

Annika Laasonen

# Norovirusdiagnostiikka

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

12.3.2016

Tekijä(t) Otsikko	Annika Laasonen Norovirusdiagnostiikka
Sivumäärä Aika	34 sivua + 6 liitettä 12.3.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaaja(t)	Vanhempi kehityspäällikkö Mirko Brummer Tuotepäällikkö Riikka Kärkkäinen Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, minkälaisia kaupallisia detektiomenetelmiä on markkinoilla norovirusille ja vertailla menetelmiä keskenään. Selvitystyö perustui kirjallisuusselvitykseen, asiantuntijahaastatteluihin sekä tietokantahakuihin markkinoilla olevista diagnostisista menetelmistä. Opinnäytetyön toimeksiantajana on Orion Diagnostica Oy.</p> <p>Norovirus aiheuttaa gastroenteriittiä kaikenikäisille. Norovirusten tunnistaminen perustuu elektronimikroskopiaan, immunologisiin menetelmiin sekä noroviruksen nukleiinihapon osoitukseen. Immunologiset menetelmät pohjautuvat noroviruksen proteiiniantigeenin osoittamiseen merkityllä vasta-aineella.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tuloksena tuli esille, että markkinoilla on useita erilaisia testejä. Työssä esitellään kaksi entyymi-immunologista ja viisi immunokromatografista testiä sekä virusnukleiinihappojen tunnistamiseen käytettyjä PCR-kittejä, XpertNorovirus-testi, neljä multiplex-paneelia ja kaksi isotermaaliseen tunnistukseen perustuvaa testiä. Asiantuntijahaastattelut toteutettiin sähköpostahaastatteluina, ja vastaajina oli kaksi sairaalamikrobiologia, kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri sekä erikoistutkija. Euroopan patenttitoimistosta löytyy useita eri patenteja ja hakemuksia noroviruksen detektointiin, ja uusia diagnostisia menetelmiä kehitetään jatkuvasti.</p>	
Avainsanat	Norovirus, laboriodiagnostiikka, detektiomenetelmät

Author(s) Title	Annika Laasonen Norovirus diagnostics
Number of Pages Date	34 pages + 6 appendices 12 March 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructor(s)	Mirko Brummer, Senior Development Manager Riikka Kärkkäinen, Product Manager Tiina Soininen, Lecturer
<p>The main objective of this thesis was to find out what kind of commercial detection methods are available for norovirus and to compare these methods with each other. This report is based on literary research, expert interviews and database search of diagnostic methods in the market. The thesis was commissioned by Orion Diagnostica PLC.</p> <p>Norovirus causes gastroenteritis in all ages. The identification of norovirus is based on electron microscopy, immunological techniques and molecular diagnostic tests. The immunological techniques are founded on pointing norovirus protein antigens with labelled antibodies.</p> <p>The result of this thesis is, that there are many different tests commercially available. Two enzyme immunoassays and five immunochromatographic assays and PCR-kits, XpertNorovirus assay, four multiplex panels and two isothermal methods for the detection of virusnucleinacids are presented in this work. The expert interviews were done via email and the respondents were 2 hospital microbiologists, 1 specialist of clinical microbiology and 1 senior researcher. There are many patents and applications for the detection of norovirus in European Patent Office, and new techniques are developed constantly.</p>	
Keywords	Norovirus, laboratory diagnostics, detection method

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Norovirus	3
2.1	Yleistä	3
2.2	Viruksen rakenne	4
2.3	Epidemiologia	5
2.4	Taudinkuva	6
2.5	Esto ja hoito	6
2.6	Näytteenotto	7
3	Norovirusdiagnostiikka	8
3.1	Patentit noroviruksen detektointiin	9
3.2	Asiantuntijahaastattelut	9
4	Norovirus antigeenin osoittaminen	13
4.1	Entsyymi-immunologiset menetelmät	13
4.1.1	Ridascreen® Norovirus 3rdGeneration kit	15
4.1.2	IDEIA Norovirus kit	15
4.2	Nopeat immunokromatografiset testit	16
5	Virusnukleiinihappojen osoitus	19
5.1	Reaaliaikainen RT-PCR	19
5.1.1	RT-PCR kitit	19
5.1.2	Xpert®Norovirus	20
5.2	Multiplex PCR-paneelit	21
5.2.1	xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panel	21
5.2.2	FilmArray Gastrointestinal panel	23
5.2.3	Verigene Enteric Pathogens Nuclein Acid test	24
5.2.4	Seeplex® Diarrhea ACE Detection: V-assay	25
5.3	Isotermaalinen nukleiinihappojen monistus	26
6	Johtopäätökset	28
	Lähteet	30

## Liitteet

Liite 1. Patentit noroviruksen detektointiin

Liite 2. Sähköpostihaastattelukysymykset

Liite 3. EIA-testien vertailutaulukko

Liite 4. LFIA-testien vertailutaulukko

Liite 5. PCR-kittien vertailutaulukko

Liite 6. PCR-paneelien vertailutaulukko

## Lyhenteet

CDC	Center for Disease Control and Prevention. Yhdysvaltalainen kansanterveys järjestö.
EIA	Enzyme immunoassay. Entsyymi-immunologinen menetelmä.
EM	Elektronimikroskopia
FDA	U.S. Food and Drug Administration. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto.
LFIA	Lateral flow immunochromatographic assay. Lateraaliseen virtaukseen perustuva immunokromatografinen menetelmä.
NPA	Negative percent agreement.
ORF	Open reading frame. Avoin lukukohta.
PPA	Positive percent agreement.
RNA	Ribonukleiinihappo
RT-LAMP	Reverse Transcription- Loop-mediated Isothermal Amplification. Silmukkeskeinen isotermaalinen vahvistus käänteiskopioinnin jälkeen.
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction. Käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktio.
THL	Terveysten ja hyvinvoinnin laitos

## 1 Johdanto

Akuutti virusperäinen gastroenteriitti eli suolistotulehdus on toiseksi yleisin infektoiva tauti koko maailmassa ja norovirus yleisimpiä aiheuttajia sille [1]. Riskiryhmille kuten iäkkäille, monisairaille, imeväisikäisille ja immuunipuutostautia sairastaville norovirus voi aiheuttaa jopa kuoleman. Suomessa norovirukset ovat tavallisimpia elintarvike- ja vesivälitteisten epidemioiden aiheuttajia. Terveyden ja hyvinvoinninlaitos (THL) tiedotti 22.1.2016 infektiouutisissaan:

Norovirus on nopeasti muuntuva ja uusien virustyyppien ilmaantuminen näkyy epidemioiden lisääntymisenä. Jotta epidemiaselvityksissä löydösten vertailu olisi mahdollista, potilas- ja ympäristönäytteitä tutkivien laboratorioden tulisi käyttää yhdenmukaisia menetelmiä ja jatkuva analyysimenetelmien kehittäminen on tärkeää. [52]

Tämän insinööriyön tarkoituksena on selvittää, minkälaisia kaupallisia detektiomenetelmiä on markkinoilla noroviruksille ja vertailla menetelmiä keskenään. Tarkka ja nopea norovirustesti tarjoaa hyödyllistä tietoa lääkäreille ja parantaa hoitotuloksia, kun oikeanlainen hoitomuoto ja taudin leviämisen ehkäisy voidaan heti aloittaa. Toimintamahdollisuudet noroviruksen nopeaan ja herkkään tunnistamiseen paranevat, kun käytössä on hyvä ja herkkä detektiomenetelmä. Analyysimenetelmä onkin tärkeä työväline epidemioiden estämisessä ja hallinnassa. Oikeanlaisella diagnostiikalla saadaan myös tehostettua laboratorioden toimintaa.

Selvitystyö perustuu kirjallisuusselvitykseen noroviruksesta gastroenteriitin aiheuttajana, asiantuntijahaastatteluihin sekä tietokantahakuihin markkinoilla olevista diagnostisista menetelmistä. Tieteellisiä artikkeleita lukemalla on erityisesti tarkoitus perehtyä evaluointi- eli arviointitutkimuksiin eri diagnostisista menetelmistä. Tässä insinööriyössä keskitytään ihmisiä eniten tartuttuvien norovirusten eli genoryhmien GI ja GII diagnostiikkaan. Myös genoryhmä GIV aiheuttaa ihmisissä norovirusinfektioita, mutta sen tartuttavuus on huomattavasti vähäisempää kuin GI ja GII:n.

Norovirus on muuntautumisen, moninaisuutensa ja infektoitavuutensa takia mielenkiintoinen ja merkittävä tutkimuskohde. Detektointimenetelmistä on julkaistu lukuisia Euroopassa, Yhdysvalloissa ja Aasiassa tehtyjä tutkimuksia. Näitä on tarkoitus hyödyntää tämän opinnäytetyön vertailutaulukoissa. Suomessa norovirusdiagnostiikan aihepiiristä

on tehty aikaisemminkin opinnäytetöitä. Inka Lehdon bioanalytikkokoulutuksen opinnäytetyö ”Norovirusantigeenintunnistustestien evaluointi ja soveltuvuus virusdiagnoosiin” vuonna 2004 keskittyi kahteen eri antigeeninosoitustestiin. Tuoreempaa tutkimusta edustaa Mikael Järvisen ja Kalle Lehdon bioanalytiikan opinnäytetyö ”Noroviruksen vieritestien ja GeneXpert-laitteen evaluointi” vuodelta 2014, jossa keskityttiin päivystyskäyttöön soveltuvien testien evaluointiin.

Erona aikaisempiin noroviruksen laboratoriodiagnostiikkaa käsitteleviin opinnäytetöihin, tämän selvitystyön tarkoituksena on tehdä kokonaisvaltainen selvitys markkinoilla olevista testeistä ja muodostaa taulukoita, joiden avulla menetelmiä olisi helppo vertailla keskenään ja löytää sopivin menetelmä eri kohderyhmille. Selvitystyöstä hyötyvät ensisijaisesti erilaisia menetelmiä valmistavat ja hankkivat tahot kuten laboratoriot. Noroviruksen taudinkuvaan, epidemiologiaan, hoitoon ja estoon keskittyvästä osiosta voivat hyötyä myös hoitoalan työntekijät saamalla uutta tietoa viruksesta.

Selvitystyön tuloksia voi hyödyntää esimerkiksi uudenlaisten noroviruksen detektiomenetelmien kehitystyössä. Insinööriyön toimeksiantaja on Orion Diagnostica Oy. Työtä ohjaavat Orion Diagnostica Oy:ltä vanhempi kehityspäällikkö Mirko Brummer sekä tuotepäällikkö Riikka Kärkkäinen. Metropolia Ammattikorkeakoulusta ohjaavana opettajana toimii lehtori Tiina Soininen.

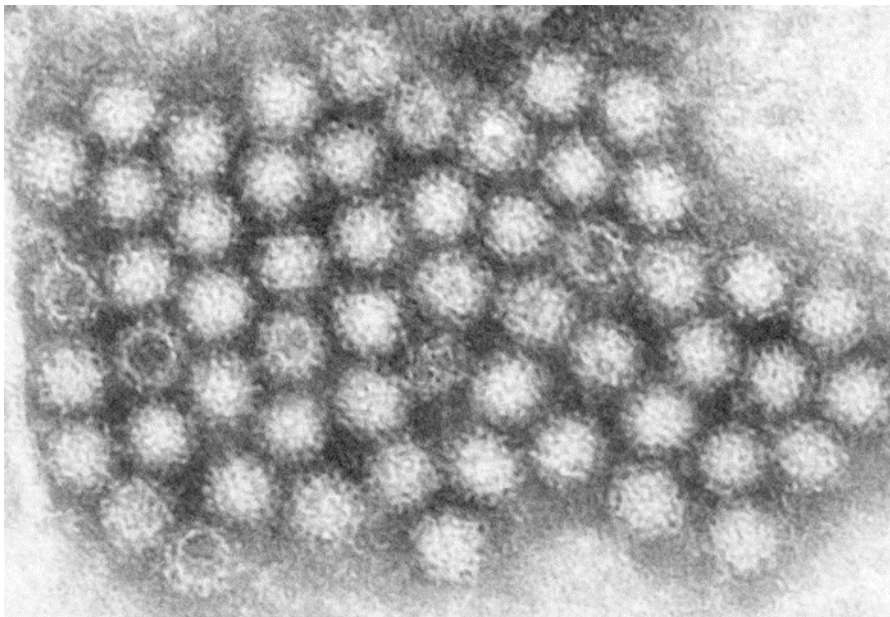


## 2 Norovirus

### 2.1 Yleistä

Norovirus on yksi yleisimpiä gastroenteriitin eli äkillisen suolistotulehduksen aiheuttajia. Gastroenteriitti on merkittävä sairastuvuuden ja kuoleisuuden aiheuttaja maailmanlaajuisesti. Gastroenteriittiä aiheuttavat bakteerit, virukset ja parasiitit. Norovirus on erittäin helposti infektoiva virus, koska se käyttää monia tartuntareittejä ja vain pieni määrä viruspartikkeleita riittää taudin aiheuttamiseen. Sairastuneen ulosteessa ja oksennuksessa virusmäärät ovat korkeat, joten virus tarttuu helposti. Norovirukset säilyvät ympäristössään hyvin, koska ne kestävät suurta pH:n vaihtelua sekä eri lämpötiloja hyvin. [2.]

Norovirukset (Kuva 1) kuuluvat kalikivirusheimoon ja ovat yleisimpiä virusperäisten vatsatauti-epidemioiden aiheuttajia. Norovirusten lisäksi kalikiviruksiin kuuluvat lako-, sapo- ja vesivirukset.



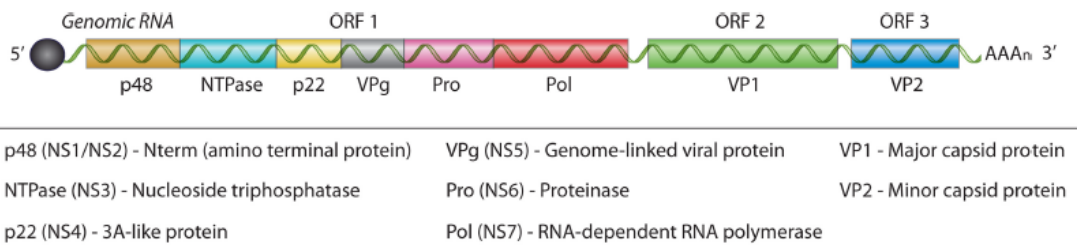
Kuva 1. Norovirus. Lämpäiselektronimikroskooppikuva. Noroviruspartikkelit ovat hakaisijaltaan noin 27-38 nm. [32]

Norovirusten sukua on kutsuttu myös Norwalkin virukseksi. Nimitys norovirus johtaakin Norwalkista, Ohiota, jossa vuonna 1968 puhkesi akuutti gastroenteriittiepidemia. Norwalk-virus sairastutti kahden vuorokauden sisällä 50 % erään peruskoulun opettajista ja

opiskelijoista vatsatautiin. Elektronimikroskopian avulla löydettiin Norwalk-virus, joka myöhemmin luokiteltiin norovirukseksi. [3; 4.]

