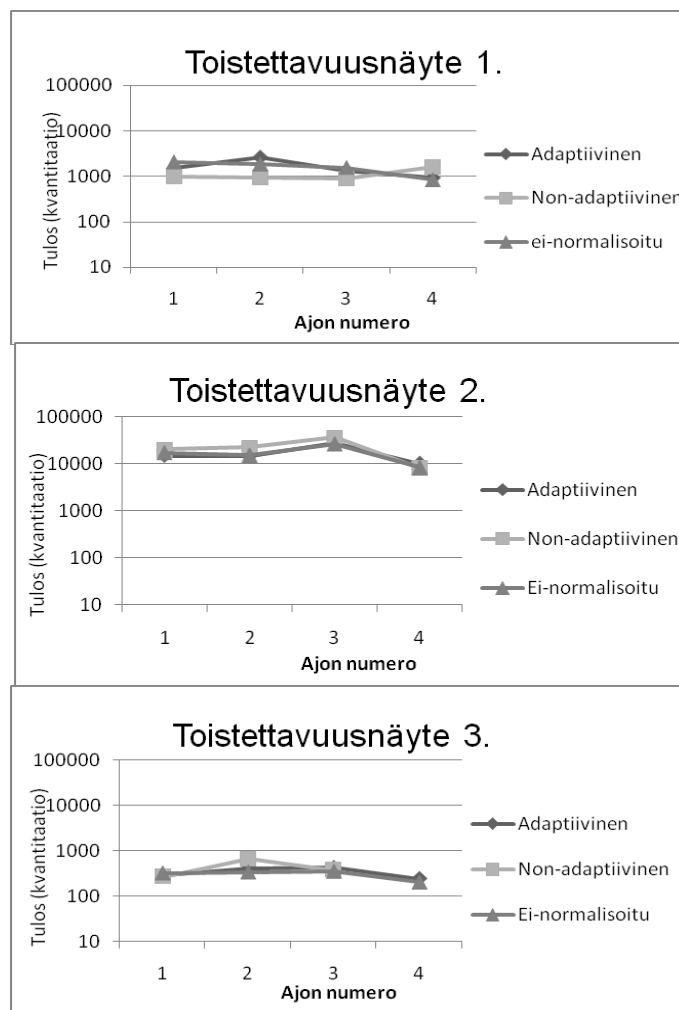
7.5.2 BKV tulosten toistettavuus

Liitteessä 2 on esitetty BKV-määrityksissä mukana olleiden toistettavuusnäytteiden tulokset numeerisena arvoina. Toistettavuusnäytteet valittiin ensimmäisen määrityskerran perusteella, niin että saatiin kolme eri tasoista näytettä. Valittujen näytteiden kopia-määrät olivat 1300 kopiota/ml (näyte 1.), 14260 kopiota/ml (näyte 2.), 440 kopiota/ml (näyte 3.). Taulukosta 9. nähdään, että BKV:n toistettavuusnäytteiden variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 22,8 % ja 53,5 %. Näytteestä 3. saatiin hieman pienemmät variaatiokertoimet kuin muissa näytteissä. Ei-normalisoidulla asetuksella saatiin näytteistä 1. ja 3. pienempi variaatiokerroin kuin muilla vaihtoehdoilla. Ei-normalisoitu asetus vaikuttaisi siis antavan parhaimman variaatiokertoimen. Tosin näytteiden 2. ja 3. kohdalla adaptiivisella asetuksella variaatiokertoimet olivat samalla tasolla kuin ei-

normalisoidulla. Taulukosta 9 nähdään, että non-adaptiivinen asetus antaa kaikissa näytteissä muita korkeamman variaatiokertoimen. Tämä tukee aiemmin monistuskäyrien tulkinnassa todettua non-adaptiivisen asetuksen soveltumattomuutta määrittelyyn. Kuviossa 13. on esitetty eri BKV toistettavuusnäytteet graafisina kuvioina.

TAULUKKO 9. BKV:n toistettavuusnäytteiden CV % -tulokset.

	Näyte 1.			Näyte 2.			Näyte 3.		
	Adaptiivinen	Non-adaptiivinen	Ei-normalisointu	Adaptiivinen	Non-adaptiivinen	Ei-normalisointu	Adaptiivinen	Non-adaptiivinen	Ei-normalisointu
Keskiarvo	1600	747	1595	16878	21713	17032	344	440	307
Keskiahajonta	732	393	548	7509	11652	7620	92	206	70
CV%	45,8	52,6	34,4	44,5	53,5	44,7	26,7	46,8	22,8



KUVIO 13. Toistettavuusnäytteiden 1, 2 ja 3 tulokset määritys- ja algoritmikohtaisesti.

7.5.3 BKV-määrittämenetelmän sensitivisyys ja spesifisyys

BK-viruksen nukleiinihappomäärityksessä menetelmän määrittärajana on 400 kopiota/ml. Taulukossa 10. nähdään, että menetelmän sensitivisyys oli 92,3 % ja spesifisyys 98,5 % määrittäessä BK-viruksen nukleiinihappoa Stratagenella. Näytteistä kolme oli Stratagenella <400 ja ABI Prism-laitteella >400. Yksi näyte oli ABI Prism-laitteella <400 ja Stratagenella >400. Nämä tulokset ovat kuitenkin kaikki lähellä arvoa 400 kopiota/ml ja tällä tasolla olevissa tuloksissa esiintyy enemmän vaihtelua kuin suuremman virusmäärän omaavissa näytteissä.

TAULUKKO 10. Menetelmän spesifisyys ja herkkyys Stratagenella (BKV) 2x2 taulukossa kun kriteerinä käytetty määrittärajaa 400 kopiota/ml.

