

Anna Weintraub

Detergentteihin pohjautuvan näytteenkäsittelyn kehittäminen noroviruksen nukleiinihappodiag- nostiikkaan

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveysala

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

23.11.2016

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Anna Weintraub Detergentteihin pohjautuvan näytteenkäsittelyn kehittäminen noroviruksen nukleiinihappodiagnostiikkaan 59 sivua + 3 liitettä 23.11.2016
Tutkinto	Bioanalytiikka AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Laboratorioasiantuntija Jenna Flinck Lehtori Hannele Pihlaja
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää detergentteihin pohjautuva näytteenkäsittely noroviruksen nukleiinihappomonistusta varten. Työ tehtiin yhteistyössä Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityslaboratorion kanssa. Näytteenkäsittely suunniteltiin yhteensopivaksi Orion Diagnostica Oy:n SIBA®-teknologiaan perustuvien kylmäkuivattujen reagenssien kanssa. Opinnäytetyön kokeellinen osuus koostui näytteenkäsittelyreagenssien vertailusta eri olosuhteissa kaupallisten noroviruskontrollipartikkelien ja ulosteen kanssa. Tavoitteena oli perehtyä näyttemateriaalina olevan ulosteen ja RNA-viruksen asettamiin haasteisiin detergentteihin pohjautuvan näytteenkäsittelyn kautta.</p> <p>Kehittämiseen käytettiin pääasiallisena tutkimustyökaluna RT-PCR-reaktioita, joiden avulla vertailtiin eri tavalla käsiteltyjen noroviruskontrollipartikkelinäytteiden monistumista. Kyse oli alkuvaiheen tuotekehitystyöstä, jonka aikana pyrittiin rajaamaan pois ei-toimivia vaihtoehtoja ja löytämään joukosta noroviruksen näytteenkäsittelyyn optimaalisimmat reagenssit. Opinnäytetyön viimeisessä vaiheessa tutkittiin detergenttikäsiteltyjen näytteiden toimivuutta SIBA®-reaktiossa. Näyttemateriaaleina tutkimuksissa käytettiin kaupallisia noroviruskontrollipartikkeleita ja ulostenäytteitä. Kokonaisuudessaan työ koostui suunnittelusta, detergenttien valinnasta ja valmistamisesta, näytteenkäsittelystä, RT-PCR-reaktioiden valmistelusta ja tulosten tulkinnasta sekä käsittelystä dokumentoitavaan muotoon.</p> <p>Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa tehtiin kattava pohjatyö noroviruksen näytteenkäsittelyprosessille ennen SIBA®-monistusreaktiota. Detergenttien ominaisuuksia tarkasteltiin korkean konsentraation PEG-liuoksen kanssa, jolloin näytteenkäsittelyn toimivuuden huomattiin parantuvan selkeästi. Loppuun valittujen detergenttien tiedetään toimivan noroviruksen näytteenkäsittelyreagensseina norovirusryhmien GI ja GII kanssa. Lisäksi kuumennusvaiheen merkitys ulostenäytteiden näytteenkäsittelyssä tarkentui. Viimeisen vaiheen tutkimuksista SIBA®-reaktiossa parhailta vaikuttivat detergentit Tween 20 ja Brij L23. Opinnäytetyö esittelee kattavasti työn suorituksen sekä tutkimuksista saadut tulokset ja sen teoreettinen tieto on suunniteltu tukemaan työn laboratorio-osuutta.</p>	
Avainsanat	Norovirus, detergentit, ulostenäyte, näytteenkäsittely, nukleiinihappomonistus, RT-PCR