## 2.2 Viruksen rakenne

Norovirukset ovat positiivisäikeisiä yksijuosteisia RNA- eli ribonukleiinihappovirusia. Virus on halkaisijaltaan noin 27–38 nm. Viruksen kapsidi on muodostunut 180 rakenneproteiinimolekyylistä, jotka ovat järjestyneet dimeereinä eli kahden molekyylin yhdisteinä viruksen kuoreen. Noroviruksen genomi (Kuva 2) on kooltaan noin 7500 nukleotidia pitkä. Norovirusten RNA: ssa on kolme avointa lukukohtaa (open reading frame) ORF1, ORF2 ja ORF3, jotka koodaavat kahdeksaa eri virusproteiinia. ORF1 koodaa proteiineja, joita tarvitaan viruksen replikaatiossa. ORF2 koodaa noroviruksen rakenteelle keskeistä kapsidiproteiinia (VP1), ja ORF3 koodaa pienempää rakenneproteiinia (VP2). [5; 6.]



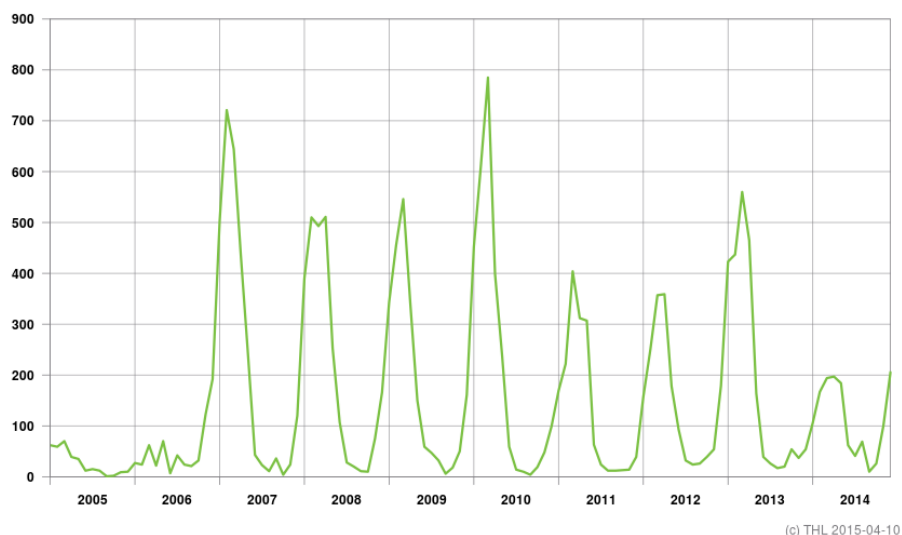
Kuva 2. Noroviruksen genomi eli perintöaines. [6]

Norovirus on geneettisesti moninainen. Se luokitellaan viiteen genoryhmään perimänsä emäsjärjestyksen perusteella (GI – GV). Genoryhmät jakautuvat edelleen genotyyppeihin, joita tunnetaan yli 40. GI-, GII- ja GIV-genoryhmän virukset infektoivat ihmistä. Genoryhmän GI virukset liittyvät usein ruoka- ja vesivälitteisiin norovirusiin. Niitä tunnetaan yhdeksän genotyyppiä. GII-ryhmän virukset ovat tyypillisesti ihmisestä ihmiseen tarttuvia ja terveydenhuollossa esiintyviä. GII-ryhmä on noroviruksesta moninainen, ja siitä tunnetaan jo 17 genotyyppiä. Norovirus on erittäin lajispesifinen, eikä sen siirtyminen zoonoottisesti eli ihmisestä eläimiin tai eläimistä ihmisiin ole yleistä. [5; 2.]

## 2.3 Epidemiologia

Norovirus aiheuttaa ruoka-, vesi- ja laitospörsäisiä epidemioita. Suomen elintarvike- turvallisuuSvirasto Eviran mukaan norovirus on viime vuosina ollut tavallisimpia raportoituja ruokamyrkytysten aiheuttajia. Norovirusepidemioiden välittäjäelintarvikkeena ovat usein olleet Itä-Euroopasta tuodut pakastemarjat. [5; 7.] Norovirus pystyy aiheuttamaan voimakkaita epidemioita, koska se on nopeasti muuntuva virus. Epidemian aiheuttavan viruksen perimä muuntautuu vuodesta toiseen, ja infektion aikaansaama immuniteetti virukselle on lyhyt. Noroviruksen epidemiakausi ajoittuu talvikuuksiin, mutta yksittäisiä infektioita ilmenee vuoden ympäri. [8.]

Norovirus on hyvin tyypillisesti kuvattu suolistotulehdusepidemioiden aiheuttaja monilla eri maantieteellisillä alueilla sekä lasten että aikuisten keskuudessa. Yhdysvaltalainen kansanterveysjärjestö CDC (Center for Disease Control and Prevention) arvio noroviruksen aiheuttavan vuosittain 60 % akuuteista suolistotulehduksista Yhdysvalloissa. Tämä tarkoittaa 21 miljoonaa tapausta vuodessa. [6.] Suomessa tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin norovirustapauksia 1 361 kappaletta vuonna 2014. Kaikista sairaanhoitopiireistä tehtiin ilmoituksia ja tapauksia esiintyi eniten tammikuun ja toukokuun välisenä aikana. Kesäaikaana heinä-elokuussa rekisteriin ilmoitettiin 15 uimavesivälitteistä epidemiaepäilyä. Kuvassa 3 on esitettyä norovirustapausten lukumäärä kuukausittain vuonna 2005—2014. [9.]



(c) THL 2015-04-10

Kuva 3. Tartuntatautirekisteriin ilmoitettujen norovirustapausten lukumäärä kuukausittain Suomessa vuosien 2005—2014 aikana. [9]

## 2.4 Taudinkuva

Norovirus aiheuttaa gastroeneteriittiä eli suolistotulehdusta kaikenikäisille. Eniten sairastuvat nuoret, vanhukset ja ihmiset suljetuissa yhteisöissä kuten sairaalassa, armeijan yksikössä tai risteilyaluksella [1]. Viruksen inkubointi- eli itämisaika on 10—48 tuntia ja tauti alkaa äkillisesti. Akuutti infektiovaihe kestää keskimäärin 1—3 vuorokautta, mutta immuunipuutteisilla henkilöillä sairaus voi kestää pidempään. Tyypillisiä oireita ovat voimakas pahoinvointi, oksentelu, vatsakouristukset sekä ripuli. Infektio aiheuttaa myös lämmönnousua, päänsärkyä, viluisuutta sekä lihaskipuja. [5; 8.]

Taudinkuva voi vaihdella yksilöiden välillä ja myös oireettomia norovirusinfektioita on raportoitu. Tutkimusten mukaan vastustuskyky norovirukselle aiheutuu perimän aiheuttamasta suojasta, joka perustuu histo-veriryhmäantigeenien ilmentymiseen ruoansulatuskanavan limakalvojen epiteelin pinnalla. [6.]

Norovirus on erittäin tarttuva. Jo pieni määrä viruspartikkeleita (10—100 kappaletta), riittää infektion syntyyn. Norovirus kulkeutuu nielun kautta mahalaukkuun ja suolistoon, missä se sitoutuu epiteelisolujen pintaan. Ohutsuolen limakalvolla virus aiheuttaa tulehduksen, jonka seurauksena suoliston normaali rakenne ja toiminta muuttuvat, kun ravintoaineiden imeytyminen suolesta häiriintyy. [10.] Sairastunut tartuttaa virusta ennen oireiden alkua, infektion aikana ja sen jälkeen. Virusta erittyy elimistöstä ulosteen välityksellä jopa 8 viikkoa oireiden jälkeen. Taudinmääritys tehdään tyypillisesti oireiden ja infektion etenemisen perusteella. [2.]

## 2.5 Esto ja hoito

Noroviruksen aiheuttamaan tautiin ei ole olemassa spesifistä lääkehoitoa eikä virusta vastaan ole saatavissa rokotetta. Sairastuneen aikuisen oireita voidaan lääkittää kipu- ja ripulilääkkeillä sekä pahoinvointia ja oksentelua hillitsevillä lääkkeillä. Norovirukseen sairastuneen lapsen lääkehoitona voidaan käyttää ripulijuomajauheita nestetasapainon ylläpitoon sekä maitohappobakteerivalmisteita tilan tasoittamiseen.

Useimmiten noroviruksen aiheuttama tauti paranee itsestään. Sairaalahoittoa tarvitaan, jos virusinfektio aiheuttaa rajumpia oireita tai sairastunut kuuluu johonkin riskiryhmään.

Riskiryhmiin kuuluvat immuunipuutostautia sairastavat, monisairaat, vanhukset ja imeväisikäiset. Virusinfektion yleishoito-ohjeet ovat samat kuin muissakin äkillisissä ripulitaudeissa. Koska oksentelun ja ripuloinnin yhteydessä neste hukka on huomattava, on tärkeintä huolehtia riittävästä nesteensaannista ja estää sairastuneen kuivuminen. [4;11.]

Norovirus tarttuu pisara- ja kosketustartuntana. Tartunnan voi saada myös ruoka- tai vesivälitteisenä. Viruspartikkelit säilyvät infektoivina pinnoilla kaksi viikkoa ja vesissä yli kaksi kuukautta [2]. Tärkeimpänä estokeinona on välttää viruskosketusta ja huolehtia hyvästä käsihygieniasta. Sairaaloissa epäiltäessä noroviruksen aiheuttamaa infektiota estokeinona käytetään nopeaa ja tehokasta siivousta, sairaiden ja altistuneiden eristämistä terveistä sekä käsihygienian tehostamista. Eristyksessä sairastunut pyritään sijoittamaan yhden hengen huoneeseen ja läihoidossa käytetään suojakäsineitä sekä suu- ja nenäsuojaimia. [5; 4]

Ruokavälitteistä norovirusta ehkäistään ensisijaisesti välttämällä saastuneiden raaka-aineiden, elintarvikkeiden ja juomaveden käyttöä. Tuoreet kasvikset ja hedelmät tulee pestä ennen käyttöä ja ulkomaiset pakastemarjat on suositeltavaa kuumentaa ennen käyttöä, koska norovirukset kestävät pakastuksen hyvin. Lämpökäsittely tuhoaa viruksen. Epäiltäessä raaka-ainetta noroviruksen saastuttamaksi suositellaan kuumentamista vähintään +90 °C:ssa. Vähintään kaksi minuuttia kestävä kuumennus tuhoaa viruksen. [7.]

## 2.6 Näytteenotto

Näytteenlaatu vaikuttaa olennaisesti diagnostisten testien tulosten tulkintaan. On tärkeää, että näytteiden keräys ja käsittely tapahtuu oikeaoppisesti. Optimaalisin näytemateriaali noroviruksen diagnosointiin on ripulivaiheen uloste, jolloin norovirusten pitoisuus ulosteessa on korkeimmillaan. Jos ulostenäytettä ei saada, voidaan käyttää vaihtoehtoisesti oksennusnäytettä. [6;12.]

Ulostenäytettä otettaessa potilas ulostaa puhtaaseen kertakäyttöastiaan, josta näytettä siirretään ulostenäytepurkkiin tai geelikuljetusputkeen. Näyte otetaan ensisijaisesti sellaisesta kohdasta ulostetta, jossa on verta tai limaa, mikäli niitä on. Ulosteseen ei saa sekoittua virtsaa. Näyte siirretään purkkiin siihen tarkoitetulla lastalla. Purkista täytetään

$\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ . Geelikuljetusputkeen näyte otetaan näytteenottotikulla ulosteesta pyörittämällä siten, että siihen tarttuu mahdollisimman paljon ulostetta. Tikku työnnetään kuljetusputkeen siten, että tikun pää menee geelin sisälle. [12.]

Näytteen säilytys tapahtuu suljetussa astiassa. Geelikuljetusputkessa näyte säilyy kaksi vuorokautta huoneenlämmössä ja jääkaapissa 4 °C:n lämpötilassa kolme vuorokautta. Pidempää säilytystä varten ulostenäytteet tulee pakastaa -20 °C:seen tai -70°C:seen [6;12]. Näytteenotto ja -käsittelyvaiheessa on tärkeää suojautua, työskennellä aseptisesti sekä huolehtia hyvästä käsihygieniasta, koska norovirus tarttuu helposti.

### 3 Norovirusdiagnoosi

Gastroenteriitit ovat diagnostinen haaste laboratorioille. Suolistotulehduksen aiheuttajan diagnosointi on tärkeää, jotta saadaan asianmukainen hoito aloitettua ja voidaan ryhtyä tarvittaviin toimenpiteisiin taudin leviämisen estämiseksi. Tulehduksen aiheuttajaa selvitetään tyypillisesti yksilökohtaisen kliinisen taudinkuvan perusteella tai nopeasti alkavan vatsatauti-epidemian yhteydessä. Diagnostisina menetelminä käytetään soluviljelyä, mikroskopiaa, nukleiinihapon osoitusta ja antigeeninosoitusta.

Norovirusten tutkiminen on ollut haasteellista, koska ne eivät kasva soluviljelmissä ja niillä on runsas lajisto ja suppea isäntäspesifisyys. Norovirusten tunnistaminen perustuu elektronimikroskopiaan (EM), immunologisiin menetelmiin sekä noroviruksen nukleiinihapon osoitukseen PCR-tekniikalla. [5.] Pisimpään käytössä ollut menetelmä on elektronimikroskopia, jonka avulla havaitaan morfologisesti erillisiä viruspartikkeleita. EM menetelmänä on kuitenkin suhteellisen epäherkkä. EM vaatii runsaasti virusta sisältävän ulostenäytteen, jossa olisi vähintään  $10^6$  viruspartikkelia grammassa ulostenäytettä [13]. EM:n etuna voidaan suolistotulehduksen diagnoosissa pitää muidenkin mahdollisten taudinaiheuttajien kuin noroviruksen löytymistä.

Noroviruksen nopea tunnistaminen taudin puhjettua on tärkeää, jotta saadaan tehokkaasti kontrolloitua infektiota ja valittua oikea hoitomuoto. Erotusdiagnoosi helpottaa hoitomuodon valintaa. Jos taudinkuva on vakava, on erityisen tärkeää selvittää infektion aiheuttaja, koska kaikki virukset eivät ole yhtä infektoivia. Sairaalamailmassa norovirusdiagnoosi auttaa päätösten tekoa potilassiirroista ja helpottaa sairaalaepidemioiden ehkäisyä. [5.]

Norovirusdiagnostiikkaa koskevien tutkimusten arvioinnissa käytetään tunnuslukuina herkkyyttä ja spesifisyyttä. Diagnostisen testin herkkyys eli sensitiivisyys kuvaa prosenttilukuna testiposiitivisten osuutta sairaista verrattuna luotettavampaan menetelmään. Spesifisyys eli tarkkuus kuvaa prosenttilukuna testinegatiivisten osuutta terveistä. Evaluontitutkimuksissa tyypillisimmin verrataan norovirusta RT-PCR: ään, joka on todettu luotettavaksi menetelmäksi, mutta osassa tutkimuksia verrataan samankaltaisia testejä keskenään.

### 3.1 Patentit noroviruksen detektointiin

Euroopan patenttitoimiston tietokannasta löytyy noroviruksen detektointiin 54 viitettä erilaisiin patentteihin, kun hakusanana käytetään ”norovirus” ja ”detection” ja 17 kappaletta, kun käyttää hakusanana ”Norwalk” ja ”detection” (Liite 1). Tuorein hakemus käsittelee noroviruksen tunnistavaa geenisirua. Suurin osa patenteista koskee tiettyjä alukkeita, koettimia tai antigeeneja. Lisäksi on varmasti monia patenteja norovirusdiagnostiikkaan, joita ei edellä mainittuja hakusanoja käyttämällä löydy. [14.]