	ABI Prism-laitteen tulos			
		>400	<400	Yht.
Stratagene-laitteen tulos	>400	36	1	37
	<400	3	66	69
	Yht.	39	67	106

Sensitiivisyys (%): $36/39 = 92,3 \%$

Spesifisyys (%): $66/67 = 98,5 \%$

8 TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Tutkimusta tehdessä käytimme jokaisella määrittäskerralla tarvittavia kontrolleja sekä standardeja. Työn vaiheet suoritettiin työohjeiden mukaisesti. Standardit olivat jokaisella määrittäskerralla hyväksyttävissä rajoissa. Osassa määrittäyksistä jouduimme poistamaan yhden standardin, koska saatu tulos poikkesi tavoitearvostaan huomattavasti. Jäljelle jäi kuitenkin vielä neljä standardia, joka on hyväksyttävä määrä standardisuoran muodostamiseen. Näin ollen slope eli standardiarvojen välinen kulmakerroin muuttui lähemmäksi tavoite slope-arvoa eli -3.33.

Reagenssipakkaukset säilytettiin ohjeiden mukaisesti viileässä tai huoneenlämmössä reagenssista riippuen. Kaikkien reagenssien päiväykset olivat asianmukaisesti voimassa. Pyrimme työskentelemään huolellisesti ja noudattamaan PCR-puhtaita työskentelytapoja. Näin pyrimme estämään näytteiden kontaminoitumisen ja väärin tulosten syntymiset.

Näytteiden määrä oli riittävä siihen, että tuloksia ja niiden pohjalta tehtyä analysointia voidaan pitää merkitsevänä. Korrelaatiot olivat molempien virusten kohdalla hyvät, joten tuloksia voidaan pitää yhtenevinä. Koska PCR on hyvin herkkä menetelmä, on erittäin harvinaista, että samasta näytteestä tulee kaksi kertaa täsmälleen sama tulos.

Variaatiokertoimet olisivat voineet olla paremmat molempien virusten määrityksissä. Huomioitava on kuitenkin se, että mitä pienempi virusten kopiomäärä on sitä enemmän tulokset saattavat poiketa toisistaan ja näin ollen myös variaatiokerroin kasvaa.

Yhdessä EBV-määritys-sarjassa oli teknisiä ongelmia, sillä saaduista tuloksista osa poikkesi odotetusta tuloksesta huomattavasti ja rinnakkaiset näytteet poikkesivat yli yhdellä Ct-kierroksella. Pohdittuamme mikä meni vikaan, muistimme että emme olleet vortexoineet näytteitä ennen kuoppalevyille pipetointia. Tämä oli ainoa syy minkä keksimme, joka olisi voinut aiheuttaa tulosten suuret poikkeavuudet. Kävimme jälkepäin vielä läpi työn vaiheet ja sekoittaminen oli ainoa asia, jonka totesimme unohtuneen Tästä syystä jatkossa painotimme työn suorituksessa näytteiden vortexointia. Näytteet, joissa tulos poikkesi merkittävästi ABI Prism-laitteella saaduista tuloksista, uusimme viimeisessä määrityksessä. Uusinnassa kaikista näytteistä saatiin hyväksyttävät tulokset. Uusitut näytteet ovat liitteessä 1 olevaan taulukkoon merkitty näytteenumeron perässä olevalla u-kirjaimella.

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työmme tarkoituksena oli verifioida HUSLABin virologian osastolle plasman Epstein-Barrin viruksen ja BK-viruksen kvantitatiiviselle reaaliaikaiselle PCR-määritykselle uusi varalaite. Aiempien kokeilujen perusteella oli odotettavissa, että Stratagene Mx3005P-laite soveltuisi sekä EBV:n että BKV:n määrityksiin.

Saaduissa tuloksissa oli jonkin verran vaihtelua siihen, mitä tuloksia kyseisistä näytteistä oli saatu ABI Prism-laitteella. Mikäli aikaa näytteiden analysointiin olisi ollut enemmän, olisimme voineet määrittää eniten poikkeavat tulokset uudestaan ABI Prism-laitteella. Ideaalilanteessa olisimme voineet määrittää kaikki näytteet rinnan kummallakin laitteella, jolloin olisimme voineet tehdä enemmän johtopäätöksiä tuloksien eroavaisuuteen johtavista syistä. Aiempien tutkimusten perusteella on todettu, että näyttei-

den pakastaminen ei pitäisi vaikuttaa tuloksiin. Tämä olisi voinut olla tekijä, joka olisi ollut mielenkiintoista testata vielä uudelleen. Meillä ei kuitenkaan ollut mahdollista määrittää näytteitä uudestaan ABI Prism-laitteella oman ajanpuutteen vuoksi sekä sen takia, että laite oli varattu päivittäin uusien potilasnäytteiden määrittystä varten.

EBV-määrittäykseen mielestämme soveltuvin on non-adaptiivinen normalisoitu-asetus threshold-arvolla 0,2. Tämä on sama kuin ABI Prism-laitteella oleva threshold-arvo. Myös variaatiokerroin tukee tätä valintaa. Korrelaation perusteella adaptiivinen asetus antaisi parhaimman tuloksen 0,970, tosin non-adaptiivisella asetuksella saatu korrelaatiokerroin 0,914 osoittaa myös vahvaa korrelaatiota muuttujien välillä. Näiden asetusten korrelaatiokertoimet ovat niin lähellä toisiaan, ettei niiden välillä voida todeta merkittävää varsinaista eroa.

BKV-määrittäykseen soveltuva asetus on adaptiivinen ei-normalisoitu. Tällä asetuksella saatu amplifikaatiokäyrä on hyväksyttävä. Lisäksi kvantitaatioiden korrelaatio sekä variaatiokerroin puoltavat valintaa. Vaihtoehtoisena asetuksena pidämme myös adaptiivista normalisoitua, sillä amplifikaatiokäyrä oli tässä lähes yhtä selkeästi tulkittava kuin vastaavalla ei-normalisoidulla. Lisäksi verrattaessa tuloksia asetusten ja laitteiden välillä, totesimme ettei niissä ole kovinkaan suurta eroa.

EBV- ja BKV-määrittäysmenetelmien herkkyys ja tarkkuus olivat hyvät. Herkkyys matalamman kopiomäärän omaavilla näytteillä oli alhaisempi, koska matalamman viruspitoisuuden omaavien näytteiden kvantitaatioissa on enemmän variaatiota. Tämä vaikuttaa kokonaiserhkkyden tuloksiin alentavasti.