Author Title Number of Pages Date	Anna Weintraub Development of Detergent Based Sample Preparation for Nucleic Acid Diagnostics of Norovirus 59 pages + 3 appendices 23 November 2016
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Jenna Flinck, Laboratory Specialist Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>The purpose of this study was to find detergent based sample preparation for nucleic acid diagnostics of norovirus. The work was done in collaboration with the Orion Diagnostica's research and development laboratory. Sample preparation was designed to be compatible with lyophilized reagents based Orion Diagnostica's Strand Invasion Based Amplification (SIBA®) technology. SIBA®-technology is based on isothermal amplification of nucleic acid at a constant temperature. The main goal of this study was compare different sample preparation conditions and reagents.</p> <p>The main analysis method was reverse transcription PCR. With the help of RT-PCR, different sample preparation reagents and amplification of norovirus were compared under different conditions. The performance of the thesis consisted of early-stage research and development work. During this study, the aim was to define the inoperative options and find the optimal sample preparation reagents for the diagnosis of norovirus. Stool samples and viral particles were used as the sample material for this study. The working part consisted of the design of new work protocols, manufacture of detergents, preparation of the samples and RT-PCR reactions. In addition, the performance of the work consisted of processing the results to documented form.</p> <p>The practical part of the thesis was done the groundwork for norovirus sample preparation process before the SIBA®-amplification. As a result, the work was complex, which consisted of comparison of detergents in a many different conditions. The behavior of detergents with PEG-solution was examined and it was found to improve their performance clearly. Selected detergents were analyzed with both GI and GII norovirus groups. In addition, it was concluded that the handling of the sample for SIBA® reaction requires a heating step. Without it, the stool used in this study inhibits the reaction. The results of this study showed that two most optimal detergents were Tween 20 and Brij L23. The thesis presents a comprehensive view of work methods, the results from studies and the theory is designed to support the thesis laboratory part.</p>	
Keywords	Norovirus, Detergents, Stool sample, Sample preparation, Nucleic acid amplification, RT-PCR

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Norovirus	2
2.1	Yleistä	2
2.2	Luokittelu ja viruksen rakenne	4
2.3	Laboratoriodiagnostiikka	6
3	Molekyylibiologiset menetelmät	7
3.1	Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus	7
3.2	RT-PCR-menetelmä	9
3.3	SIBA®-teknologia	11
4	Detergentit	12
5	Opinnäytetyön tavoite	14
6	Opinnäytetyön suoritus	16
6.1	Näytemateriaalit	16
6.2	Detergenttien valinta ja valmistaminen	17
6.3	Viruspartikkeleiden kopiolukujen määrittäminen	19
6.4	Näytteenkäsittely	20
6.4.1	Viruspartikkelien laimentaminen	20
6.4.2	<i>C. difficilen</i> näytteenkäsittely	21
6.4.3	Näytteenkäsittelymenetelmä	22
6.5	Nukleiinihappojen monistaminen	25
6.5.1	G-Dia Nota PCR-reagenssipakkaus	25
6.5.2	RT-PCR-reaktion olosuhteet	26
6.5.3	SIBA®-reaktiot	27
6.6	Opinnäytetyön eteneminen	27
7	Tulosten tarkastelu	29
7.1	Detergenttien vertailu ilman inkubointia	30
7.1.1	Brij 58-detergentti eri olosuhteissa	30
7.1.2	Muut detergentit	32
7.2	Detergenttien vertailu inkuboinnin kanssa	34
7.2.1	Tween80 ja Tergitol NP40	34
7.2.2	IGEPAL CA-630 ja Triton x-100	36

7.3	Detergenttien vertailu PEG-liuoksen kanssa	36
7.3.1	Brij 58, C13E10, Tween 80 ja Tergitol NP40 PEG-liuoksen kanssa	37
7.3.2	Igepal CA630, Triton x-100, Tween20 ja Brij O10	39
7.3.3	Brij C10, C7BzO ja Brij L23 PEG-liuoksen kanssa	40
7.4	GI noroviruskontrollipartikkelien analysointi	41
7.5	SIBA®-reaktiot	44
7.6	Yhteenveto	47
8	Tulosten luotettavuuden tarkastelu	51
9	Pohdinta	54
	Lähteet	57
	Liitteet	
	Liite 1. Detergenttilista	
	Liite 2. Esimerkkityöohje	
	Liite 3. RNA-eristyksen kulku	