### 3.2 Asiantuntijahaastattelut

Osana opinnäytetyötä lähetettiin haastattelukysely (Liite 2) neljään eri sairaanhoitopiiriin, kahdelle THL:n tutkijalle sekä Turun yliopiston virologianosastolle 26.1.2016. Kysely lähetettiin uudelleen ei-vastanneille 4.2.2016. Haastattelu lähetettiin yhteensä neljälletoista henkilölle. Haastattelun tarkoituksena oli ottaa selville, miten eri puolilla Suomea tutkitaan norovirusta, milloin on tarvetta selvittää suolistotulehduksen aiheuttaja ja millaisia toivomuksia laboratorioilla on noroviruksen detektiomenetelmälle. Määräaikaan mennessä kyselyyn vastasi neljä henkilöä. Kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri Jaana Kauppila NordLab Oulusta, sairaalamikrobiologi Kerttu Saha Etelä-Pohjanmaan Sairaanhoitopiiristä sekä erikoistuva sairaalamikrobiologi Anna Oksaharju Itä-Suomen laboratoriokeskuksesta kertoivat norovirusdiagnostiikasta. THL:n erikoistutkija Haider al-Hello kertoi, miten epidemioita tutkitaan Suomessa.

Sairalamikrobiologit eivät ole kliinisen mikrobiologian laboratoriossa tekemisissä potilaiden kanssa suoraan vaan gastroenteriitin aiheuttajaa selvitetään näytteistä tutkimuksilla, jotka hoitava lääkäri pyytää. Tavallisimmin pyydetään bakteeriripulin aiheuttajien

seulontaa (salmonella, shigella, yersinia ja campylo) tai virusepäilyssä seulotaan noro-, rota- ja adenovirus. [48; 51.] Erikoislääkäri Jaana Kauppila kertoo, että gastroenteriitin aiheuttaja on tarvetta selvittää, jos kyseessä on osastohoidossa oleva tai ulkomaanmatkalta palaava ripuloiva potilas tai ruoka- tai vesiepidemian selvitys. Elintarviketyössä tai vastasyntyneiden hoidossa työskenteleviltä suolistotulehduksen aiheuttaja tulee selvittää aina. NordLabissa norovirusta diagnosoidaan antigeenin osoituksella sekä nukleiinihaponosoituksella. Antigeenin osoitustestit ovat nopeita, mutta ne voivat olla liian epäherkkiä. Sekä antigeenin osoituksessa ja nukleiinihappojen osoituksessa on tärkeää seurata jatkuvasti menetelmän herkkyyttä uusien kiertävien kantojen suhteen, koska norovirus on nopeasti muuntautuva virus. [49.]

Itä-Suomen Laboratoriokeskuksessa ja Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirissä norovirus diagnosoidaan nukleiinihappo-osoituksella Cepheidin GeneXpert-laitteella. Molemissa laboratorioissa on oltu tyytyväisiä menetelmän herkkyyteen ja nopeuteen, eikä tarvetta tehokkaamman laitteen hankintaan ole tällä hetkellä. [48, 51]. Sairaalamikrobiologi Kerttu Saha Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiristä kertoo, että aiemmin käytössä on ollut myös noroviruksen antigeeniosoitus immunokromatografisella testillä, mutta tutkimuksen käyttö on sittemmin lopetettu huonon herkkyyden takia. Vain noin 60 % PCR-positiivisista tuloksista antoi antigeenitestissä positiivisen. [48.]

Erikoistutkija AI-Hellon mukaan THL:llä gastroenteriitin aiheuttajaa selvitetään, kun patogeeni aiheuttaa epidemian esimerkiksi laitoksessa kuten vanhainkodissa tai jos kyseessä on ruoka- tai vesivälitteinen epidemia. Sekvensointia ja genotyyppitystä käytetään, kun tunnistetaan tai jäljitetään epidemiaa. Tutkimusmenetelmiä kehitetään jatkuvasti. THL:lle on tulossa kaksi uutta menetelmää: nested-PCR (THL, RIVM:sta Venema), jota ei ole vielä julkaistu, ja uuden sukupolven sekvensointi NGS (Next-Generation Sequencing). PCR:ään THL:ssä käytetään GeneAmp-9700 laitetta. AI-Hellon mukaan sekvensointimenetelmät ovat hitaita eivätkä kelpaa primääridiagnostiikkaa tekeville laboratorioille. NGS on myös kallis menetelmä ja vaatii paljon analysointia ja kokeneen, erikoistuneen henkilöstön. [50.]

Hyvän detektiomenetelmän ominaisuuksia ovat nopeus, soveltuvuus päivystysdiagnostiikkaan ja riittävä herkkyys. Valmistajan tulee seurata epidemiatilannetta ja kiertäviä kantoja sekä pitää testi jatkuvasti ajan tasalla. Isossa epidemiassa näytemäärä voi nousta sairaaloissa suureksikin, joten laitteiston kapasiteetin tulee olla riittävä. [49.]

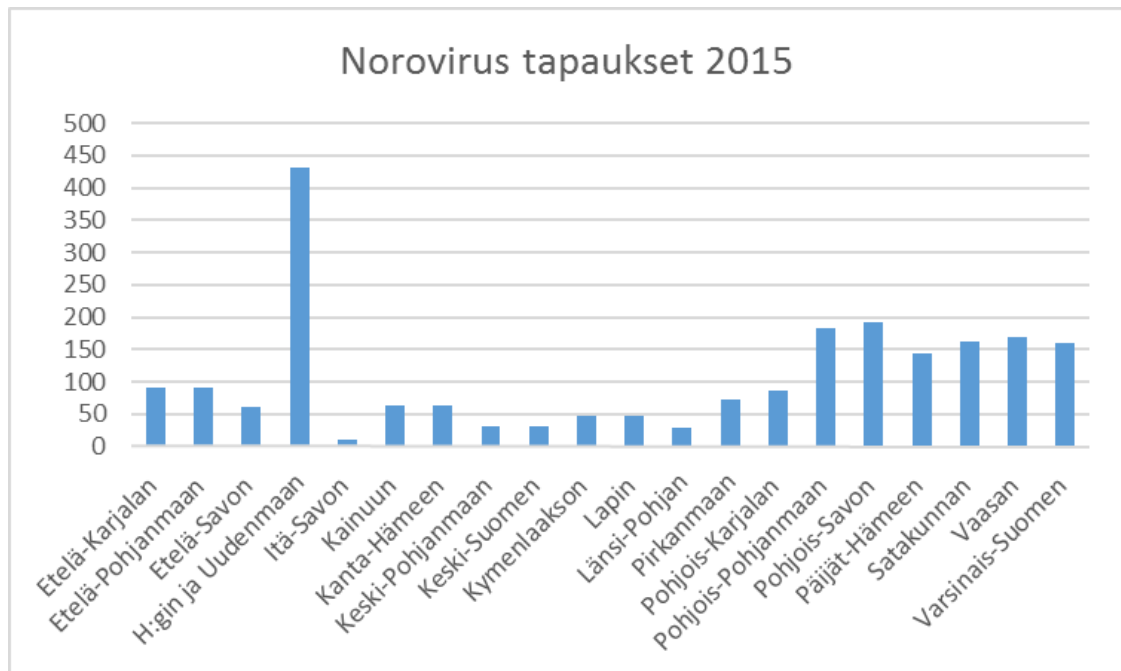


Sähköpostihaastatteluun vastattiin NordLabista, ISLAB:sta sekä Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiristä. NordLabin toiminta-alue kattaa Keski-Pohjanmaan, Lapin, Länsi-Pohjanmaan, Pohjois-Pohjanmaan ja Kainuun sairaanhoitopiirit. ISLAB tuottaa laboratoriopalveluita Pohjois-Savon, Pohjois-Karjalan, Etelä-Savon sekä Itä-Savon sairaanhoitopiirien alueella. Haastatteluun vastanneiden toiminta-alueet ovat esitettynä kuvassa 4. Etelä-Suomen ja Päijät-Hämeen alueelta ei saatu haastatteluvastauksia, joten tulokset eivät kata koko Suomea maantieteellisesti.



Kuva 4. Suomen sairaanhoitopiirit. Sähköpostihaastatteluun vastanneiden toiminta-alue punaisella reunustettuna. Mukailtu lähteestä. [54]

Potilasmääriä ajatellen haastatteluun vastanneiden toiminta-alueiden sairaanhoitopiirien asukaslukumäärät edustavat vain noin 28 % koko Suomen väestöstä [56]. Tartuntatautirekisteriin ilmoitettujen norovirustapausten lukumäärä vuonna 2015 oli yhteensä 2 164 kappaletta (Kuvio 1), joista 37 % oli sairastunut vastanneiden sairaanhoitopiirien toiminta-alueilla [57]. Esimerkiksi Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin alueelta, jossa ilmoitettuja sairastapauksia oli eniten (431 kappaletta), ei vastausta sähköpostihaastatteluun saatu.



Kuvio 1. Tartuntatautirekisteriin ilmoitettujen norovirusten lukumäärä sairaanhoitopiireittäin vuonna 2015. [56]

Vastanneet edustivat kolmea eri ammattiryhmää. Kaksi vastanneista oli sairaalamikrobiologeja ja heidän vastauksensa olivat hyvin samantyyppisiä. THL:n erikoistutkijan vastaus oli ainut laatuaan kuvaamaan, millaista noroviruksen detektointi on muuten kuin potilastyössä.

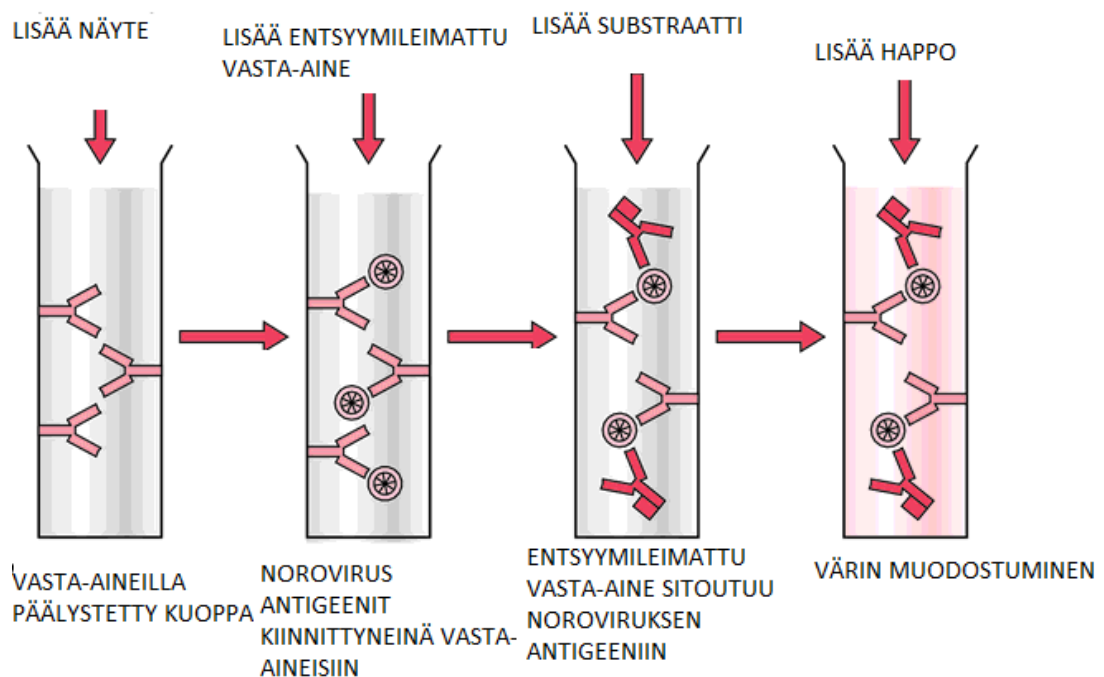
## 4 Norovirus antigeenin osoittaminen

Immunokemialliset menetelmät perustuvat noroviruksen proteiiniantigeenin osoittamiseen merkityllä vasta-aineella. Virusproteiineja voidaan osoittaa suoraan potilaan ulostenäytteestä. Noroviruksen antigeeneja eli immuunivasteen aiheuttavia aineita osoitetaan pääasiassa kahdella eri menetelmällä: entsyymi-immunologisella menetelmällä ja immunokromatografialla. Entsyymi-immunologiset menetelmät suoritetaan kuoppalevyllä ja merkkiaineena toimii entsyymi. Immunokromatografiset menetelmät perustuvat lateraaliseen virtaukseen. Näyte etenee testikasetilla ja muodostaa kompleksin vastaaineiden kanssa. Menetelmän valintaan vaikuttavat päivittäin tutkittavien näytteiden lukumäärä ja laboratorion tottumukset. [16.]

### 4.1 Entsyymi-immunologiset menetelmät

Norovirus genoryhmien GI ja GII tunnistamiseen on saatavilla useita kaupallisia entsyymi-immunologisia EIA (enzyme immunoassay)-testejä, joista tunnetuimmat ovat R-Biopharmin Ridascreen kit ja Oxoid Ltd:n IDEIA Norovirus kit. Liitteessä 3 on taulukko, jossa näitä kahta vertaillaan. Testit ovat hyvin samanlaisia. Ridascreen sisältää yhden työvaiheen enemmän kuin IDEIA ja on kestoaltaan hiukan pidempi. Herkkyyksiltään ja spesifisyyksiltään testit ovat samaa luokkaa. Merkittävin ero näiden kahden välillä on se, että Ridascreenillä on FDA:n eli Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (US Food and Drug Administration) hyväksyntä.

Testit perustuvat kuoppalevyn pintaan kiinnittyneisiin vasta-aineisiin, joihin näytteessä oleva norovirusantigeeni kiinnittyy. EIA-testien toiminta menetelmä on havainnollistettu kuvassa 5. Syntynyt vasta-aine-antigeeni-kompleksi sitoo itseensä entsyymillä (peroksidaasi) leimatun vasta-aineen (konjugaatti). Rakennelmaa kutsutaan "sandwich"-kompleksiksi, koska yhdistelmä muodostuu kerrosvoileivän tapaan. Antigeenin läsnäolo kerrosrakennelmassa osoitetaan lisäämällä kuoppaan substraattia, joka saa yhdessä konjugaatin kanssa aikaan värireaktion. Värireaktio pysäytetään hapolla. Tuloksena syntynyt värinmuutos voidaan mitata fotometrisesti. Saatu tulos on suoraan verrannollinen näytteessä olevan antigeenin määrään. [17.]



Kuva 5. EIA-testin toimintaperiaate, mukailtuna lähteestä [19]

Testien herkkyyksissä ja spesifisyyksissä on paljon vaihtelua, koska määrittämisen vasta-aineet vastaavat tiettyjä genotyyppiä. Testi ei välttämättä tunnista tiettyjä genotyyppiä ollenkaan. Potilasryhmällä sekä näytteenottoajankohdalla on todettu olevan myös merkittävä vaikutus testin tehokkuuteen. EIA-testien on todettu olevan herkimpiä silloin, kun tutkitaan epidemian puhkeamista ja näytteitä on paljon. Testien etuna on helppo toteutus sekä lyhyt kokonaiskesto. [6.]