Saatujen tulosten perusteella voimme pitää Stratagenen laitetta soveltuvana EBV- ja BKV-määrittäykseen, joskin EBV-DNA:n kvantitaatioiden variaatio Stratagene-laitteella voisi olla hyvä vielä tarkistaa rinnan ABI Prism-laitteen kanssa. Sopivan varalaitteen käyttöönotto on myös laboratoriolle tärkeä asia, jotta varmistutaan siitä että potilasnäytteitä saadaan analysoidua. Tulosten saaminen ilman laiteviasta johtuvia viivytyksiä on tärkeää myös potilaiden optimaalisen hoidon kannalta, sillä EBV- ja BKV-määrittäykset ovat tärkeitä laboratoriotutkimuksia etenkin elinsiirron saaneilla potilailla.

Opinnäytetyöprosessin aikana olemme saaneet syvennettyä tietoa virologian teoria- ja menetelmien osalta. Lisäksi olemme saaneet paljon käytännön kokemusta PCR-työskentelystä sekä pystyneet itsenäiseen työskentelyyn ja tulosten luotettavuuden

arviointiin. Työtä tehdessämme huomasimme, että reaaliaikainen PCR on herkkä menetelmä, jossa työohjeen tarkka noudattaminen ja pipetointi tarkkuus ovat tärkeitä asioita tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi. Lisäksi näytteen käsittely ja säilytys on suoritettava oikein luotettavien tulosten saamiseksi.

LÄHTEET

- Aalto, Sanna M. – Juvonen, Eeva – Tarkkanen, Jussi – Volin, Liisa – Ruutu, Tapani – Mattila, Petri S. – Piiparinen, Heli – Knuutila, Sakari – Hedman, Klaus 2002: Lymphoproliferative disease after allogenic stem cell transplantation – preemptive diagnosis by quantification of Epstein-Barr virus DNA in serum. *Journal of Clinical Virology* 28. 275–283.
- Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas 2002: *BIOprosessiteknikka*. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- Applied Biosystems 2008a. 7900HT Fast Real-Time PCR system. <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_039802.pdf>. Luettu 16.2.2009.
- Applied Biosystems 2008b. Real-Time PCR: Understanding Ct. <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf>. Luettu 15.3.2009.
- Auvinen, Eeva – Vaehri, Antti 2007: Polyoomavirus. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaehri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*, kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 598.
- Fiebelkorn, Kristin R. – Lee, Brenda G. – Caliendo, Angela M. – Nolte, Frederick S. 2002. Clinical Evaluation of an Automated Nucleic Acid Isolation System. *Clinical Chemistry* 48 (9). 1613.
- Forber, Betty A. – Sahm, Daniel F. – Weissfeld, Alice S. 1998: *Baileys & Scott's Diagnostic microbiology*. 10. painos. Mosby, St. Louis, Missouri. 970–974.
- Frisque, Richard J. 1999: JC and BK viruses (papovaviridae). Teoksessa Granoff, Allan – Webster, Robert G. (toim.) *Encyclopedia of virology*. Kirja II. 2. painos. Academic Press. 876–880.
- Gene Link™. Fluorescent Molecular Probes. Verkkodokumentti. <<http://genelink.com/Literature/ps/PG-MB-Ver3.2.pdf>>. Luettu 16.2.2009.
- Heikkilä, Ritva – Hellstén, Soile – Koukila-Kähkölä, Pirkko – Kurkinen, Tuula – Meurman, Olli – Nummelin, Raija – Pastila, Satu – Richardson, Malcolm – Ylönen, Helga 2005: *Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Suomen Kuntaliitto. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Herman, Jean - Van Ranst, Marc - Snoeck, Robert - Beuselinck, Kurt - Lerut, Evelyne - Van Damme-Lombaerts, Rita 2004: Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: Evaluation using a quantitative real-time PCR technique. *Pediatric Transplantation* 5 (8). 485–492.
- Hukkanen, Veijo – Leinikki, Pauli – Linnavuori, Kimmo – Suni, Jukka 1998: Herpesvirusten ryhmä. Teoksessa Tiilikainen, Anja S. – Vaara, Martti – Vaehri, Antti (toim.): *Lääketieteellinen mikrobiologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 709–730.

- Hukkanen, Veijo 2007: Epstein-Barrin virus. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 479–485.
- HUSLAB 2007: BK-virus, kvantitatiivinen DNA-osoitus (P-BKVNh). Työohje. Versio 1.10. Helsinki: Kliininen mikrobiologia. Virologian osasto.
- HUSLAB 2008a: Tutkimusohjekirja. Epstein-Barr-virus, nukleiinihappo. Verkkodokumentti. Päivitetty 27.8.2008 <<http://huslab.fi/ohjekirja/4775.html>>. Luettu 13.11.2008.
- HUSLAB 2008b: Epstein-Barr-virus, kvantitatiivinen DNA-osoitus (P-EBVNh) Työohje. Versio 1.34. Helsinki: Kliininen mikrobiologia. Virologian osasto.
- Ikäheimo, Irma 2002: Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifiointista. Moodi 1. 13–14.
- Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 1997: Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Oy Edita Ab.
- Jartti, Tuomas – Hedman, Klaus – Söderlund-Venermo, Maria – Hyypiä, Timo – Ruuskanen, Olli 2008: Uudet hengitystievirukset. Artikkel. Duodecim 2008; 124:2313–9.
- Kubista, Mikael – Nadrade, José Manuel – Bengtsson, Martin – Forootan, Amin – Jonák, Jiri – Lind, Kristina – Sindelka, Radek – Sjöback, Robert – Sjögreen, Björn – Strömbom, Linda – Ståhlberg, Anders – Zoric, Neven 2006: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27. 95–125.
- Kuopion Yliopisto 2005. Soveltavan biotekniikan yksikkö. Verkkodokumentti. <<http://www.uku.fi/sbi/MOGEII2005/PCR-kalvot.pdf>>. Luettu 30.11.2008.
- Lappalainen, Maija – Söderlund, Maria – Piiparinen, Heli – Puolakkainen, Mirja – Mannonen, Laura – Suni, Jukka – von Bonsdorff, Carl-Henrik – Koskiniemi, Marjaleena – Hyypiä, Timo – Vaheri, Antti – Hedman, Klaus 1999: Geenimonistusmenetelmät virusdiagnoosissa. *Duodecim* 115. 1031–1036.
- Lenette, Evelyne T. 1995: Epstein-Barr Virus. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. (toim.): *Manual of Clinical Microbiology*. 6 Painos. Washington DC: ASM Press.
- Liimatainen, Oili 2002: Menetelmien validointi ja verifiointi kliinisen mikrobiologian laboratorioissa: yleisiä periaatteita. Moodi 1. 12–13.
- Limaye, Ajit P. - Jerome, Keith R. – Kuhr, Christian S. – Ferrenberg, James – Huang, Meei-Li – Davis, Connie L. – Corey, Lawrence – Marsh, Christopher L. 2001: Quantitation of BK Virus Load in Serum for the Diagnosis of BK Virus-Associated Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases* 183 (1 June). 1669–1672
- Loginov, Raisa 2007: CMV-, EBV-, and HHV-6-DNAemia after liver transplantation. Pro-gradututkielma. Helsinki: Helsingin yliopisto. Lääketieteellinen tiedekunta.