1 Johdanto

Norovirus on yksi yleisimpiä gastroenteriittien eli suolistotulehdusten aiheuttajia maailmassa (Lounamo - Tuuminen – Kotilainen: 2014). Norovirus on mielenkiintoinen tutkimuskohde viruksen suuren geneettisen muuntuvuuden takia. Uuden variantin syntyessä vanha kanta katoaa usein nopeasti. Noroviruksen laboratoriodiagnostiikka asettaa haasteita viruksen suuren tarttuvuuden ja nopeasti etenevän ja pikaisia laboratoriotuloksia vaativan taudinkuvan takia (Anttila – Nieminen – Maunula: 2010). Tällä hetkellä noroviruksen laboratoriodiagnostiikka perustuu pääasiassa viruksen antigeenin osoitukseen tai sen nukleiinihappojen määrittämiseen polymeerasiketjureaktion avulla. Noroviruksen diagnosointi on tärkeää, jotta voidaan ryhtyä tarvittaviin toimenpiteisiin taudin leviämisen estämiseksi. (Mattila – Järvinen: 2011).

Tekniikan kehittymisen myötä tulevaisuuden laboratorioanalytiikassa suosiotaan nostavat ”Point of care” eli POC-testit. POC-testien hyötyinä pidetään laitteiden yksinkertaisuutta ja käyttäjäturvallisuutta sekä testeistä nopeasti saatavia tuloksia. Näillä diagnostisilla testeillä voi saavuttaa suuria hyötyjä edellisten ominaisuuksien lisäksi analyysilaitteiden pienen koon ja helpon kuljetettavuuden avulla. POC-testit ovat nopeasti kehittyvä laboratorioanalytiikan ala ja niiden merkitys terveydenhuollossa kasvaa jatkuvasti. (Eskelinen: 2016.) SIBA®-teknologia mahdollistaa nukleiinihappojen monistamisen myös POC-laitteissa. Sen toiminta perustuu isotermaaliseen nukleiinihappojen monistusteknologiaan (Orion Diagnostica Oy: 2016).

Tässä opinnäytetyössä keskitytään norovirusnäytteen käsittelyyn ennen viruksen lopullista tunnistamista nukleiinihappomonistusreaktion avulla. Opinnäytetyön tavoitteena on löytää ratkaisu näytemateriaalina olevan ulosteen ja RNA-viruksen asettamiin diagnostisiin haasteisiin detergentteihin pohjautuvan näytteenkäsittelyn avulla. Tarkoituksena on löytää toimiva näytteenkäsittelyratkaisu nukleiinihappomonistukseen pohjautuvaa norovirusdiagnostiikkaa varten. Näytteenkäsittely on suunniteltu yhteensopivaksi Strand Invasion Based Amplification eli SIBA®-teknologiaan perustuvien kylmäkuivatujen reagenssien kanssa. Koko opinnäytetyön suorituksen ajan mielessä on pidetty asiakasnäkökulma, johon perustuen diagnostisen prosessin alkuvaiheen näytteenkäsittelystä haluttiin tehdä mahdollisimman yksinkertainen ja käyttäjäturvallinen.

Työ on tehty yhteistyössä Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen kanssa. Näytteenkäsittelyratkaisun kehittämisen pohjana on käytetty Orion Diagnostica Oy:n tuotekehi-

tyksen aiempia tutkimuksia detergenteihin tai suodattamiseen pohjautuvista näytteenkäsittelyn tutkimuksista muille patogeeneille. Työssä on kuitenkin kyse alkuvaiheen kehityksestä, eikä valmista näytteenkäsittelyä norovirukselle tai ulostenäytteille ollut käytössä ennen opinnäytetyön kokeellisen osuuden aloittamista. Detergenttipohjaista näytteenkäsittelyä on tutkittu influenssaviruksen diagnosoinnissa Terhi Voutilaisen opinnäytetyössä (2015).