#### 4.1.1 Ridascreen® Norovirus 3rdGeneration kit

R-Biopharmin Ridascreen Norovirus-kitillä on FDA:n hyväksyntä norovirus epidemioiden tutkimiseen. Testi on hyvä esimerkki virusantigeenin osoitustestistä, jolla voidaan kar-  
toittaa norovirus epidemian esiintyvyyttä ja ennustettavuutta. Ridascreen ei ole kui-  
tenkaan tarpeeksi herkkä yksittäisten potilaiden diagnosointiin. [20.] Morillo tutkimusry-  
mineen määritti evaluointitutkimuksessaan vuonna 2011 testin herkkyydeksi 61,8 %, kun  
vertailumetodina oli RT-PCR [13]. Valmistajan antama herkkyys on samaa luokkaa, 65  
% [15].

Ridascreen-kitin toiminta perustuu monoklonaalisilla vasta-aineilla päällystettyihin  
kaivoihin. Vasta-aineita on useita norovirus genorymien I ja II genotyyppejä vastaan.  
Testi tunnistaa yleisimmät norovirusinfektiota ihmisessä aiheuttavat linjat, mutta ei kaik-  
kia. [13;15.] Näytteenä käytetään 100 µl tai 100 mg ulostenäytettä. Näyte pipetoidaan  
suspensiossa kaivoon yhdessä biotinyloitujen monoklonaalisten norovirusvasta-ainei-  
den kanssa. Ulosteeissa olleet norovirusantigeenit kiinnittyvät sandwich-kompleksissa  
immobilisoituihin vasta-aineisiin sekä biotiinilla käsiteltyihin vasta-aineisiin, jotka tunnis-  
tetaan streptavidiiniperoksidaasikonjugaatilla. Peroksidaasi aiheuttaa värireaktion si-  
niseksi. Kun reaktio pysäytetään hapolla, muuttuu sininen keltaiseksi, joka on merkki  
norovirusantigeenien läsnäolosta. Tulokset luetaan fotometrisesti. [15.]

Ridascreen kitti sisältää 96-kuoppalevyn sekä kaikki testiin tarvittavat reagenssit. Muu  
testin suorittamiseen tarvittava välineistö sekä materiaali tulee olla laboratoriolta omasta  
takaa, kuten huuhteluun ja fotometriseenmittaukseen tarvittavat välineet. Inkubointeihin  
kuluu aikaa noin 105 minuuttia ja lisäksi testin suorittamiseen kuuluu paljon käsin tehtä-  
viä vaiheita, kuten näytteen valmistus sekä pipetointi kuoppiin, joten testin kokonaisaika  
on useita tunteja. [15.]

#### 4.1.2 IDEIA Norovirus kit

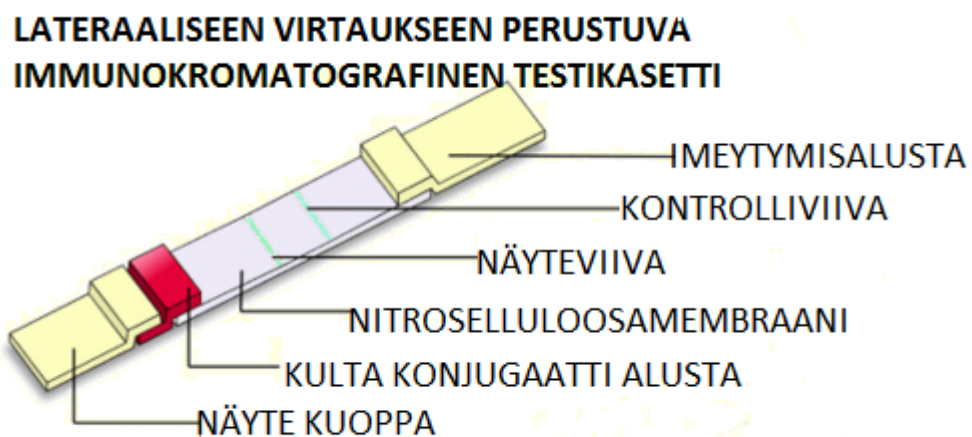
IDEIA Norovirus kit on Oxoid Ltd:n valmistama entsyymi-immunologinen menetelmä,  
joka hyödyntää yhdistelmää norovirus genoryhmille I ja II spesifisiä monoklonaalisia  
ja polyklonaalisia vasta-aineita. Testi tapahtuu kiinteän faasin sandwich-kompleksina  
kuoppalevyllä, jonka mikrokaivot on päällystetty monoklonaalisilla vasta-aineilla GI ja GII  
norovirus genoryhmiä vastaan. [18.]

Testi suoritetaan 100 mg:n tai 100 µl:n ulostenäytteestä. Ulostelaimennos lisätään kaivoon ja inkuboidaan samanaikaisesti noroviruspesifisten polyklonaalisten vasta-aineiden sekä monoklonaalisten piparjuuriperoksidaasi-leimattujen vasta-aineiden kanssa. Näytteessä olevat norovirusantigeenit kiinnittyvät kiinteään faasin vasta-aineiden ja entsyymi-leimattujen vasta-aineiden väliin, ja tulos on havaittavissa värireaktiona. [18.]

IDEIA Norovirus testi detektoi sekä genoryhmä GI: n ja GII: n linjoja, mutta ei erottele niitä toisistaan. Testiä ei ole validoitu kaikille noroviruslinjoille, joten se voi jättää tunnistamatta noroviruksen, koska liikkeellä olevat linjat voivat olla antigeenisesti moninaisia. [18] IDEIA Norovirus kitillä ei ole FDA: n hyväksyntää. Costantini työryhmineen määrittä 2010 testin herkkyudeksi 55,0 - 59,6 % kun vertailumetodina käytettiin RT-PCR: ää. [21.]

#### 4.2 Nopeat immunokromatografiset testit

Lateraaliseen virtaukseen perustuvat immunokromatografiset eli LFIA-testit (lateral flow immunochromatographic assay) ovat hyvä vaihtoehto perinteisille EIA-menetelmille. Immunokromatografiset testit perustuvat kahden vasta-aineen ja osoitettavan viruspartikkelin välisen kompleksin muodostumiseen. Reaktio tapahtuu testikasetilla, jonka näytekuoppaan näyte lisätään (Kuva 6).



Kuva 6. Immunokromatografisen testikasetin rakenne. Kuvassa näkyy konjugaattina kulta-konjugaatti, joka on yksi yleisimmistä käytetyistä. Mukailtu lähteestä [23]

Ensimmäisessä vaiheessa spesifiset ja merkityt vasta-aineet tunnistavat näytteestä etsityt antigeenit ja muodostavat kompleksin. Vasta-aineiden merkitsemiseen eli konjuugaattina käytetään esimerkiksi kultaa tai lateksia. Syntynyt kompleksi etenee kapillaari-vaikutuksesta testikasetilla, kunnes se saavuttaa alueen, jossa on kiinnitettynä kompleksin tunnistavia vasta-aineita. Mikäli näytteessä on ollut antigeenia, näytetikkun muodostuu tässä vaiheessa testiä viiva. Kontrollina toimivat vapaat vasta-aineet muodostavat näytetikkun toisen selkeästi näkyvän kontrolliviivan, joka kertoo, onko testi onnistunut. [16; 22; 24.]

Nopeutensa takia immunokromatografiset testit soveltuvat hyvin vieritestaukseen eli potilaan lähellä tapahtuvaan laboratoriotutkimukseen esimerkiksi terveyskeskuksissa, koska suuntaa-antava tulos saadaan heti ja testit on helppo suorittaa. Noroviruksen diagnosoiminen voi viedä vain muutamia minutteja. Lateraaliseen virtaukseen perustuvat testit ovat kuitenkin herkkyydeltään melko huonoja (Taulukko 1).

Taulukko 1. LFIA-menetelmään perustuvien testien herkkyyksiä ja spesifisyyksiä evaluointitutkimustuloksina ja valmistajan ilmoittamana

Testin nimi	RIDAQuick	NOROTOP+	ImmunoCard STAT!®Norovirus	SD Bioline Norovirus	Noroscreen
<b>Valmistaja</b>	R-Biopharm	Pro-Lab Diagnostics	Meridian Bioscience Europe	Standard diagnostics	Microgen Bioproducts
<b>Herkkyyys</b>	61,4% [25], 59% [24]	19-38 % [24]	24% [24], 35% [27]	41% [27]	23 % [24]
Norovirus GI	42,1% [25]	52% [27]	26% [27]	23% [27]	NA
Norovirus GII	76% [25]	50% [27]	39% [27]	54% [27]	NA
Valmistajan ilmoittama	92% [26]	95,65 % vs RT-PCR [31]	92% vs RT-PCR [28]	84,1% [29]	95,65% [30]
<b>Spesifisyys</b>	100% [25], 100% [24]	40 - 100% [24]	75 % [24]	100% [27]	100[24]
Norovirus GI	100% [25]	NA	NA	NA	NA
Norovirus GII	100% [25]	NA	NA	NA	NA
Valmistajan ilmoittama	98% [26]	91,67 % vs RT-PCR [31]	98,3% vs RT-PCR [28]	96,1% [29]	91,67% [30]
<b>Vertailumetodi</b>	RT-PCR, easyMAG, ABI7500 [25]	rRT-PCR [24]	rRT-PCR [24]	RT-PCR & Ridaquick [27]	rRT-PCR [24]

Markkinoilla on lukuisia LFIA-testejä, kuten Rida®quick Norovirus, Immunoquick, Noroscreen, ImmunoCard STAT! ja Norotop+®. Liitteessä 4 on vertailutaulukko viiden tunnetun LFIA-testin ominaisuuksista. Testit ovat hyvin samantapaisia keskenään. Testien

kokonaiskesto on tyypillisesti noin 20 min, josta 15 min kuluu inkubointiin ja 5 min näytteenkäsittelyyn. Kaikissa testeissä näytteenä toimii ulostenäyte ja tulos ilmoitetaan kvalitatiivisesti eli onko näytteessä norovirusta vai ei. LFIA-testeistä yhdelläkään ei ole FDA-hyväksyntää.

Taulukossa 1 on kuvattuna testien herkkyudet ja spesifisyydet verrattuna toisiinsa ja valmistajan ilmoittamaan arvoon. Vertailun perusteella herkin LFIA-testi on Ridaquick. Genoryhmällä näyttäisi olevan myös suuri vaikutus herkkyyteen. Suurin osa LFIA:sta ovat herkempiä genoryhmälle GII kuin GI. On huomattavaa, että valmistajien ilmoittamat herkkyudet eroavat huomattavasti eri tutkimusryhmien evaluointitutkimuksissa saaduista tuloksista. Valmistajat ovat ilmoittaneet herkkyudeksi keskimäärin 90 %:n luokkaa, kun taas evaluointien tuloksissa herkkyysien keskiarvo on vain noin 40 %. Evaluointitutkimusten aineistot olivat kooltaan 100—500 näytettä.



## 5 Virusnukleiinihappojen osoitus

Norovirusdiagnostiikan herkimpiä ja spesifisimpiä menetelmiä ovat geeninmonistukseen perustuvat virusnukleiinihappojen osoitukset. Markkinoilta löytyy erilaisia PCR-kittejä, paneeleita ja laitepaketteja pääasiassa noroviruksen genoryhmien GI ja GII detektointiin. Multiplex-paneelit tunnistavat näytteestä noroviruksen lisäksi myös muita gastroenteriititä aiheuttavia patogeeneja.

Noroviruksen tunnistuksen ja tyypittämisen kultaisena standardina on pidetty RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) -menetelmää eli käänteistranskriptio polymeerasiketjureaktiota. RT-PCR-tekniikat ovat herkkiä ja tunnistavat noroviruksen jo pienistä kopiomääristä reaktion aikana. Noroviruksen genoryhmien GI ja GII tunnistamiseen käytetään eri alukkeita. Alukkeiden suunnittelu onkin yksi PCR:n ongelma, koska norovirus on geneettisesti moninainen virus ja siitä on lukuisia genotyyppiä. Reaaliaikasta RT-PCR käytetään tunnistamaan norovirus ulosteesta, oksennuksesta, vedestä ja ympäristönäytteistä. [6; 32.]

### 5.1 Reaaliaikainen RT-PCR

RT-PCR on käytetyimpiä menetelmiä norovirusdiagnostiikassa. Se sisältää RNA-käänteiskopijoiainsyymivaiheen, josta menetelmän nimitys on peräisin. Samalla määrityksellä pystytään tunnistamaan sekä tautia aiheuttava norovirus että genotyyppi. RT-PCR perustuu kohdemolekyylin monistamiseen polymeerasiketjureaktiolla. Näytteistä eristetään ensin ribonukleiinihapot eli RNA. Eristetystä RNA-juosteesta muodostetaan käänteiskopioentsyymien avulla cDNA-kopio eli komplementaarinen DNA ennen PCR-vaihetta.

#### 5.1.1 RT-PCR kitit

Markkinoilta löytyy useita noroviruksen genoryhmien GI ja GII tunnistukseen tarkoitettuja PCR-kittejä, jotka sisältävät kaikki tarvittavat reagenssit RT-PCR: ään (Liite 5). Paketteja on saatavilla eri kokoisina. Fast-Track Diagnosticsin kitit ovat tarkoitettuja 32 tai 64 reaktioon, kun taas R-biopharmilla Rida®Gene Norovirus—tuoteperheen kitit ovat 100 reaktioon. Tyypillisesti kitit soveltuvat käytettäväksi useimmille markkinoilla saatavilla oleville eristys- ja PCR-laitteistoille, mutta olemassa on myös kittejä, jotka on suunniteltu

tietylle laitteelle. Esimerkiksi Rida®Gene Norovirus I & II LC2.0:n PCR-laitteena toimii Roche'n LightCycler® 2.0. RT-PCR:n suorittaminen kaupallisella kitillä vie aikaa yhteensä noin kaksi tuntia, josta 30 minuuttia kuluu RNA:n eristämiseen ulostenäytteestä ja noin 90 minuuttia RT-PCR: ään. Kaupallisesti saatavilla on myös multiplex-kittejä, jotka tunnistavat samasta näytteestä noroviruksen lisäksi myös muita gastroenteriittiä aiheuttavia viruksia tai bakteereita.

### 5.1.2 Xpert®Norovirus

Cepheidin Xpert®Norovirus on tällä hetkellä ainut markkinoilla oleva FDA-hyväksynnän saanut pelkästään noroviruksen diagnostiikkaan tarkoitettu molekulaarinen testi. Se suoritetaan automaattisella GeneXpert RT-PCR-laitteistoilla (Kuva 7). Näytteen esikäsittelyä lukuun ottamatta laite suorittaa koko näytteen analysoinnin. Näytteen käsittelyyn ulostenäytteenotto, jonka jälkeen näyte laitetaan Sample Reagent -pulloon, jota vorteksoidaan 10 sekunnin ajan. Vorteksoinnin jälkeen näyte pipetoidaan testikasetin näytekuoppaan ja patruuna ladataan GeneXpert-laitteeseen. Testikasetti sisältää kaikki RT-PCR: ään tarvittavat reagenssit ja materiaalit lukuun ottamatta Sample-reagenssia. [33.]



Kuva 7. GeneXpert testikasetti ja 2-moduulinen laite. [34]

Xpert®Norovirus-testin menetelmänä on reaaliaikainen RT-PCR. Detektio perustuu fluoreskoivaan kohdespesifiseen hybridisaatioon. Nukleiinihappojen eristäminen, monistus ja tunnistus tapahtuvat itsenäisesti ja automatisoidusti testikasetilla GeneXpert-laitteessa. Testin kokonaiskesto on 90 minuuttia. Testi tunnistaa, onko ulostenäytteessä

norovirusen genoryhmää GI tai GII. [33.] Suomessa Xpert®Norovirus on käytössä ainakin Itä-Suomen laboratoriokeskuksessa ja Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. [48; 51.]