- Major, Eugene O. 1995: Polyoomaviruses. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Pfaller, Michael A. – Tenover, Fred C. – Tenover, Fred C. – Yolken, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. 6 Painos. Washington DC: ASM Press.
- Marttinen, Paula 2007: Epstein-Barrin viruksen nukleiinihappomääritys plasmasta kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Qiagen artus® EBV-testin verifiointi HUSLABin virologian osastolle. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Bioanalytiikan koulutusohjelma.
- Menetelmäohje 2007: Epstein-Barrin virus, nukleiinihappo (kvantitatiivinen). Versio 1.13/15.10.2007. Laatijat: Aalto, S – Mannonen, Laura. Tarkastaja: Buller, S. Hyväksyjä: Lappalainen, M.
- Munksgaard, Blackwell 2004: BK virus. American Journal of Transplantation 10 (4). 89–91 .
- Pang, Xiaoli L. – Doucette, Karen – LeBlanc, Barbara – Cockfield, Sandra M. – Preiksaitis, Jutta K.: Monitoring of Polyomavirus BK Virus Viruria and Viremia in Renal Allograft Recipients by Use of a Quantitative Real-Time PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology 45 (11). 3568–3573.
- Pasternack, Rafael 2002: Nukleiinihappomenetelmien käyttö klinisen mikrobiologian rutiinilaboratoriossa. Moodi 1. 17–18.
- Porkka, Kimmo – Elonen, Erkki 2007: Harvinaiset lymfoproliferatiiviset taudit. Teoksessa Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo – Rajamäki, Allan – Ruutu, Tapani (toim.): Veritaudit. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 450–453.
- Roche Applied Science 2007: MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit. Version July 2007. Käyttömanuaali.
- Stratagene. Quantitative PCR Systems. Verkkodokumentti. <http://www.stratagene.com/lit_items/QPCR%20Systems%20Brochure%20BR65_1107.pdf>. Luettu 16.2.2009.
- Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2003: Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3.1. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Solunetti 2006: Verkkodokumentti. Päivitetty 2006. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hybridisaatio/>>. Luettu 19.2.2009
- Tilastokeskus 2007: Tieto tiivistyy tunnuslukuihin. Verkkodokumentti. Päivitetty 2007. <http://www.stat.fi/tup/verkkokoulu/data/tt/02/11/index.html> . Luettu 22.2.2009.
- Weiskittel, Patricia D. 2002: Polyoma Virus Renal Transplantant Recipients. Nephrology Nursing Journal 29 (3). 247–250.
- Vuorinen, Tytti 2005: PCR- tutkimukset virusinfektioiden diagnostiikassa. Moodi 1. 33-34.

TULOKSET EPSTEIN-BARRIN VIRUKSEN NÄYTTEIDEN MÄÄRITYKSISTÄ

Näyte	Abin tulos	1) Adaptiivinen		2) Non-adaptiivinen		3) Ei-normalisoitu	
	Kvantitaatio ka.	Ct ka.	Kvantitaatio ka.	Ct ka.	Kvantitaatio ka.	Ct ka.	Kvantitaatio ka.
K1	28700	30.33	33180	31.48	32235	31.09	27575
K2	25000	30.47	30040	31.50	30670	31.21	25580
M1	610	36.56	564	37.93	489	37.35	387
M2	540	35.47	1150	36.76	1044	36.16	873
1	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
2	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
3	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
4	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
5	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
6	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
7	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
8	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
9	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
10	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
11	1800	33.52	2917	35.98	2725	34.54	2136
12	890	33.98	2159	34.46	1946	34.90	1708
13	650	35.08	1590	37.97	9911	36.14	9429
14	8650	30.10	24210	32.77	19880	31.21	18880
15	3020	32.72	5622	35.83	3488	34.02	3385
16	11700	30.83	15360	33.23	16260	31.81	13150
17	4280	31.44	10540	34.22	7942	32.69	7128
18	6200	34.88	1245	37.47	1055	36.12	765
19	1770	32.90	4576	35.71	3756	33.88	3308
20	910	33.28	3311	36.45	1996	34.79	1817
21	2900	33.40	3080	36.41	1995	34.80	1779
22 u	3100	31.52	10810	34.36	9177	32.59	8454
23 u	3100	31.89	8097	34.59	6260	33.17	5210
24 u	5600	31.53	11310	34.43	9169	33.06	6409
25 u	7400	30.77	18690	33.32	16850	31.68	15470
26 u	3500	31.65	9735	34.11	9792	32.62	8242
27 u	800	33.44	3286	36.12	2747	34.97	1735
28 u	550	34.00	2183	36.59	1808	35.12	1461
29	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
30	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
31	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
32	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
33	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
34	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
35	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
36	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500

LIITE 1
2(6)