Opinnäytetyön kokeellinen osuus koostuu erilaisten detergenttien ominaisuuksien tarkastelusta, detergenttien tarkastelusta näytteenkäsittelyn reagensseina sekä näytteenkäsittelyolosuhteiden tarkastelusta ja vertailusta reaaliaikaisen käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktion avulla. Opinnäytetyön tavoitteena on kehittää näytteenkäsittelyratkaisu, joka on optimaalinen juuri norovirusnäytteelle. Tässä työssä keskitytään noroviruksen genoryhmiin GI ja GII. Opinnäytetyöstä saatuja tuloksia voidaan käyttää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä apuna ja pohjana mahdolliselle norovirusdiagnoosin kehitykselle. Tuloksia voidaan tulevaisuudessa hyödyntää myös kehitetäessä analytiikkaa muille viruksille tai ulosten patogeeneille.

2 Norovirus

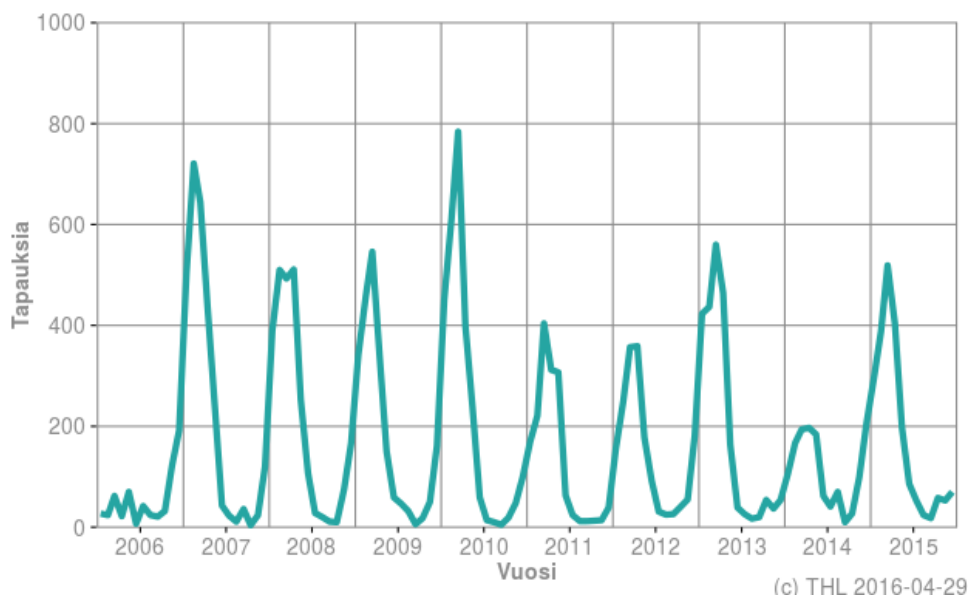
2.1 Yleistä

Elintarviketurvallisuusviraston (2016) mukaan norovirus on ollut viime vuosina tavallimpia raportoituja ruokamyrkytysten aiheuttajia. Lisäksi se on aiheuttanut suuria vesivälitteisiä epidemioita. Norovirukset ovatkin yksi yleisimpiä suolistotulehduksien aiheuttajia maailmassa; puolet aikuisten ja noin yksi kolmasosa lasten virusperäisistä enteriiteistä johtuu noroviruksesta (Lounamo ym. 2014). Norovirusta voidaan kutsua enemmän aikuisten kuin lasten sairaudeksi (Lumio 2012).