Gonzales tutkimusryhmineen suoritti laajan evaluoinnin Xpert®Norovirus-testistä vuonna 2014—2015 tutkimalla yhteensä 1 403 ulostenäytettä. Näytteistä 914 kpl kerättiin kevään 2014 aikana ja tutkittiin tuoreeltaan, loput 489 näytettä oli kerätty vuosien 2008—2014 aikana ja pakastettu. Näytemateriaalista 64,6 % oli kerätty sairaalahoidossa olevilta potilailta. Tutkimusaineistoon kuului sekä miehiä että naisia kaikista ikäluokista. Vertailumethodina käytettiin CDC:llä suoritettua vastaavaa RT-PCR:ää. Tuloksena PPA (positive percent agreement) ja NPA (negative percent agreement) GI:lle oli 98,3 % ja 98,1 % ja vastaavasti GII:lle 99,4 % ja 98,2 %. [35.] PPA ja NPA ovat diagnostisen testin suorituskykyä kuvaavia arvoja. Korkeat prosenttilukemat kertovat, että Xpert®Norovirus on tämän tutkimuksen perusteella hyvä suorituskyvyltään.

## 5.2 Multiplex PCR-paneelit

PCR-paneeleja käytetään suolistotulehdusten aiheuttajien detektoimiseen yhdellä testillä suoraan ulostenäytteestä, eli samaa näytettä ei tarvitse testata useita kertoja infektion aiheuttajan löytämiseksi. Erityisesti immuunipuutteiset ja kriittisesti sairaat hyötyvät siitä, että taudinaiheuttaja saadaan nopeasti diagnosoitua. Kaupallisesti saatavilla olevia multiplex paneeleita, jotka ovat saaneet FDA-hyväksynnän, ovat BioFire Diagnosticin FilmArray GI panel, Luminexin xTag GI pathogen panel sekä Nanosphenen Verigene Enteric Pathogen test. Liitteessä 6 on vertailutaulukko, johon on kirjattu paneelien ominaisuuksia. [36.]

### 5.2.1 xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panel

Luminexin xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panel on ensimmäinen FDA-hyväksynnän saanut multiplex-testi suolistotulehdusta aiheuttavien patogeenien detekointiin ja identifiointiin. [36] Testi tunnistaa 14 eri patogeenia ulostenäytteestä (Taulukko 2). Tunnistus tapahtuu mikrohelmien avulla, jotka hybridisoituvat tiettyyn mikroorganismin nukleiinihapposekvenssiin tai kontrolliin. Helmikannoille muodostuu fluoresenssisignaali, jonka perusteella patogeenin läsnäolo näytteessä määritetään. [37.]

Taulukko 2. xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panelin tunnistamat patogeenit

Bakteeri	Virus	<i>E. coli</i> / <i>Shigella</i>	Parasiitit
- <i>Campylobacter</i> ( <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> / <i>C. lari</i> ) - <i>Clostridium difficile</i> ( <i>C. difficile</i> ) toxin A/B - <i>Salmonella</i>	-Norovirus GI/GII -Rotavirus A	- <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) O157 -Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC) lt/st -Shiga-like toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) - <i>Shigella</i> ( <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. dysenteriae</i> )	- <i>Cryptosporidium</i> ( <i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> ) - <i>Giardia lamblia</i>

Testin kokonaiskesto on noin viisi tuntia. Aika sisältää näytteen esikäsitteilyn, nukleiinihappojen eristyksen, multiplex PCR-ajon, nukleiinihappojen sitoutumisen mikrohelmeen sekä data-analyysin [36]. xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panelissa RNA:n eristys täytyy tehdä erikseen ennen PCR:ää, joten testin suorittamisen kokonaiskesto on huomattavasti suurempi kuin FilmArray- tai Verigene-paneeleilla. Testin suorittamiseen tarvitsee kolme erillistä laitetta (Kuva 8). On kuitenkin huomattava, että xTAG-paneeli suoritetaan 96 kuoppalevyllä, joten näytteiden määrä voidaan pitää hyvinkin suurena. Detektointiin käytetään pöytäkokoista Luminex® 100/200™-laitetta.



Kuva 8. xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panel-testin suorittaminen vaihe vaiheelta. Testin suorittamisen kokonaiskesto on noin viisi tuntia. 1. Nukleiinihappojen eristäminen. 2. Multiplex-PCR 3. Hybridisaatio 4. Detektointi. [48]

xTAG®Gastrointestinal Pathogen Panel on eniten tutkittu multiplex-paneeli. Khare tutkimusryhmineen teki vertailevan arviointitutkimuksen xTAG-paneelistä ja FilmArray-paneelistä vuonna 2014. Tutkimuksessa tutkittiin 500 ulostenäytettä. Spesifisyydeksi noroviruselle määritettiin 90,8 % ja herkkyudeksi 100 %. [38.]

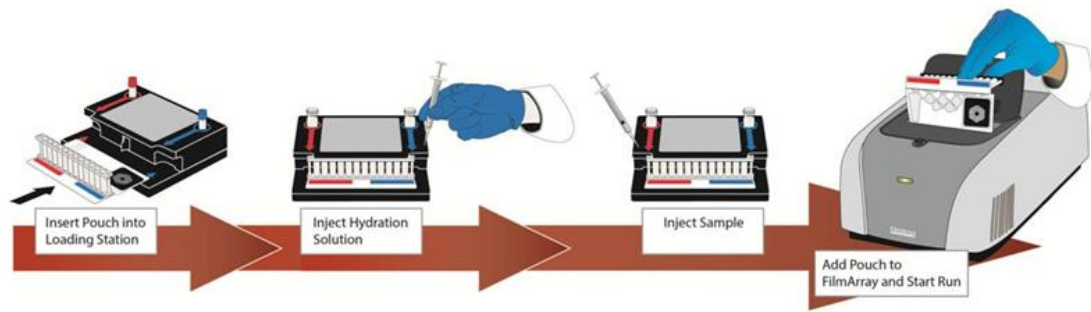
### 5.2.2 FilmArray Gastrointestinal panel

Film Array Gastrointestinal panel on nukleiinihappopohjainen kvalitatiiviseen analyysiin perustuva multiplex paneeli. Paneeli pystyy samanaikaisesti havaitsemaan ja tunnistamaan nukleiinihappoja useasta eri bakteerista, viruksesta ja loisesta. Näytteenä käytetään ulostetta Cary-Blair siirtomediassa. Paneeli sisältää Noro 1- ja Noro 2-menetelmät, jotka yhdessä targetoivat noroviruksen genoryhmiä GI ja GII. Tulos ei kuitenkaan kerro, kumpi genoryhmä GI vai GII on havaittu. [39]. Gastrointestinal-paneeli detektoi ulostenäytteestä 22 eri analyyttia; 11 bakteeria, 2 bakteerimyrkkyä, 5 virusta ja 4 parasiittia [40], jotka ovat taulukoituna alla taulukossa 3.

Taulukko 3. Film Array Gastrointestinal paneelin tunnistamat patogeenit

Bakteeri	Virus	<i>E.coli</i> / <i>Shigella</i>	Parasiitit
- <i>Campylobacter</i> ( <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> / <i>C. upsaliensis</i> )	-Adenovirus F 40/41	- <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> (EPEC)	- <i>Cryptosporidium cayetanensis</i>
- <i>Clostridium difficile</i> ( <i>C. difficile</i> ) toxin A/B	-Astrovirus	- <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> (ETEC) <i>lt/st</i>	- <i>Entamoeba histolytica</i>
- <i>Plesiomonas shigelloides</i>	-Norovirus GI/GII	- <i>Shiga-like toxin-producing Escherichia coli</i> (STEC)	- <i>Giardia lamblia</i>
- <i>Salmonella</i>	-Rotavirus A	- <i>Shigella/ Enteroinvasive Escherichia coli</i> (EIEC)	
- <i>Vibrio</i> ( <i>V. parahaemolyticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. cholerae</i> )	-Sapovirus (Genoryhmät I, II, IV, and V)		
- <i>Yersinia enterocolitica</i>			

Gastrointestinal paneeli on FDA-hyväksytty vuonna 2014. Testi ja analyysi suoritetaan FilmArray-analysaattorissa. FilmArray prosessoi vain yhden näytteen kerrallaan. Prosessiin käytetään kertakäyttöistä muovista patruunaa, johon näyte lisätään. [36.] Patruunan jäykkä muoviosa sisältää testiin tarvittavat reagenssit ja joustava muoviosa on jaettu osioihin, jossa testin eri reaktiot toteutetaan. Testin käyttäjä lataa näytteen patruunaan, asettaa sen FilmArray-laitteeseen ja käynnistää ajon (Kuva 9). Kaikki muut vaiheet ovat automatisoituja. [40.] Analysaattori käy läpi nukleiinihappojen eristyksen, nested-PCR-ajon eli sisäkkäisen polymeerasiketjureaktion ja sulamiskäyräanalyysin. [36.]



Kuva 9. Film Array Gastrointestinal testin suorittaminen vaihe vaiheelta. [40]

### 5.2.3 Verigene Enteric Pathogens Nuclein Acid test

Verigenen Enteric Pathogens Nuclein Acid test perustuu RT-PCR: ään ja hybridisaatioon, jolla detektoidaan tiettyjä ruoansulatuskanavan patogeeniin nukleiinihappopogeenisekvenssejä kultananopartikkelikoettimien avulla. Testi suoritetaan automatisoidulla Nanosphere Verigene -laitteistolla (Kuva 10), joka koostuu pöytäkokoisista Verigene Reader -ohjauskeskuksesta sekä Verigene Processor -työasemasta. [41.]



Kuva 10. Verigene Reader -ohjauskeskus, 2-paikkainen Verigene Processor -työasema ja testikasetteja. [55]

Näyttemateriaalina käytetään pehmeää tai nestemäistä ulostetta, joka ladataan työasemaan testikasetissa. Laitteisto suorittaa nukleiinihappojen eristyksen, hybridisaati-

odetektion sekä virusspesifisten nukleiinihappojen tunnistamisen kultananopartikeliteknologialla. Testin avulla voidaan detektoida ulostenäytteestä yhdeksän eri patogeena (Taulukko 4).

Taulukko 4. Enteric Pathogens Nuclein Acid paneeli tunnistamat patogeenit

Bakteeri	Bakteerimyrkky	Virus
- <i>Campylobacter</i> - <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i> - <i>Vibrio</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i>	-Shiga Toxin 1 (stx1) -Shiga Toxin 2 (stx2)	-Norovirus -Rotavirus

Testin suorittaminen kestää yhteensä noin kaksi tuntia. Laitteisto on saatavilla 1-32: lla moduulilla, jolloin useamman kuin yhden näytteen ajaminen kerrallaan on mahdollista.

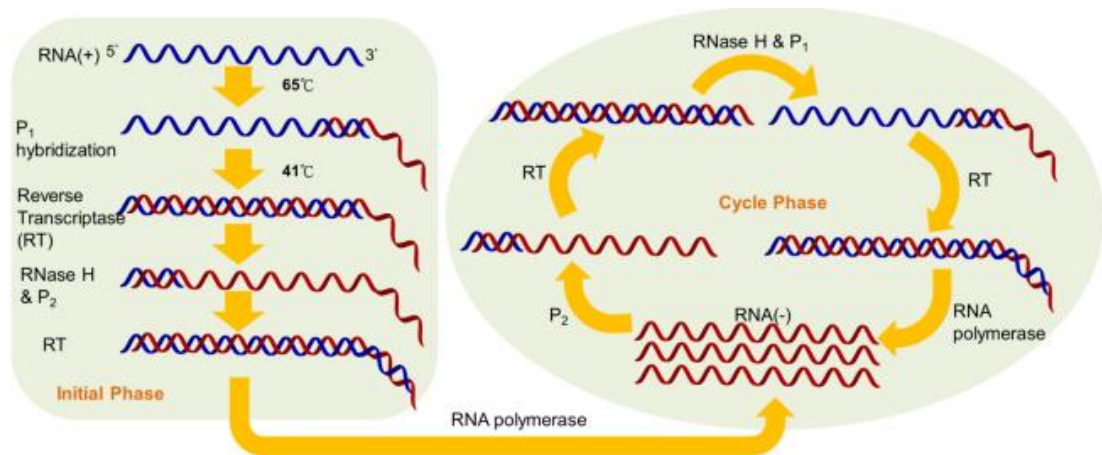
#### 5.2.4 Seeplex® Diarrhea ACE Detection: V-assay

Seegenen Seeplex® Diarrhea ACE Detection: V-assay on multiplex paneeli, joka tunnistaa viisi ripulia aiheuttavaa patogeena. Menetelmän avulla tunnistetaan adenovirus, rotavirus A, noroviruksen genoryhmät GI ja GII sekä astrovirus ulostenäytteestä. Testin suorittaminen koostuu seuraavista vaiheista: näytteen käsittely, nukleiinihappojen eristäminen, multiplex PCR-ajo, automatisoitu nukleiinihappojen tunnistaminen sekä data-analyysi.

Testin suorittaminen vaatii koko laitteiston hankkimista, koska jokainen vaihe tehdään eri instrumentilla. Koko laitteisto on saatavilla testin valmistajalta, ja se soveltuu käytettäväksi myös muille reaaliaikaisille PCR-määryksille. Menetelmän epäsuotuisina puolina voidaan pitää testin suorittamisen pitkää kokonaiskestoja (yli 10 tuntia) ja monivaiheisuutta. Testi mahdollistaa kuitenkin suurten näytemäärien analysoinnin. Seegenen Diarrhea ACE Detection-tuoteperheeseen kuuluu V-assayn lisäksi myös muita suolistutulehdusta aiheuttavia patogeeneja tunnistavia paneeleita, joita voi käyttää yhdessä tai erikseen V-assayn kanssa. [1; 42.]

### 5.3 Isotermaalinen nukleinihappojen monistus

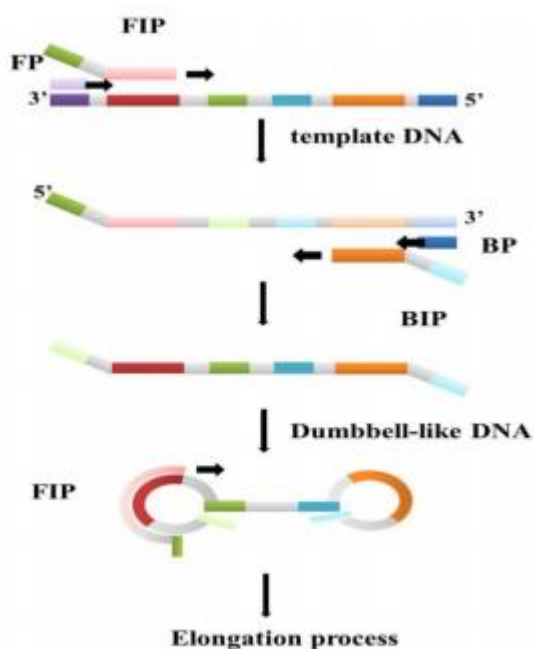
Noroviruksen tunnistukseen on kehitetty isotermaaliseen monistamiseen perustuvia menetelmiä. Erona perinteiseen PCR: ään DNA: n monistus tapahtuu vakioämpötilassa eikä termosykliselle laitteelle ole tarvetta. Isotermaaliset monistusmenetelmät voidaan jakaa useampiin erilaisiin tekniikoihin. Noroviruksen detektointiin löytyy tällä hetkellä ainakin RT-LAMP (Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification) -menetelmään sekä NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)-menetelmään perustuvia testejä. NASBA –menetelmä perustuu nukleinihapposekvenssien monistamiseen (Kuva 11), ja sitä käytetään tyypillisesti tunnistamaan bakteerien tai virusten RNA kliinisissä näytteissä. Norovirukselle on markkinnoilla japanilainen Kainos Laboratoriesin Swiftgene Norovirus GI/GII. [6.]