37	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
38	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
39	990	37.37	836	37.30	731	36.75	654
40	4380	34.55	4802	34.55	4180	34.04	3893
41	10300	32.90	13490	32.80	12790	32.38	11820
42	207700	28.68	189700	28.71	175700	28.15	196700
43	27600	31.52	32010	31.42	30870	30.75	34900
44	33400	31.22	38810	31.13	37510	30.62	38150
45	5000	33.36	10140	33.21	9866	32.66	9755
46	89200	29.76	96450	29.81	87060	29.21	97990
47	112000	29.33	126300	21.33	118000	28.77	130700
48	530	38.25	490	38.48	359	37.72	362
49	283000	28.04	283400	28.07	263800	27.69	274100
50	5300	32.98	12940	33.08	10800	32.41	11680
51	19200	32.01	23540	31.92	22460	31.39	22770
52	11300	32.90	13550	32.83	12630	32.22	13120
53	37600	31.09	41910	31.05	39260	30.23	49320
54	135000	28.65	193300	28.52	200000	27.87	237100
55	48000	29.75	96970	29.41	111700	28.92	118500
56	1890	34.59	4926	34.74	4100	33.86	4695
57	128800	28.48	214900	28.39	216200	27.82	245000
58	5470	33.48	9414	33.27	9435	32.56	10430
59	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
60	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
61	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
62	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
63	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
64	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
65	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
66	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
67	261000	28.94	179300	27.84	17210	27.69	185200
68	5400	35.41	2428	34.39	2271	34.19	2406
69	2200	36.75	1001	35.83	890	35.41	1125
70	8900	34.88	3442	33.77	3449	33.48	3865
71	36000	31.94	24390	30.77	24740	30.48	28710
72	990	37.12	854	36.05	864	35.78	934
73	500	38.95	239	37.97	225	37.67	241
74	141600	30.08	83970	28.92	83880	28.69	94400
75	10800	33.90	3307	32.78	6597	32.57	7058
76	600	38.57	297	37.45	301	36.92	389
77	14300	33.20	10520	32.12	10130	31.79	11920
78	760	38.46	344	37.42	347	36.99	406
79	30000	31.93	24450	30.87	23110	30.53	27670
80	670	39.18	222	38.05	231	37.56	289

LIITE 1
3(6)

81	770	38.35	349	37.27	358	36.53	533
82	214100	29.09	162100	27.95	160900	27.50	209500
83	315000	28.36	262500	27.14	271400	26.93	305200
84	117700	29.96	90950	28.79	91420	28.45	111700
85	10500	33.69	7646	32.52	7885	32.11	9643
86	770	37.97	507	36.79	530	36.47	596
87	11600	33.51	8577	32.37	8591	31.96	10600
88	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
89	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
90	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
91	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
92	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
93	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
94	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
95	720	37.68	683	36.37	669	36.61	560
96	66100	30.55	78370	29.41	69920	29.49	70140
97	570	38.14	503	36.99	442	36.94	445
98	730	37.44	804	36.22	750	36.31	685
99	12060	33.28	12750	31.98	1263	32.06	12230
100	31100	30.85	63900	29.58	62500	29.59	65710
101	443000	27.95	440400	26.57	467800	26.61	49770
102	780	37.80	675	36.66	566	36.47	657
103	47000	31.28	48210	29.94	49310	29.90	53380
104	37550	31.51	41370	30.20	41470	30.15	44810
105	73400	31.02	57080	29.64	60160	29.68	61890
106	830	37.86	607	36.64	557	36.52	592
107	730	38.34	467	37.06	464	37.21	397
108	890	36.90	1147	35.44	1255	35.47	1218
109	970	38.07	582	37.02	466	36.74	546
110	780	36.61	1460	35.56	1152	35.46	1275
111	780	38.43	432	37.01	443	37.30	357
112	504	39.28	269	38.26	197	38.06	226
113	102000	29.93	117700	28.74	109800	28.75	116000
114	6500	34.47	5790	32.89	68270	33.05	6256
115	8800	33.61	10360	32.33	10540	32.33	10920
116	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
117	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
118	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
119	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
120	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
121	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
122	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
123	18100	32.70	19050	31.39	18220	31.62	16890
124	980	37.48	834	36.49	627	36.44	670

LIITE 1
4(6)

125	880	38.02	586	36.95	462	37.01	457
126	560	40.10	158	39.02	131	38.92	138
127	530	38.79	393	37.44	381	37.58	348
128	800	37.10	1065	35.96	892	36.03	882
129	550	37.73	706	36.40	677	36.58	613
130	760	36.98	1161	35.65	1113	35.68	1144
131	500	38.53	506	37.25	494	37.32	472
132	960	38.36	476	37.15	416	37.03	470
133	710	36.83	1289	35.63	1114	35.70	1119
134	29000	31.80	34410	30.61	30460	30.61	33260
135	540	38.41	460	37.13	417	37.20	408
136	960	37.36	916	35.95	906	36.01	888
137	550	38.01	627	36.79	564	36.73	587
138	1317	37.72	709	36.56	596	36.36	703
139	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
140	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
141	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
142	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
143	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
144	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
145	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
146	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
147	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
148	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
149	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
150	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
151	860	35.92	1740	34.93	1849	35.18	1561
152	27500	31.91	26920	31.22	24270	31.30	22780
153	10000	33.03	12650	32.13	12860	32.26	11700
154	540	36.15	1508	35.34	1425	35.52	1256
155	17500	32.30	20520	31.35	22060	31.50	20010
156	36900	30.76	58920	29.87	61580	30.03	54910
157	23700	31.98	25500	31,08	26590	31.32	22530
158	790	36.27	1366	35.41	1317	35.48	1256
159	510	37.82	505	37.13	424	37.25	383
160	19200	32.17	22430	31.37	21970	31.37	22100
161	21200	31.85	27890	31.02	27680	31.17	24930
162	12000	32.76	1507	31.91	15110	31.88	15330
163	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
164	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
165	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
166	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
167	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
168	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500

LIITE 1
5(6)