Norovirukset aiheuttavat vedestä ja elintarvikkeista välittyviä epidemioita, mikä onkin niiden yleisin tartuntatapa. Norovirus tarttuu ilmateitse aerosolimuodossa, pintojen kautta sekä monia muita reittejä herkästi ihmisestä toiseen. Feko-oraalinen tartuntareitti on noroviruksen tärkein tartuntareitti (Rönnqvist 2013: 2.). Tämä tarkoittaa sitä, että norovirusta sisältävä oksennus tai uloste leviää pintojen kautta tai pisaratartuntana aerosolissa henkilön limakalvoille. Jos norovirustartunnan saa ruuasta, ovat virusta välittäviä ruoka-aineita usein olleet saastuneet vadelmat, nuoret sipulit tai lehtivihan-

nekset, kuten salaattit, yrtit ja idut, joihin norovirus leviää saastuneen kasteluveden kautta. Myös simpukoiden on todettu aiheuttavan usein norovirustartuntoja, sillä niiden kasvatusvesi saattaa saastua noroviruksella. Näitä reittejä kontaminoituneet elintarvikkeet voivat siirtää virusta myös muihin elintarvikkeisiin. Toisaalta, täytyy ottaa huomioon, että mikä tahansa elintarvike, jota ei käsittelyn jälkeen kuumenneta, voi tartuttaa viruksen käsittelijän käsistä. Tästä syystä esimerkiksi voileivät tai muut konditoriatuotteet, jotka valmistetaan käsin, kuuluvat norovirustartuntaa helposti välittäviin ruoka-aineisiin. (Mattila – Järvinen 2011; Lounamo ym. 2014.)

Kuten kuvioista 1 on nähtävissä, norovirustartuntoja on esiintynyt tasaisesti vuosien 2006–2015 aikana epidemialuontoisina aina uuden variantin syntyessä. Vuonna 2015, on Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen tartuntarekisteriin ilmoitettu 2164 norovirustapausta. Ilmoituksia on tehty tasaisesti kaikista sairaanhoitopiireistä. On tyypillistä, että norovirustartuntoja esiintyy eniten tammi-toukokuun välisenä aikana. Vuonna 2015 ilmoitetuista tartunnan saaneista 57 % oli naisia ja yli puolet yli 75 vuotta täyttäneitä. Tapauksia esiintyi kuitenkin kaikissa ikäryhmissä. (THL 2016).



Kuvio 1. Noroviruksen esiintyminen vuosittain 2006–2015. (THL: 2016)

Norovirus leviää helposti tiiviissä yhteisissä tiloissa, kuten laitoksissa, sairaaloissa ja päiväkodeissa. Yhden sairastuttua muiden tartunnat ovat yleisiä juuri viruksen helpon leviävyyden takia. Tartuttava annos on hyvin pieni, vain kymmenen viruspartikkelia riittää. (Lounamo ym. 2014.)

Norovirusta tavataan kaikkialla maailmassa ja se aiheuttaa maailmanlaajuisia pandemioita usein noin neljän vuoden välein. (Lounamo ym. 2014.) Norovirusinfektion aikana sairastuneen henkilön ulosteisiin erittyy runsaasti viruspartikkeleita, jotka säilyvät ulosteessa jopa 1-3 viikkoa. Tämä tarkoittaa sitä, että sairastunut henkilö voi tartuttaa tautia vielä oireiden loputtua. Ulosteista norovirukset leviävät jäteveden kautta aina luonnonvesiin asti, jossa ne saattavat säilyä pitkäänkin tartuttamiskykyisinä. Sairaalassa oleva noroviruspotilas on syytä eristää muista potilaista ja tartunnan saaneen henkilökunnan olisi oltava pois töistä vähintään kaksi vuorokautta oireiden loppumisen jälkeen. (Mattila – Järvinen 2011.)