Kuva 11. Kaavakuva NASBA-tekniikasta [53]



RT-LAMP perustuu 4—6 alukkeen käyttöön, jotka tunnistavat 6—8 eri aluetta kohde-RNA:sta. Alukeparit muodostavat reaktion ensimmäisessä vaiheessa silmukkarakenteen, joka toimii templaattina seuraavassa vaiheessa (Kuva 12). [43.] Eiken Chemicalin Loopamp®Norovirus kitit genoryhmien GI ja GII detektointiin ovat RT-LAMP-testejä. Kitit ovat CE-merkittyjä ja sisältävät tarvikkeet 48 testiin. Testi on nopea suorittaa. Näyteseos, alukkeet ja DNA-polymeraasi inkuboidaan samassa putkessa. Testiin tarvittava välineistö on pieni, tarvitaan vain lämpöblokki sekä mikrosentrifugi. Testi on kokonaiskestoltaan noin 1,5 h. Tulos todetaan visuaalisesti fluoresenssin aiheuttamana värinmuutoksena tai turbidometrillä sameusmittauksella. [44.]



Kuva 12. Kaavakuva LAMP-tekniikasta [53]

Alustavat tutkimukset isotermaaliseen vahvistukseen perustuvasta diagnostiikasta ovat positiivisia. Kehitetyt testit ovat olleet nopeita ja osoittautuneet erittäin herkiksi. PCR:ään verrattuna isotermaaliseen nukleinihappojen monistukseen tarvittava laitteisto on yksinkertaista ja edullista, koska lämpötiloja ei tarvitse vaihdella nopeasti. [6.] Tämän vuoksi isotermaaliset menetelmät voisivat olla käyttökelpoisia esimerkiksi kehitysmaissa tai vaikeissa olosuhteissa kuten erämaissa ja aavikoilla. Lisää tutkimusta kuitenkin tarvitaan.

## 6 Johtopäätökset

Insinööriyön tarkoituksena oli vertailla markkinoilla olevia norovirustestejä keskenään. Selvitystyön perusteella detektiomenetelmät voisi jakaa karkeasti kahteen tapaan, antigeenin osoitukseen ja nukleinihapon osoitukseen. Antigeenin osoitustestejä on saatavilla entsyymi-immunologiseen menetelmään (EIA) sekä lateraaliseen virtaukseen perustuvia immunokromatografisia testejä (LFIA). Nukleinihappopohjaiset testit ovat pääasiassa geeninmonistukseen (PCR) perustuvia. Kaupallisesti saatavilla on useita PCR-kittejä ja myös valmiita kokonaisratkaisuja laitteistoinen.

Multiplex-PCR-paneelit tunnistavat samasta näytteestä useita eri patogeeneja. Paneelien merkittävin etu onkin, että yhdellä ajolla saadaan monta mahdollista taudinaiheuttajaa tutkittua ja lisäksi mahdolliset yhteisinfektiot selvitettyä. Paneeleita on saatavilla erilaisia, osassa nukleinihappojen eristys täytyy tehdä erikseen, osassa eristys tapahtuu automaattisesti laitteessa. Nopein paneeli on FilmArray Gastrointestinal Panel, jonka kokonaiskesto on vain noin yhden tunnin. FilmArraylla voi kuitenkin ajaa vain yhden näytteen kerrallaan. xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel soveltuu paremmin käyttöön, jos halutaan ajaa useampi näyte kerrallaan, koska se suoritetaan 96-kuoppalevyllä.

Xpert Norovirus on tällä hetkellä ainut markkinoilla oleva FDA-hyväksynnän saanut multiplex norovirustesti, joka suoritetaan automatisoidulla laiteratkaisulla. Näyte ladataan testi-patruunaan ja GeneXpert-laitteisto suorittaa kaiken muun. Testin suorittaminen kestää yhteensä 90 min, joten se lukeutuu nopeimpiin PCR-menetelmiin. Xpert Norovirus on hyvä esimerkki helposti toteutettavasta ja nopeasta PCR-testistä. Aikaisemmin EIA-testit ovat olleet nukleinihappojen tunnistukseen perustuviin testeihin verrattuna helpompia toteuttaa ja niiden kokonaiskesto on ollut lyhyempi. EIA-testit soveltuvat käytettäviksi laboratorioissa, joissa ei ole molekyyliagnostista laitteistoa, koska PCR on herkästi kontaminoituva reaktio, jonka tilavaatimukset ovat tarkempia. Vieritestaukseen norovirustesteistä soveltuvat parhaiten LFIA-testit, koska niiden suorittaminen kestää vain n. 20 minuuttia eikä vaadi erityisiä tilavaatimuksia. Testit ovat nopeita ja helppokäyttöisiä, mutta herkkyyksissä on paljon vaihtelua.

Tulevaisuudessa reaaliaikainen RT-PCR ja muut nukleinihappojen tunnistukseen perustuvat menetelmät mahdollisesti korvaavat EIA-testit kokonaan noroviruksen tunnistuksessa, koska antigeenin osoitustestien herkkyys on huomattavasti matalampi. PCR-menetelmistä olisi potentiaalista kehittää entistä nopeampia vieritestaukseen soveltuvia

näytteestä tulokseen testejä, jotka detektoivat noroviruksen RNA: ta. Jatkossa olisikin hyvä keskittää kehitystyötä nukleiinihappopohjaisiin testeihin, koska ne ovat osoittaneet hyvää herkkyyttä ja spesifisyyttä. Erityisesti lisää tutkimusta kaivattaisiin isotermaalisista menetelmistä, jotka ovat alustavasti osoittaneet hyvää herkkyyttä ja nopeaa toteutusta.

Hyvän diagnostisen testin ominaisuuksiin kuuluu kustannustehokkuus. Testien ja laitteiden tarkkoja hintatietoja ei ole ollut tätä tutkimusta tehtävissä saatavissa. Kokonaisen laitteiston tai uuden laitteen hankkiminen laboratorioon on kertainvestointina kallista, mutta pidemmän päälle saattaa olla kannattavaa, jos näytteitä tulee paljon tutkittavaksi. On huomioitava myös, että esimerkiksi useimpiin norovirusdiagnostiikan PCR-instrumenteista tulee erikseen hankkia kertakäyttöisiä testikasetteja tai -patruunoita, jolloin niistä tulee lisäkustannuksia ja laboratorio on tiettyyn valmistajaan sidoksissa tai laitteiston käyttö rajoittuu vain tiettyyn tutkimukseen. PCR-kitit ja EIA- ja LFIA-testit ovat edullisempia hankkia harvemmin tehtävään tutkimukseen, mutta LFIA-testejä lukuun ottamatta vaativat laboratoriolta hyvää varustetasoa.

## Lähteet

- 1 Higgins Rachel R., Beniprashad Melissa, Cardona Mark, Masney Steven, Low Donald E., Gubbay Jonathan. 2011. Evaluation and Verification of the Seeplex Diarrhea-V ACE Assay for Simultaneous Detection of Adenovirus, Rotavirus, and Norovirus Genogroups I and II in Clinical Stool Specimens. *Journal of clinical microbiology*.doi:10.1128/JCM.00599-11.
- 2 Barclay L., Park G. E., Vega E., Hall A., Parashar U, Vinje J., Lopman B. 2014. Infection control for norovirus. Review. Centers for Disease Control and Prevention. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:731-740.
- 3 Conly JM, Johnston BL. 2003. Norwalk virus – Off and running. *Can J Infect Dis*. 2003 Jan-Feb; 14(1): 11–13.
- 4 THL\_1 = Norovirus. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 2015. Verkkodokumentti. <<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/norovirus>> Luettu 28.12.2015.
- 5 Anttila, Veli-Jukka, Nieminen, Tea & Maunula, Leena. 2010. Norovirusten aiheuttamat gastroenteriitit laitosten ongelmana. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 126(13):1575-81.
- 6 Robilotti Elizabeth, Deresinski Stan & Pinsky BA. 2015. Norovirus. *Clin Microbiol Rev* 28:134–164. doi:10.1128/CMR.00075-14.
- 7 Norovirus. 2015. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. Verkkodokumentti. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden+riski-+ja+vaaratekijat/mikrobiologiset+vaaratekijat/ruokamyrkytyksia+aiheuttavia+virusia/norovirus/>> Luettu 31.1.2016.
- 8 Sivula, Eeva-Kaarina. 2013. Suolistovirusten esiintyminen varhaislapsuudessa. Verkkodokumentti. <<http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/56987/Suolistovirusten+esiintyminen+varhaislapsuudessa.pdf;jsessionid=D6C994B35F63C48EEFEFF8D2F99B74C9?sequence=1>> Luettu 28.12.2015.
- 9 THL\_2 = Noroviruksen esiintyvyys 2014. Terveiden ja hyvinvoinninlaitos. 2015. Verkkodokumentti. <<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyys-2014/noroviruksen-esiintyvyys-2014>> Luettu 11.1.2016.
- 10 Valve, Oona. 2009. Norovirusgenotyypin GII-4 aiheuttaman gastroenteriitin taudinkuva ja vakavuus. Syventävien opintojen kirjallinen työ. Tampereen yliopisto. Verkkodokumentti. <<https://tampub.uta.fi/bitstream/handle/10024/76710/gradu05533.pdf?sequence=>> Luettu 28.12.2015.

- 11 Lumio, Jukka. 2012. Norovirus. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00738&p\\_haku=noro](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00738&p_haku=noro)> Luettu 28.12.2015.
- 12 Kauppila, Jaana. 2015. Ulostenäytteenotto mikrobiologian tutkimuksiin. Potilasohje. Verkkodokumentti. <[http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf\\_uploads/ulostenayte.pdf](http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/ulostenayte.pdf)> Luettu 4.1.2016.
- 13 Morillo Simone, Luchs Adriana, Cilli Audrey, Ribeiro Cibele, Calux Samira, Carmona Rita, Timenetsky Maria. 2011. Norovirus 3rd Generation kit: An improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *Journal of Virological Methods* 173 (2011) 13–16.
- 14 Patent Search. European Patent Office. Verkkodokumentti. <[http://worldwide.espacenet.com/searchResults?ST=singleline&locale=en\\_EP&submitted=true&DB=worldwide.espacenet.com&query=norovirus+detection](http://worldwide.espacenet.com/searchResults?ST=singleline&locale=en_EP&submitted=true&DB=worldwide.espacenet.com&query=norovirus+detection)> Luettu 3.2.2016.
- 15 Ridascreen® Norovirus 3rd Generation, Enzyme immunoassay (EIA) for the detection of Norovirus in human fecal samples. R-biopharm. Käyttöohjeet. Verkkodokumentti. <[http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridascreen-norovirus-3rdgeneration-2-17960/C1401US\\_RIDASCREEN-Package-Insert\\_2-23-2011.pdf](http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridascreen-norovirus-3rdgeneration-2-17960/C1401US_RIDASCREEN-Package-Insert_2-23-2011.pdf)> Luettu 20.1.2016
- 16 Vainionpää Raija, Hedman Klaus & Hyypiä Timo. 2000. Mitä lääkärin on hyvä tietää virusdiagnostiikasta. *Duodecim* 2000;116. Verkkodokumentti. <<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo91263.pdf>> Luettu 20.1.2016.
- 17 Gan Stephanie D.& Patel Kruti R. 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* (2013) 133, e12. doi:10.1038/jid.2013.287.
- 18 IDEIA Norovirus. 2013. Instructions. Verkkodokumentti. <<http://www.thermoscientific.com/content/dam/dfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Instructions%20For%20Use/IDEIA/Norovirus/X7844.pdf>> Luettu 23.1.2016.
- 19 ELISA-testi. Kuva. Verkkodokumentti. <<http://img2.tfd.com/mk/A/X2604-A-69.png>> Luettu 11.2.2016.
- 20 FDA\_Ridascreen. . U.S. Food and Drug Administration.510(k) Decision summary. Verkkodokumentti. <[http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K093295.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K093295.pdf)> Luettu 4.1.2016.
- 21 Costantini Veronica, Grenz LaDonna, Fritzinger Angela, Lewis David, Biggs Christianne. 2010. Diagnostic Accuracy and Analytical Sensitivity of IDEIA Norovirus Assay for Routine Screening of Human Norovirus. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Aug. 2010, p. 2770–2778 doi:10.1128/JCM.00654-10.

- 22 Lateral flow tests: how they work. Diagnostic technologies. 2016. Verkkodokumentti. <<http://sites.path.org/dx/rapid-dx/technologies/lateral-flow/how-it-works-2/>> Luettu 23.1.2016.
- 23 Lateral flow Immuno Assay. Kuva. Verkkodokumentti. <<http://www.chimicabio-analitica.unito.it/immunoassay.htm>> Luettu 31.1.2016.
- 24 Vyas K, Atkinson C, Clark D.A. , Irish D. 2015. Comparison of five commercially available immunochromatographic tests for the detection of norovirus in faecal specimens. *Journal of Hospital Infection* 91 (2015) 176-178.
- 25 Battaglioli Gino, Nazarian Elizabet, Lamsola Daryl, Musser Kimberlee, Georgea Kirsten. 2012. Evaluation of the RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *Journal of Clinical Virology* 53 (2012) 262-264.
- 26 Ridaquick Norovirus. R-Biopharm. Käyttöohjeet. Verkkodokumentti. <[http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridaquick-norovirus-2-15404/N1402\\_RIDAQUICK-Norovirus-12-10-26\\_GB.pdf](http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridaquick-norovirus-2-15404/N1402_RIDAQUICK-Norovirus-12-10-26_GB.pdf)> Luettu 6.1.2016
- 27 Balay-Ambert Katia, Pothier Pierre. 2013. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *Journal of Clinical Virology* 56 (2013) 194–198.
- 28 ImmunoCard STAT!®Norovirus. 2015. Product Specification. Verkkodokumentti. <<http://www.meridianbioscience.eu/immuno-em-card-em-stat-reg-norovirus.html>> Luettu 23.1.2016.
- 29 SDBioline Norovirus.Rapid Diagnostic Test. Verkkodokumentti. <[http://www.standardia.com/en/home/product/Rapid\\_Diagnostic\\_Test/Norovirus.html](http://www.standardia.com/en/home/product/Rapid_Diagnostic_Test/Norovirus.html)> Luettu 23.1.2016.
- 30 Noroscreen. 2014. Microgen Bioproducts. Esite. Verkkodokumentti. <<http://www.microgenbioproducts.com/Noroscreen/Noro%2014.11.11.pdf>> Luettu 23.1.2016.
- 31 Norotop+®. Product Details. All.Diag. Verkkodokumentti. <<http://www.all-diag.com/vus/produits/tdr/virologie/norotopplus/index.html>> Luettu 26.1.2016.
- 32 CDC = Diagnostics methods. 2014. Centers for Disease Control and Prevention. Verkkodokumentti. <<http://www.cdc.gov/norovirus/lab-testing/diagnostic.html>> Luettu 20.1.2016.
- 33 FDA\_ Xpert Norovirus Assay. U.S. Food and Drug Administration.510(k) Decision summary. Verkkodokumentti. <[https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf14/K142501.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/K142501.pdf)> Luettu 30.1.2016.