169	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
170	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
171	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
172	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
173	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
174	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
175	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
176	<500	39.43	<500	37.83	<500	38.27	<500
177	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
178	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
179	720	34.05	1057	36.37	669	36.25	655
180	17500	29.07	24010	31.28	18920	31.25	18220
181	12800	29.59	17360	31.76	13700	31.65	13970
182	16100	28.99	25340	31.05	22070	30.95	22360
183	15300	29.57	17550	31.54	15900	31.45	16010
184	20300	29.08	24160	30.99	22940	30.84	23980
185	840	33.99	1160	36.00	900	35.81	949
186	3100	31.88	4081	34.19	2752	33.94	2985
187	3100	31.90	4033	34.27	2604	33.93	3013
188	<500	41.22	121	42.39	68	42.10	87
189	5600	31.65	4875	33.97	3252	33.73	3484
190	7400	30.55	9709	33.06	5861	32.74	6702
191	800	34.42	884	36.83	589	36.40	724
192	550	34.51	775	36.71	517	36.30	615
193	2200	33.05	1944	35.33	1293	35.09	1380
194	48000	27.94	49240	30.22	38140	29.89	45760
195	3500	31.64	4768	33.97	3224	33.74	3440
196	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
197	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
198	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
199	<500	41.81	57	43.05	28	43.00	26
200	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
201	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
202	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
203	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
204	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
205	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500
206	<500	No ct	<500	No ct	<500	No ct	<500

u= Uusittu näyte

EBV:n toistettavuusnäytteiden tulokset

	ABI:n tulos	1) Adaptiivinen	2) Non-adaptiivinen	3) Ei-normalisoitu
1. määrittäminen		Kvantitaatio ka.	Kvantitaatio ka.	Kvantitaatio ka.
K1	28700	33180	32235	27575
M1	610	564	1044	873
2. määrittäminen				
K1	28700	56660	44890	51750
M1	610	1489	1229	871
3. määrittäminen				
K1	28700	34660	35780	42060
M1	610	903	1085	1097
4. määrittäminen				
K1	28700	14420	15300	18760
M1	610	521	602	669
5. määrittäminen				
K1	28700	19960	19830	20470
M1	610	347	379	320
6. määrittäminen				
K1	28700	19810	25760	21020
M1	610	283	267	230
7. määrittäminen				
K1	28700	21330	20890	20820
M1	610	678	511	485

TULOKSET BK-VIRUKSEN NÄYTTEIDEN MÄÄRITYKSIKSIÄ

Näyte	Abin tulos Kvantitaatio ka.	1) Adaptiivinen		2) Non-adaptiivinen		3) Ei-normalisoitu	
		Ct ka.	Kvantitaatio ka.	Ct ka.	Kvantitaatio ka.	Ct ka.	Kvantitaatio ka.
1	14260	34.00	15050	34.88	20000	32.51	17470
2	28150	32.64	27780	34.59	23940	31.49	32930
3	900	37.38	2167	40.17	1208	36.04	2226
4	1300	37.91	1508	40.30	980	36.09	2092
5	440	41.13	296	43.25	270	39.74	326
6	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
7	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
8	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
9	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
10	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
11	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
12	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
13	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
14	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
15	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
16	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
17	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
18	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
19	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
20	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
21	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
22	<400	43.48	59	No ct	No ct	42.21	55
23	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
24	<400	32.24	1834000	No ct	No ct	No ct	No ct
25	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
26	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
27	<400	No ct	No ct	44.10	115	No ct	No ct
28	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
29	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
30	420	40.12	326	42.51	422	39.24	198
31	7500	34.24	10120	36.42	10700	33.48	8384
32	790	38.14	1019	39.50	1803	36.99	837
33	1070	38.04	1072	39.44	1862	36.73	1001
34	11400	33.49	16120	35.22	20030	32.38	19250
35	4800	34.42	9126	39.73	8744	33.87	6378
36	9280	33.02	20960	35.81	19100	32.23	18900
37	<400	No ct	No ct	44,88	89	No ct	No ct
38	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
39	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
40	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct

41	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
42	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
43	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
44	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
45	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
46	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
47	<400	No ct	No ct	43.74	324	No ct	No ct
48	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
49	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
50	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
51	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
52	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
53	<400	No ct	No ct	43.39	482	No ct	No ct
54	3207000	24.75	7638000	25.54	8119000	23.44	9852000
55	410000	28.57	689900	29.12	798800	27.63	601600
56	6900	34.96	11670	36.14	8238	33.54	11400
57	45300	32.28	63760	33.47	53150	30.96	63630
58	3700	35.85	6578	37.21	4509	34.65	5385
59	510000	28.63	648000	29.81	515200	27.11	847700
60	850000	28.56	682300	29.51	609900	27.15	820800
61	903000	27.87	1049000	28.43	1229000	26.10	1695000
62	615000	28.28	813500	28.91	908200	26.79	1039000
63	720000	28.56	677400	29.68	545700	27.04	891800
64	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
65	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
66	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
67	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
68	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
69	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
70	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
71	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
72	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
73	<400	No ct	No ct	44.23	70	No ct	No ct
74	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
75	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
76	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
77	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
78	<400	No ct	No ct	43,48	188	No ct	No ct
79	<400	No ct	No ct	35,47	85000	No ct	No ct
80	1280	36.70	3035	38.94	1609	35.83	2055
81	1280	36.80	3153	40.38	828	35.87	2464
82	1000	37.17	2208	40.66	559	35.69	2264
83	4000	34.50	11800	37.24	4281	33.97	6737
84	1200	38.61	919	40.81	494	37.14	880

85	15700	34.76	9998	38.27	2782	33.75	7889
86	2440	35.30	7731	38.83	1803	33.25	10690
87	4300	35.71	5425	38.48	1853	33.91	7441
88	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
89	<400	41.30	173	44.63	43	39.76	173
90	31700	33.00	28900	34.47	25550	32.14	21820
91	9800	34.59	11160	37.8	3078	32.54	26550
92	1000	38.72	869	41.21	331	36.50	1321
93	9100	34.02	16140	35.44	13320	32.96	13980
94	2400	35.61	5859	37.75	3056	33.91	7015
95	20600	34.59	10850	39.42	1987	32.65	16400
96	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
97	740	39.58	498	42.03	184	37.58	670
98	10300	35.25	7238	38.02	2670	33.62	8495
99	108000	29.93	218300	31.88	14150	29.42	135200
100	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
101	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
102	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
103	<400	39.96	395	41.63	284	38.81	302
104	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
105	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct
106	<400	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct	No ct