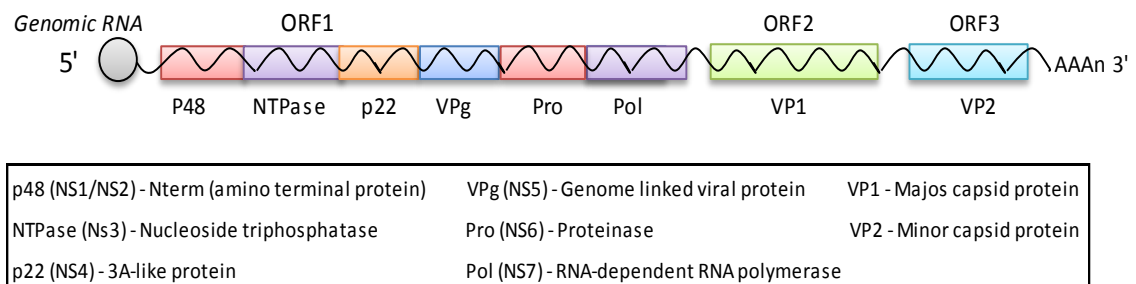
Tyypillisiä norovirustartunnan oireita ovat hyvin äkillisesti alkava ripuli ja oksentaminen. Oireisiin liittyy usein yleistä huonovointisuutta, vatsa- ja pääkipuja, väsymystä, lihaskipuja sekä vilunväristyksiä. Oireiden kesto on tyypillisesti 1-3 vuorokautta. Lapsilla ja huonon vastustuskyvyn omaavilla henkilöillä oireet voivat kuitenkin pitkittyä. Harvoissa tapauksissa norovirustartunta voi olla oireeton tai hyvin lieväoireinen. (Elintarviketurvalisuusvirasto 2016.)

Norovirustartuntaan ei ole olemassa spesifistä hoitoa ja tauti paranee yleensä itsestään ilman sairaalahoitoa. Yli 12-vuotiaille lapsille tehdyn tutkimuksen mukaan Nitatsoksaniidi niminen parasiittilääke vähentää oireilua vuorokauden verran. Tätä lääkettä ei ole kuitenkaan rekisteröity suomen markkinoille. Monisairailta ja esimerkiksi diabeetikoilla norovirusinfektio edellyttää suonensisäistä nesteytystä, jotta elektrolyytti-, glukoosi- ja nestetasapaino voidaan säilyttää. Myös lapset ja vanhukset kuuluvat noroviruksen riskiryhmään. (Anttila ym. 2010).

2.2 Luokittelu ja viruksen rakenne

Norovirukset luokitellaan kalikiviruksiin. Samaan ryhmään noroviruksen lisäksi kuuluvat sapovirukset, lagovirukset sekä vesivirukset. Norovirus on yksisäikeinen RNA- eli ribonukleiinihappovirus. Noroviruksen genomi eli perintöaines on kooltaan noin 7500 emäsparia. Noroviruksen genomien kaavakuvaa voi tarkastella kuviossa 2. Kuten kuviossa on nähtävissä, viruksen RNA sisältää kolme avointa lukukohtaa (engl. *open reading frame*), jotka koodaavat kahdeksaa eri virusproteiinia. Avoimet lukukohdat on nimetty nimillä ORF1, ORF2 ja ORF3. (Anttila ym. 2010; Robilotti – Deresinski – Pinsky 2015.)

Ensimmäinen avoin lukukohta koodaa viruksen replikaatiossa tarvittavia proteiineja. Toisen lukukohdan tehtävänä on koodata noroviruksen rakenteelle tärkeää kapsidiproteiinia. ORF3 puolestaan koodaa viruksen pienempää rakenneproteiinia. Noroviruksella on kapsidi, joka on muodostunut 180 rakenneproteiinimolekyylistä. Nämä rakenneproteiinimolekyylit ovat järjestyneet dimeereinä viruksen kuoreen. Viruksen halkaisija on kokonaisuudessaan noin 27–38 nanometriä. (Anttila ym. 2010; Robilotti ym. 2015.)



Kuvio 2. Kaavakuva noroviruksen genomista. Mukailten Robilotti ym. 2015.