- 34 Xpert® Norovirus. Esite. Verkkodokumentti. <[http://www.cepheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-files/f5e5a03863c93410f24f504b8aafa955-Xpert-Norovirus-Brochure-EU-3013-04.pdf](http://www.cepheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/f5e5a03863c93410f24f504b8aafa955-Xpert-Norovirus-Brochure-EU-3013-04.pdf)> Luettu 30.1.2016.
- 35 Gonzalez MD, Langley LC, Buchan BW, Faron ML, Maier M, Templeton K, Walker K, Popowitch EB, Miller MB, Rao A, Liebert UG, Ledebouer NA, Vinjé J, Burnham C-AD. 2016. Multicenter evaluation of the Xpert Norovirus assay for detection of norovirus genogroups I and II in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 54:142–147. doi:10.1128/JCM.02361-15.
- 36 Binnicker Matthew. 2015. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness. Review. *J Clin Microbiol* 53:3723–3728. doi:10.1128/JCM.02103-15.
- 37 FDA\_xTAGGPP. U.S. Food and Drug Administration.510(k) Decision summary. Verkkodokumentti. <[http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K121454.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K121454.pdf)> Luettu 27.1.2016.
- 38 Khare Reeti, Espy Mark, Cebelinski Elizabeth, Boxrud David, Sloan Lynne, Cunningham Scott, Pritt Bobbi, Patel Robin, Binnickera Matthew.2014. Comparative Evaluation of hkl3368
- 39 FDA\_Film Array. U.S. Food and Drug Administration.510(k) Decision summary. Verkkodokumentti. <[http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/k140407.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/k140407.pdf)> Luettu 6.1.2016.
- 40 FilmArray® Gastrointestinal (GI) Panel. 2015. Instructions Booklet. Biofire Diagnostics.
- 41 FDA\_Verigene.U.S. Food and Drug Administration.510(k) Decision summary. Verkkodokumentti. <[https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf14/K142033.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/K142033.pdf)> Luettu 6.1.2016.
- 42 Diarrhea ACE Detection. Seegene. Verkkodokumentti. <[http://www.seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/seeplex\\_DIARRHEA.php](http://www.seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/seeplex_DIARRHEA.php)> Luettu 30.1.2016.
- 43 Isothermal Amplification. New England Biolabs. Verkkodokumentti. <<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr/isothermal-amplification>> Luettu 30.1.2016.
- 44 Loopamp® Norovirus. Eiken Chemical Co. Esite. Verkkodokumentti. <<http://www.mastgrp.com/Eiken/Glossies/Norovirus%204PP.pdf> > Luettu 5.1.2016.
- 45 RoboGene®NorovirusRNA Detection Kit 2.0.2016 Manual. Analytikjena.

- 46 Deng Jiankai, Luo Xin, Wang Ruilian, Jiang Lingxiao, Ding Xixia, Hao Wei, Peng Yongzheng, Jiang Changhong, Yu Nan, Che Xiaoyan. 2014. A comparison of Luminex xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG GPP) and routine tests for the detection of enteropathogens circulating in Southern China.
- 47 Enteric Pathogen Panels. Kuva. Verkkodokumentti. < <http://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1105184/000119312514107429/g696471696471z0047.jpg>> Luettu 31.1.2016.
- 48 Saha, Kerttu. 2016. Sairaalamikrobiologi. Etelä-Pohjanmaan Sairaanhoidopiiri. Sähköpostihaastattelu. 8.2.2016.
- 49 Kauppila, Jaana. 2016. Kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri. NordLab Oulu. Sähköpostihaastattelu. 27.1.2016.
- 50 Al-Hello, Haider. 2016. Erikoistutkija. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos. Sähköpostihaastattelu. 9.2.2016.
- 51 Oksaharju, Anna. 2016. Erikoistuva sairaalamikrobiologi. Itä-Suomen Laboratoriokeskus. Sähköpostihaastattelu. 5.2.2016.
- 52 Nopeasti muuntuva norovirus edellyttää jatkuvaa analyysimenetelmien kehittämistä. 2016. THL. Infektiouutiset. Verkkodokumentti. < [https://blogi.thl.fi/web/infektiouutiset/etusivu?p\\_p\\_id=33&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=nor-mal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_564233524\\_tag=norovirus](https://blogi.thl.fi/web/infektiouutiset/etusivu?p_p_id=33&p_p_lifecycle=0&p_p_state=nor-mal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_564233524_tag=norovirus)> Luettu 31.1.2016
- 53 Chang Chia-Chen, Chen Chien-Cheng, Wei Shih-Chung, Lu Hui-Hsin, Lian Yang-Hung, Chii-Wann Lin. 2012. Diagnostic Devices for Isothermal Nucleic Acid Amplification. Sensors 2012, 12, 8319-8337; doi:10.3390/s120608319.
- 54 Selvitys lupaa säilyttää terveystieteiden palvelut lähellä. 2013. Kuva. Verkkodokumentti. < [http://yle.fi/uutiset/selvitys\\_lupaa\\_sailyttaa\\_terveyspalvelut\\_lahella/6544027](http://yle.fi/uutiset/selvitys_lupaa_sailyttaa_terveyspalvelut_lahella/6544027)> Luettu 22.2.2016.
- 55 Verigene technology. 2016. Kuva. Verkkodokumentti. < <http://www.nanosphere.us/technology>> Luettu 22.2.2016.
- 56 Sairaanhoidopiirien ja erityisvastuualueiden (erva) asukasluvut. 2015. Verkkodokumentti. < <http://www.kunnat.net/fi/kunnat/sairaanhoidopiirit/asukasluvut/Sivut/default.aspx>> Luettu 22.2.2016.
- 57 Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta. 2016. Norovirus. Verkkodokumentti. < [https://sampo.thl.fi/sampo\\_prod/cgi-bin/cognos.cgi?b\\_action=powerPlayService&ui.action=run&TARGET=%2Fcontent%2Ffolder%5B%40name%3D%27amor\\_prod%27%5D%2Ffolder%5B%40name%3D%27tr%27%5D%2Fpackage%5B%40name%3D%27amor\\_tr\\_shp\\_1266\\_fi\\_prod%27%5D](https://sampo.thl.fi/sampo_prod/cgi-bin/cognos.cgi?b_action=powerPlayService&ui.action=run&TARGET=%2Fcontent%2Ffolder%5B%40name%3D%27amor_prod%27%5D%2Ffolder%5B%40name%3D%27tr%27%5D%2Fpackage%5B%40name%3D%27amor_tr_shp_1266_fi_prod%27%5D)> Luettu 23.2.2016.



**Patentit noroviruksen detektointiin**

Hakusanat "norovirus" ja "detection"

<b>Julkaisunumero</b>	<b>Julkaisupäivä</b>	<b>Nimitys</b>
<u>CN104946791 (A)</u>	2015-09-30	Preparation and application of gene chip capable of detecting seven diarrhea viruses
<u>CN104726618 (A)</u>	2015-06-24	Norovirus detection kit and application thereof
<u>CN104651538 (A)</u>	2015-05-27	Primer group and kit for simultaneously detecting four diarrhea viruses
<u>KR20150044109 (A)</u>	2015-04-24	Primers for detecting Norovirus and RT-PCR kit for detecting Norovirus using same
<u>KR20150043282 (A); KR101540444 (B1)</u>	2015-04-22	Virus Probe for Concentration and Detection of Virus
<u>KR101501414 (B1)</u>	2015-03-17	LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION REACTION (LAMP) FOR DETECTION OF NOROVIRUS AND THEIR PRIMER SET
<u>CN104502597 (A)</u>	2015-04-08	Norovirus immunochromatographic strip based on low-noise laser-type fluorescence marker
<u>KR20140140307 (A)</u>	2014-12-09	RAPID METHODS FOR DETECTION OF NOROVIRUS IN FOOD USING A MAGNETIC BEAD AND QUANTUM DOT
<u>CN104313187 (A)</u>	2015-01-28	G1 genome type norovirus reverse transcription roll loop amplification method
<u>KR20140110342 (A)</u>	2014-09-17	PRIMER AND PROBES FOR THE DETECTION OF NOROVIRUS, AND DETECTION KITS AND METHODS THEREOF
<u>US2014315750 (A1)</u>	2014-10-23	SELECTIVE DETECTION OF NOROVIRUS
<u>WO2014165240 (A1)</u>	2014-10-09	SYNBODIES FOR DETECTION OF HUMAN NOROVIRUS
<u>WO2014153507 (A1)</u>	2014-09-25	IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PEPTIDE AFFINITY REAGENT FOR THE DETECTION OF NOROVIRUSES IN SAMPLES
<u>CN203759021 (U)</u>	2014-08-06	Norovirus detection kit
<u>KR101377824 (B1)</u>	2014-04-01	PRIMERS FOR WATERBORNE VIRUS DETECTION AND KIT COMPRISING THE PRIMERS
<u>KR20140049131 (A); KR101441950 (B1)</u>	2014-04-25	NOROVIRUS DETECTION METHOD, AND THE PREPARING METHOD OF RECOMBINANT VECTOR AND RECOMBINANT PROTEIN FOR THE DETECTION
<u>CN103642943 (A)</u>	2014-03-19	Detection primer group, detection method and kit for loop-mediated isothermal amplification of G1 type Norovirus
<u>CN103525947 (A)</u>	2014-01-22	NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) detection primer, probe and detection method for GII type norovirus in sea foods

<u>KR20130128348 (A)</u>	2013-11-26	METHOD FOR SEPARATION AND DETECTION OF NON-ENVELOPED VIRUS AND METHOD AND DEVICE FOR SEPARATION AND DETECTION OF NON-ENVELOPED VIRUS AND BACTERIA
<u>CN103397105 (A); CN103397105 (B)</u>	2013-11-20	Kit for detecting GII type norovirus and applications thereof
<u>US2013224730 (A1)</u>	2013-08-29	PEPTIDE LIGANDS
<u>CN103243115 (A)</u>	2013-08-14	Multi-epitope antigenic gene of norovirus
<u>CN103215379 (A); CN103215379 (B)</u>	2013-07-24	Diarrhea virus detection kit and method
<u>KR20130055042 (A); KR101359811 (B1)</u>	2013-05-28	COMPOSITION AND METHOD FOR DETECTION OF A NOROVIRUS
<u>CN103146846 (A)</u>	2013-06-12	Single standard product-based four-color fluorogenic quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction) method and kit
<u>CN103131798 (A)</u>	2013-06-05	Norovirus real-time fluorescent RT-PCR detection kit and application thereof
<u>CN103088154 (A)</u>	2013-05-08	Molecular motor biosensor kit for detecting norovirus
<u>CN103060470 (A)</u>	2013-04-24	Detection of GII type Norovirus by color-based reverse transcription loop-mediated isothermal amplification technology
<u>CN102965452 (A)</u>	2013-03-13	Norovirus real-time isothermal amplification detection kit, its primers and probe
<u>CN102925591 (B); CN102925591 (A)</u>	2013-02-13	Pretreatment method for clinical sample, and detection method and kit for norovirus in clinical sample
<u>CN102634533 (A)</u>	2012-08-15	Preparation method of Norovirus nucleic acid standard sample
<u>CN102559616 (A); CN102559616 (B)</u>	2012-07-11	Norovirus RNA fragment-containing pseudoviral particle and preparation method thereof
<u>US2012021405 (A1)</u>	2012-01-26	Single Chain Antibody for the Detection of Noroviruses
<u>US2012020964 (A1)</u>	2012-01-26	Antibodies for Norovirus
<u>CN102304514 (B); CN102304514 (A)</u>	2012-01-04	Primer and method for detecting GI type and GII type norovirus by utilizing primer
<u>CN102154528 (B); CN102154528 (A)</u>	2011-08-17	Primer, probe and kit for detecting rotavirus and Norovirus liquid phase chips
<u>KR101034805 (B1)</u>	2011-05-23	NOROVIRUS STANDARDIZED POSITIVE CONTROL AND NOROVIRUS DETECTING KITS BEING PROVIDED WITH RNA TRANSCRIPTS THEREOF
<u>CN101948936 (B); CN101948936 (A)</u>	2011-01-19	Real-time fluorescence PCR method for detecting norovirus in aquatic product
<u>JP2010004793 (A)</u>	2010-01-14	METHOD FOR DETECTING NOROVIRUS RNA AND DETECTION REAGENT
<u>KR20090078137 (A); KR101025595 (B1)</u>	2009-07-17	SPECIFIC FOR NOROVIRUS AND METHOD OF DETECTING VARIOUS NOROVIRUS
<u>JP2009240207 (A); JP5328010 (B2)</u>	2009-10-22	METHOD FOR EASILY DETECTING NOROVIRUS IN HIGH SENSITIVITY

<u>US2009181365</u> (A1)	2009-07-16	NOROVIRUS DETECTION REAGENT
<u>CN101403014</u> (A)	2009-04-08	Ring mediated isothermality amplification fast detecting method for norovirus
<u>US2008254443</u> (A1); <u>US7794928</u> (B2)	2008-10-16	Norovirus detection, methods and compositions therefor
<u>US7205112</u> (B2); <u>US2005048475</u> (A1)	2005-03-03	Materials and methods for detection of enterovirus and norovirus
<u>US7955792</u> (B2); <u>US2006216695</u> (A1)	2006-09-28	Diluent for norovirus or sapovirus specimen and method for detecting virus
<u>JP2007145775</u> (A)	2007-06-14	METHOD FOR DETECTING NOROVIRUS GI IN HIGH SENSITIVITY
<u>JP2005245434</u> (A)	2005-09-15	DETECTION REAGENT FOR NOROVIRUS
<u>JP2005082558</u> (A)	2005-03-31	HIGH SENSITIVITY DETECTION METHOD OF SMALL ROUND STRUCTURED VIRUS
<u>CN101153341</u> (B); <u>CN101153341</u> (A)	2008-04-02	Primer, detection method and detection reagent kit for detecting type G2 norovirus

Hakusanat "Norwalk" ja "detection"

<b>Julkaisunumero</b>	<b>Julkaisupäivä</b>	<b>Nimitys</b>
<u>CN104634975</u> (A)	2015-05-20	Detection kit and detection method of Norwalk viruses
<u>KR20140049131</u> (A); <u>KR101441950</u> (B1)	2014-04-25	NOROVIRUS DETECTION METHOD, AND THE PREPARING METHOD OF RECOMBINANT VECTOR AND RECOMBINANT PROTEIN FOR THE DETECTION
<u>CN102605103</u> (B); <u>CN102605103</u> (A)	2012-07-25	Primer, probe and method for detecting Norwalk virus nucleotide
<u>CN101892326</u> (A); <u>CN101892326</u> (B)	2010-11-24	Method for preparing standard substance suitable for virus PCR detection
<u>CN101570798</u> (B); <u>CN101570798</u> (A)	2009-11-04	Detection kit and detection method for 3 species of food-borne viruses in marine products
<u>CN101328505</u> (A); <u>CN101328505</u> (B)	2008-12-24	Gene chip and reagent box for detecting food-borne virus
<u>US5559014</u> (A)	1996-09-24	Methods and reagents to detect and characterize Norwalk and related viruses
<u>US2004115617</u> (A1); <u>US7202032</u> (B2)	2004-06-17	Method of detecting norwalk-like virus (gi)
<u>US7351819</u> (B2); <u>US2004072145</u> (A1)	2004-04-15	Method of detecting norwalk-like virus (gII)
<u>US2003129588</u> (A1); <u>US6942865</u> (B2)	2003-07-10	Methods and reagents to detect and characterize norwalk and related viruses
<u>US4455531</u> (A)	1984-06-19	Conductance probe for detection of immiscible liquids
<u>US2007077554</u> (A1)	2007-04-05	Homologous viral internal controls for use in RT-PCR assays of enteric viruses

<u>US6156883 (A)</u>	2000-12-05	Polyclonal and monoclonal antibodies to Norwalk virus and methods for making them
<u>WO9405700 (A2);</u> <u>WO9405700 (A3)</u>	1994-03-17	METHODS AND REAGENTS TO DETECT AND CHARACTERIZE NORWALK AND RELATED VIRUSES
<u>JP2002020399 (A)</u>	2002-01-23	MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZING NORWALK VIRUS(NV)
<u>JP2002017397 (A)</u>	2002-01-22	METHOD FOR IMMUNOLOGICALLY ASSAYING NORWALK VIRUS, METHOD FOR SCREENING INFECTIOUS DISEASE AND SCREENING KIT
<u>CN100410391 (C);</u> <u>CN1876839 (A)</u>	2006-12-13	Multiple RT-PCR detection method and kit for Norwalk virus and rotavirus
<u>EP1818416 (A2);</u> <u>EP1818416 (A3);</u> <u>EP1818416 (B1)</u>	2007-08-15	Methods and kits for the detection of HPV

**Sähköpostihaastattelukysymykset**

1. Esittely (kuka olet, mikä työtehtävä)
2. Milloin on tarvetta selvittää, mikä patogeeni on aiheuttanut gastroenteriitin?
3. Minkälaisia eri detektointimenetelmiä on käytössä noroviruksen diagnosointiin?
  - a. Mitkä ovat eri menetelmien vahvuudet?
  - b. Minkä nimisiä laitteita/testejä käytössä?
  - c. Onko vieritestausta käytössä?
4. Miten noroviruksen epidemiakaudet vaikuttavat diagnostiikkaan?
5. Minkälaisia toivomuksia noroviruksen detektiomenetelmällä? Onko tarvetta tietynlaiselle laitteelle tai testille?