BKV:n toistettavuusnäytteiden tulokset				
		1)	2)	3)
1. määrittys	ABI:n tulos	Kvantitaatio ka.	Kvantitaatio ka.	Kvantitaatio ka.
1	1300	1508	980	2092
2	14260	15050	20000	17470
3	440	296	270	326
2. määrittys				
1	1300	2640	946	1879
2	14260	14770	22190	15360
3	440	407	669	341
3. määrittys				
1	1300	1306	901	1571
2	14260	27610	36500	26880
3	440	430	77030	356
4. määrittys				
1	1300	944	160	838
2	14260	10080	8162	8417
3	440	244	381	203

TARVIKKEET, REAGENSIT JA LAITTEET (EBV ja BKV)

Tarvikkeet:

- Applied Biosystems 96-Well Optical Reaction Plate
- Applied Biosystems Optical Caps
- Applied Biosystems Splash Free Support base
- ART-kärkiä DNAasi ja RNAasi vapaita filttterikärkiä) 100µl, 200µl, 1000µl, 5000µl
- Koeputkitelineet
- Eppendorff-putket 1,5, 5 ml
- Kertakäyttökäsineet
- Korkkien sulkija
- Lehtiö ja kynät
- Maalarinteippi
- MagNA Pure cartridge seal
- MagNA Pure LC processing cartridge
- MagNA Pure LC reaction tips (small, large)
- MagNA Pure LC reagent tube (medium, large)
- MagNA Pure LC tip stand
- MagNA Pure LC tub lids (medium, large)
- MagNA Pure LC waste bottle + bag
- MagNA Pure sample cartridge
- Mekasoft n. 3 cm x 3cm lappuja
- Mekasoft pöytäsuojus
- Muovipussi
- Sarstedt pasteur-pipettejä (6ml)
- Suojatakki
- Pahvinen säilytyslaatikko koeputkille
- Jäteastiat (särmäjäte, biologinen jäte ja autoklavoitava jäte)

Laitteet:

- MagNA Pure LC instrument
- Stratagene Mx3005P
- Thermo Electron -pipettejä (10µl, 5-40µl, 20-200µl, 200-1000µl)
- Eppendorff pipetti 1-5 ml
- Jääkaappi, pakastin -20°C ja -70°C
- Sentrifuugit (sentrifuugi verinäytteiden erotukseen, eppendorff- ja levysentrifuugit)
- Vortex-sekoitin

Reagenssit:

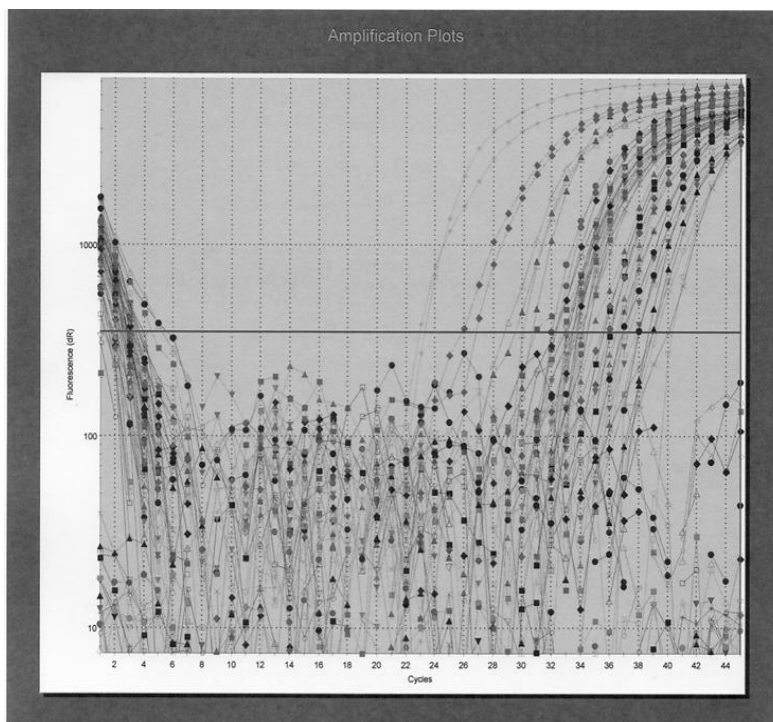
- Ambionin Zap 1 ja Zap 2 sekä Apteekin vesi (MagNA Puren puhdistukseen)
- Vircon (pintojen puhdistus)
- ETOH 70% (pintojen puhdistus)
- **MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit** (Roche, lot. 10737200, 10162200)
 - Wash Buffer I, II ja III
 - Proteinaasi K
 - Magneettipartikkelit (MPGs)
 - Lyysispuskuri

- **EBV-primerit ja -probe:**
 - EBV F primer: 5' CGG AAG CCC TCT GGA CTT C 3'' (Applied Biosystems)
 - EBV R primer: 5' CCC TGT TTA TCC GAT GGA ATG 5' '' (Applied Biosystems)
 - EBV probe: 5' TGT ACA CGC ACG AGA AAT GCG CC 3' TAMRA' (Applied Biosystems,
(Primerit ja Probe säilytetään -20°C. Primereiden käyttöläimennuksia voi säilyttää viikon +4°C:ssa.)