Norovirukselle ominainen ilmiö, on sen suuri geneettinen muuntuvuus, jonka yhtenä seurauksena on se, ettei noroviruksen sairastaneelle jää pitkäaikaista immunitettia infektion jälkeen. Kun uusi variantti ilmaantuu, edellinen viruskanta katoaa kokonaan yleensä noin vuoden kuluessa. (Mattila – Järvinen: 2011.) Norovirus luokitellaan viiteen eri genomiryhmään, joista se voidaan luokitella vielä genotyyppeihin. Useissa yhteyksissä norovirusta onkin kutsuttu muodonmuuttajaksi. Tämä nimitys johtuu juuri viruksen suuresta geneettisestä muuntuvuudesta, sillä sitä on tavattu yli 40 erilaista genotyyppiä. GI-, GII- ja GIV-ryhmien virukset ovat yleisimmin ihmisiä infektoivia viruksen tyyppiä. (Robilotti ym. 2015).

Luokan GI norovirusia tunnetaan yhdeksää erilaista tyyppiä ja ne liittyvät usein ruoka- ja vesivälitteisiin tartuntoihin. Sairaaloissa ja laitoksissa esiintyvät norovirustartunnat ovat puolestaan usein ryhmän GII virusten aiheuttamia, sillä ne tarttuvat leviämällä ihmisestä toiseen. Tämän luokan virusia tunnetaan jo 17 erilaista. (Anttila ym. 2010.) Viime vuosina genoryhmän GII virukset ovat aiheuttaneet enimmäkseen laajimmat epidemiat sairaaloissa ja laitoksissa (Jaakola 2012: 16). Yleisin noroviruksen genotyyppi on GII.4. On arveltu, että se tarttuu ihmisestä toiseen paremmin, kuin muut noroviruskannat ja tiedetään, että se muuntautuu geneettisesti ja pintarakenteeltaan hyvin nopeasti. Kun uusi variantti syntyy, vanha häviää. (Anttila ym. 2010. Huovinen ym. 2005: 599-600.)

Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen mukaan vuoden 2014 lopusta lähtien yleisin norovirusgenotyyppi on ollut GII.e. Alkuvuonna 2015 sitä on löydetty lähes jokaisesta tutkitusta näytteestä. Genotyypin epäillään kehittyneen mutatoitumalla maailmalaajuisesti yleisistä tyypistä GII.4. Tätä norovirustyyppiä havaittiin Suomessa ensimmäisen kerran vuonna 2008. THL listaa myös muita vuonna 2015 tavattuja norovirustyyppisiä, joita ovat GI.7, GI.2, GI.3, GI.5, GI.b sekä GII.17. (THL 2016.)

2.3 Laboratoriodiagnostiikka

Virusinfektioita diagnosoitaessa laboratorionäytteistä pyritään eristämään ja osoittamaan viruksia tai virusten osia. Näitä osia voivat olla esimerkiksi nukleiinihapot ja proteiinit tai elimistön tuottamat vasta-aineet viruksia vastaan. Jokainen näistä menetelmistä toimii tietyille viruksille ja niillä on etunsa ja haittansa. Menetelmien valintaan vaikuttavat esimerkiksi taudin tyyppi ja sairastumisesta kulunut aika tai se minkälaisia menetelmiä laboratoriossa ylipäätään on käytettävissä. Näyttemateriaali on myös yksi ratkaiseva menetelmän valintaan vaikuttava tekijä. (Lappalainen – Vainionpää - Hedman 2011.)

Noroviruksen diagnosointi on tärkeää, jotta voidaan ryhtyä tarvittaviin toimenpiteisiin taudin leviämisen estämiseksi. Norovirusinfektion oireet alkavat nopeasti ja sairaus on hyvin epidemialuonteinen. Tästä syystä alkuvaiheen diagnoosi perustuu usein taudin kliiniseen kuvaan. Nopea diagnoosi on tarpeellista etenkin laitoksissa ja sairaaloissa, joissa leviävään epidemiaan pitää reagoida nopeasti. Laboratorioissa noroviruksen tunnistaminen vie kuitenkin aina jonkin aikaa, joten nopeasti leviävän epidemian kohdalla välittömät toimenpiteet ovat tärkeitä. Norovirusten diagnosointi asettaa laboratorioille haasteita, sillä soluja ei voi kasvattaa soluviljelmissä. Tämän lisäksi norovirukset ovat geneettisesti muuntuvia ja niitä tavataan useita erilaisia genotyyppisiä. Noroviruksilla on lisäksi suppea isäntäspesifisyys. (Anttila ym. 2010).