## EIA-testien vertailutaulukko

1 (1)

Testin nimi	IDEIA™ Norovirus kit	RIDASCREEN® Norovirus 3rdGeneration kit
Valmistaja	Oxoid Ltd	R-Bipharm
Kitin sisältö	96-kuoppalevy (12 kpl 8 kaivoista liuskaa) ja reagenssit. Muut materiaalit ja välineet hankittava erikseen.	96-kuoppalevy (12 kpl 8 kaivoista irroitettavaa liuskaa) ja reagenssit. Muut materiaalit ja välineet hankittava erikseen. [15]
Laitteen tekniset tiedot	Kitin säilytys 2-8 °C :ssa, avattu kuoppalevy paketti säilyy 12 vko	Kitti tulee säilyttää 2-8 °C :ssa
Menetelmä	EIA	EIA
Monoplex/ Multiplex	Monoplex	Monoplex
Mille patogeenille	Norovirus GI ja GII	Norovirus GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.7) ja GII (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.8, GII.10, GII.12, GII.13, GII.14, GII.17)
Testin suorituspaikka	Laboratorio	Laboratorio
Näytemuoto	Ulostenäyte	Ulostenäyte
Näytemäärä	100 mg tai 100 µl	100 µl nestemäistä tai 100 mg kiinteää
Mihin näyte laitetaan	Suspensoidaan Sample Diluentin kanssa	Suspensoidaan Diluent 1:n kanssa
Näytteen säilyvyys	2-8°C 3 vrk, pidempiaikainen säilytys -20°C. [18]	2-8 °C 72 h, pidempiaikainen säilytys -20°C tai kylmempi [15]
Rinnakkaisnäytteiden määrä	96	96
Reagenssit	Sample Diluent, Control+, Conjugate(peroksidaasi leimattuja polyklonaalisia vasta-aineita, monoklonaalisia vasta-aineita, sininen väriaine), Control diluent, Wash Buffer, Substrate TMB(peroxide tetraethylbenzidine), Stop Solution (rikkihappo)	Diluent 1, Wash buffer, Positive Control, Conjugate 1 (biotini konjugoidut vasta-aineet), Conjugate 2 (streptavidini peroksidaasi), Substrate (vetyperoksidi, TMB), Stop Reagent (rikkihappo) (Instructions)
Näytteen käsittely	Näytteen esikäsittely, pipetointi kaivoihin, huuhtelu	Näytteen esikäsittely, pipetointi kaivoihin, huuhtelu
Inkubaatioaika (min)	60 + 30	60 + 30 + 15
Testin kokonaiskesto (min.)	90 + manuaalinen työ	105 + manuaalinen työ
Vertailumetodi	GI/GII TaqMan rRT-PCR, ABI 7500 [1]	RT-PCR; QIAamp®, Viral RNA Mini kit [13]
Herkkyys	55,0 - 59,6 % [1]	61,8 [13]
Spesifisyys	87,9 - 94,8 % [1]	92,5 [13]
Tulos	Värireaktio, silmämääräinen arvio, fotometrinen luku aallonpituudella 450 nm	Värireaktio, mitataan fotometrisesti
FDA-hyväksytty	ei	kyllä (vain epidemiat)
CE-hyväksytty	kyllä	kyllä
Tutkimusten määrä (PubMed/haettu testin nimellä)	16	22

## LFIA-testien vertailutaulukko

Testin nimi	ImmunoCard STATI®Norovirus	Noroscreen	NOROTOP+ ®	RIDA®Quick	SD Bioline Norovirus
Valmistaja	Meridian Bioscience Europe	Microgen Bioproducts	All.Diag	R-Biopharm	Standard Diagnostics
Laitteen koko ja lukumäärä	Testikasetti, näytteenkäsittelyputket(joissa reagenssipuskurivalmiina), näytetikut [28]	Testikasetti	Testikasetti ja reagenssit[31]	Kertakäyttöinen testikasetti, paketti sisältää reagenssit A ja B, kertakäyttöpipetit, koeputket	Testikasetti, näytteenkäsittelyputket, steriili pasteuripipetti, steriilit pumpulitikut, reagenssipuskuri
Montako pkt kitissä on	20 kpl:n paketit	10 kpl:n paketit	10 kpl:n paketit [31]	25 kpl:n paketit	20 kpl:n paketit
Menetelmä	LFIA	LFIA	LFIA	LFIA	LFIA
Monoplex / Multiplex	Monoplex	Monoplex	Monoplex	Monoplex	Monoplex
Mille patogeenille	Norovirus GI ja GII	Norovirus GI ja GII	Norovirus GI ja GII	Norovirus GI ja GII	Norovirus GI ja GII
Testin suorituspaikka	Laboratorio/POC	Laboratorio/POC	Laboratorio / POC	Laboratorio / POC	Laboratorio / POC
Näytemuoto	Ulostenäyte	Ulostenäyte	Ulostenäyte	Ulostenäyte	Ulostenäyte
Näytemäärä	Swab	NA	50 µl tai 50 mg [31]	50 µl tai 50 mg [26]	50-100 mg
Mihin näyte laitetaan	Diluent tube	Vial	Extraction Tube	Reaction Vial	Collection Tube
Tulos	Positive, Negative, Invalid	Positive GI, Positive GII, Negative, Invalid	Positive for GI, Positive for GII, Negative, Invalid	Positive, Negative, Invalid	Positive, Negative, Invalid
Näytteen käsittelyaika (min.)	5	5	~5	~5	5
Inkubaatioaika (min.)	15	15	15	15	15
Testin kokonaiskesto (min)	20	20	20	20	20
Herkkyys	24% [24] 35% [27]	23 % [24]	19-38 % [24]	61,4% [25], 59 % [24]	41% [27]
Norovirus GI	26% [27]	NA	52% [27]	42,1% [25]	23% [27]
Norovirus GII	39% [27]	NA	50% [27]	76% [25]	54% [27]
Valmistajan ilmoittama	92% vs RT-PCR [28]	95,65% [30]	95,65 % [31] vs RT-PCR	92% [26]	84,1% [29]
Spesifisyys	75 % [24]	100% [24]	40 - 100% [24]	100% [25], 100% [24]	100% [27]
Norovirus GI	NA	NA	NA	100% [25]	NA
Norovirus GII	NA	NA	NA	100% [25]	NA
Valmistajan ilmoittama	98,3% vs RT-PCR [28]	91,67%[30]	91,67% [31] vs. RT-PCR	98% [26]	96,1% [29]
Vertailumetodi	rRT-PCR [24]	rRT-PCR [24]	rRT-PCR [24]	RT-PCR, easyMAG, ABI7500 [25]	RT-PCR & Ridaquick [27]
FDA-hyväksytty	ei	ei	ei	ei	ei
CE-hyväksytty	kyllä	kyllä	kyllä	kyllä	kyllä
Tutkimusten määrä (PubMed/haettu testin nimellä)	2	1	2	5	4
NA = Not Available (Tieto ei saatavilla/löydy)					





## PCR-paneelien vertailutaulukko

1 (1)

Testin nimi	FilmArray® Gastrointestinal (GI) Panel	Seeplex® Diarrhea ACE Detection: V-assay	Verigene Enteric Pathogens Nuclein Acid test	Xpert®Norovirus	xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel
Valmistaja	Biofire Diagnostics	Seegene	Nanosphere	Cepheid	Luminex
Laitteen nimi	FilmArray Instrument	Seeplex system: SEEPREP12™ (Seegene), SEEAMP™(Seegene) Caliper LabChip® Dx (Caliper Life Sciences), MultiNA(Shimadzu) [42]	Verigene System	GeneXpert Instrument System platform (GeneXpert Dx, GeneXpert Infinity-48, GeneXpert Infinity-48s tai GeneXpert Infinity-80) [33]	RNA:n eristys: NucliSens® EasyMag® instrument (Biomerieux)PCR: Luminex® 100/200™ instruments with xPONENT® software
Laitteen koko ja lukumäärä	25,4 x 39,3 x 16,5 cm, paino 9kg	4 KPL ; SEEPREP12™: 44,2 x 44,5 x 46,5 cm, paino 22 kg; SEEAMP™: 35,1 x 27,9 x 25 cm, paino 10 kg; Caliper LabChip® Dx: 47,2 x 64,9 x 46,4 cm, paino 45,5 kg;MultiNA [42]	Verigene Processor SP 19,4 x 47,5 x 58,2 cm, paino 17,3 kg ja Verigene Reader 29,8 x 31,6 x 52,1 cm, paino 11,3 kg	Koko neljällä moduulilla: 27,94 x 30,48 x 29,72 cm	Luminex® 100/200™ instrument: 43 cm x 50,5 cm x 24,5 cm, paino 25 kg
Menetelmä	nested PCR + sulamiskäyrä [40]	käänteistranskriptio PCR käyttämällä DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide technology), detektio ACE : Automatic capillary electrophoresis [42]	käänteistranskriptio PCR + kulta nanopartikkeli hybridisaatio	reaaliaikainen käänteistranskriptio PCR	reaaliaikainen käänteistranskriptio PCR +xTAG fluorescent bead-based detection
Monoplex / Multiplex	Multiplex	Multiplex	Multiplex	Monoplex	Multiplex
Mille patogeenille	22 targeettia, joista viruksia adenovirus, astrovirus, norovirus GI/ GII, rotavirus ja sapovirus [40]	rotavirus, adenovirus, norovirus GI/GII, astrovirus [Diarrhea]	9 targeettia, Norovirus GI/GII	norovirus GI ja GII	15 eri patogeenia
Testin suorituspaikka	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio	Laboratorio/POC	Laboratorio
Näytemuoto	Ulostenäyte	Ulostenäyte tai rectal swab [42]	Ulostenäyte	Uloste- tai oksennusnäyte (swab)	Ulostenäyte
Näytemäärä	200 µl [36]	NA	200 µl		100 µl tuore tai jäädytetty [36]
Mihin näyte laitetaan	Cary Blair media [36]	NA	Cary Blair media	Swab siirretään suoraan Sample Reagent-pullloon	Cary Blair media tai raakanäyte
Rinnakkaisnäytteiden määrä	1	96- kuoppalevy [42]	tammi.32	Saatavilla eri moduulimäärillä (1-80 kpl)	96
Reagenssi	pakastekuivatut reagenssit, säilytys huoneenlämmössä [40]	NA	Testi patruunassa	PCR-reagenssit sisältyvät kertakäyttöiseen Xpert Norovirus - patruunaan	Reagenssien varastointi 4°C ja -20°C.
Näytteen käsittelyaika (min.)	~2 [40]	NA	~5	~5	45-60, + DNA/RNA-eristys 45 min
Testin ajoaika (min.)	~60 [40]	NA	~120	~85	2,5
Testin kokonaiskesto (min.)	~62	~10 h	~125	~90	~5 h
Herkkyys	91,7% [38]		NA	100% [34]	100 % [38]
Norovirus GI	NA	100% [1]	NA	100% [34]	63.1-100% [46]
Norovirus GII	NA	97% [1]	NA	100% [34]	90.5-100% [46]
Spesifisyys	99,5% [38]	NA	NA	NA	90,8 [38]
Norovirus GI	NA	100% [1]	NA	99,5% [34]	98.7-100% [46]
Norovirus GII	NA	99,4% [1]	NA	98,9% [34]	96.6- 99.8% [46]
Vertailumetodi	xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel [38]	RealStar 2.0 norovirus kit ( Astra Diagnostics) reaaliaikainen RT-PCR ABI7500 [1]	NA	RT-PCR CDC:llä [35]	Norovirus Real Time RT-PCR kit (Shanghai ZJ Bio-Tech) ; ABI 7500 (Life Technologies) [46]
Tulos (TCID /LOD)	Laadullinen, vahvistettu LoD 1 x 10 <sup>4</sup> RNA copies/mL [39]	10 <sup>4</sup> -4,2 TCID <sub>50</sub> /ml [1]	LoD/mL: 4.12x10 <sup>5</sup> -1,67 x 10 <sup>6</sup> kopiota	Näytteen sisältämä genotyyppi (GI tai GII) sekä	Laadullinen
Norovirus GI	Tunnistus LoD konsentraatiossa 95% [39]	LOD 2.2 GEq /reaction [1]	4,12x10 <sup>5</sup> LoD/ml [41]	LOD 3.2 x 10 <sup>4</sup> - 3,98 x 10 <sup>6</sup> copies/ml [33]	6.56x10 <sup>5</sup> Copies/mL [37]
Norovirus GII	Tunnistus LoD konsentraatiossa 100% [39]	LOD 1.7 GEq /reaction [1]	1,67 x 10 <sup>6</sup> LoD/ml [41]	LOD 1,03 x 10 <sup>4</sup> - 4,97 x 10 <sup>6</sup> copies/ml [33]	1.15x10 <sup>6</sup> Copies/mL [37]
Hinta	39 500 \$ [36]	NA	40 000 \$ [36]	NA	37 000 \$ [36]
FDA-hyväksytty	kyllä	ei	kyllä	kyllä	kyllä
CE-hyväksytty	kyllä	kyllä	kyllä	kyllä	kyllä
Tutkimusten määrä (PubMed/haettu testin nimellä)	4	5	1	1	21

NA =Not Available