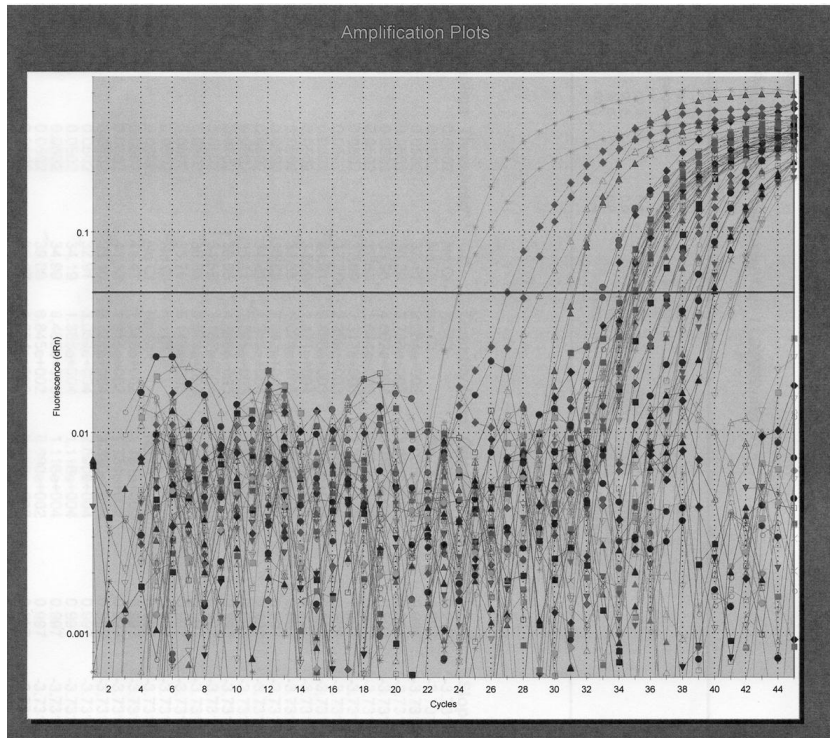
- **BKV-primerit ja -probe:**
 - BKV F Primer: 5'AGC AGG CAA GGG TTC TAT TAC TAA AT 3'' (Applied Biosystems, 1839137)
 - BKV R Primer: 5'GAA GCA ACA GCA GAT TCT CAA CA 3'' (Applied Biosystems, 1839138)
 - BKV probe: FAM 5'AAG ACC CTA AAG ACT TTC CCT CTG ATC TAC ACC AGT TT 3' TAMRA (Applied Biosystems, 1839141)
(Primerit ja Probe säilytetään -20°C. Primereiden käyttöläimennuksia voi säilyttää viikon +4°C:ssa.)

TaqMan[®] Universal Mix (Master Mix) (Applied Biosystems, KP6433)
EBV- ja BKV-standardit

HYVÄKSYTTÄVÄT BKV MONISTUSKÄYRÄT

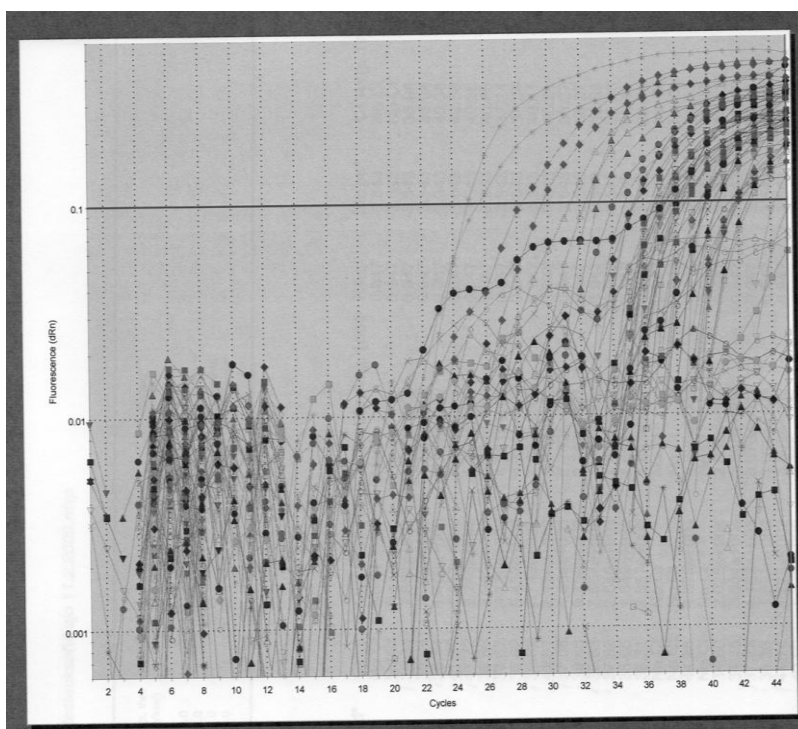


Liitekuva 1. Hyväksyttävä BKV-monistuskäyrä: adaptiivinen ei-normalisoitu.

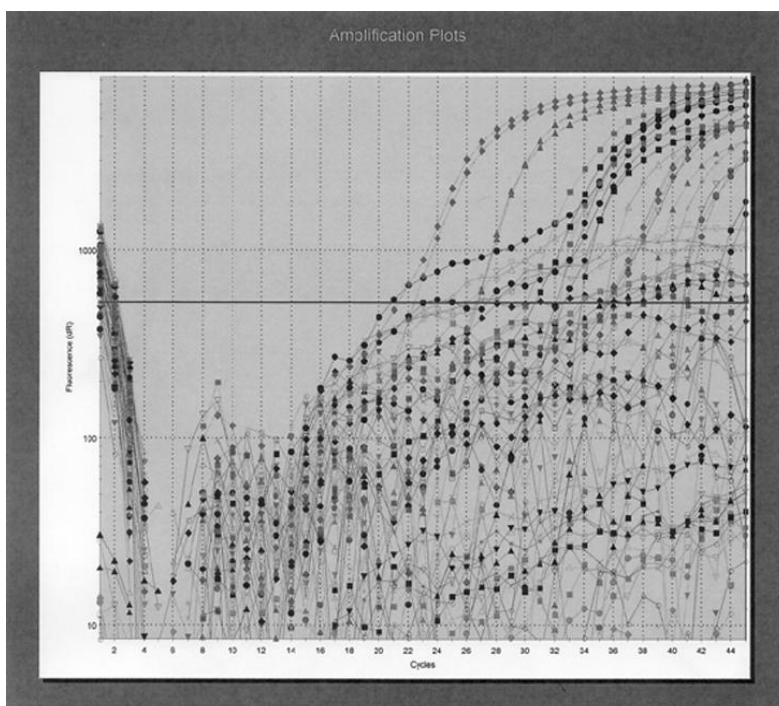


Liitekuva 2. Hyväksyttävä BKV-monistuskäyrä: adaptiivinen normalisoitu.

EI HYVÄKSYTTÄVÄT BKV MONISTUSKÄYRÄT



Liitekuva 3. Ei hyväksytty BKV-monistuskäyrä: non-adaptiivinen normalisoitu.



Liitekuva 4. Ei hyväksytty BKV-monistuskäyrä: non-adaptiivinen ei-normalisoitu.