Laboratorioissa noroviruksen diagnostiikka perustuu antigeenin osoitukseen tai sen entsyymaattiseen nukleiinihappojen osoitukseen PCR-menetelmällä. Yleisesti antigeeninosoitustesteinä on käytössä EIA-testejä, (engl. *Enzyme immunoassay*) mutta nykyisin käytetään myös immunokromatografiaan perustuvaa pikatestiä. (Mattila – Järvinen: 2011; Lappalainen ym. 2011.) Antigeeninosoitustesti on nopeampi ja edullisempi, mutta sen herkkyys PCR-menetelmään verrattuna on noin 70 %, joten PCR antaa huomattavasti herkemman ja tarkemman tuloksen. (Mattila – Järvinen 2011). Nämä

menetelmät palvelevat diagnostiikassa hyvin, mutta hieman eri tarkoituksiin. Jos ulostenäytteitä on useita ja halutaan selvittää onko kyseessä norovirus epidemia, on EIA-testi nopeutensa ja hintansa puolesta järkevämpi ratkaisu. Toisaalta, silloin, kun selvitetään infektiota yksittäisen potilaan näytteestä, on PCR-menetelmä tarkempi ja parempi valinta. Laboratorioissa ensisijainen näytemateriaali on uloste, mutta tarvittaessa myös oksennuksesta voidaan tunnistaa virusta. (Anttila ym. 2010.)

Terveydenhuollossa ulostenäytteet ohjeistetaan ottamaan kotona, eikä yleisissä vesissä esimerkiksi terveysaseman tai laboratorion tiloissa. Tällä on tarkoitus ennaltaehkäistä taudin leviämistä yleisiin tiloihin. Laitos- tai sairaalahoidossa olevan potilaan ulostenäyte täytyy tuki ottaa sairaalan tiloissa, mutta noudattaen erityistä aseptiikkaa ja varovaisuutta. Norovirusta sairastavien henkilöiden sairaalahuoneissa käydessään hoitajien täytyy noudattaa erityisiä toimenpiteitä, jotta he eivät kuljeta viruspartikkeleita mukanaan muihin tiloihin. Jos norovirusnäyte lähetetään postitse analysointilaboratorioon, se suositellaan lähettämään noin +4°C lämpötilassa kylmähäpakkauksessa. Mikäli ulostenäytettä ei lähetetä analysoitavaksi vähintään 3 vuorokauden kuluessa, se pakastetaan ja lähetetään pakastettuna. (Huslab 2016.)

Noroviruksen näytteenotto ei eroa juurikaan muiden ulosteesta määritettävien virusten tai bakteereiden näytteenotosta. Esimerkiksi NordLabin (2016) ja Huslabin (2016) potilasohjeiden mukaan ulostenäytettä antaessaan potilas ulostaa puhtaaseen kertakäyttöiseen astiaan. Tästä näytettä siirretään ulostenäytepurkkiin purkin kannessa olevan pienen lusikan tai lastan avulla. Näyte ohjeistetaan ottamaan ensisijaisesti sellaisesta kohdasta, jossa on limaa tai verta. Näyte säilytetään suljetussa astiassa viileässä ja se suositellaan palauttamaan laboratorioon samana tai viimeistään seuraavana päivänä näytteenotosta. Mikäli näyte otetaan laboratoriossa, se pyritään analysoimaan tuoreena. Noroviruksen diagnosointiin optimaalisin näytemateriaali on ripulivaiheen uloste, jolloin viruspartikkelien pitoisuus on kaikista korkeimmillaan. Toisaalta, ripulivaiheen ulosteesta näytteenotto on ulosteen koostumuksesta riippuen haastavampaa. (Nordlab 2016; Huslab 2016.)

3 Molekyylibiologiset menetelmät

3.1 Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus

Monien molekyylibiologisten tutkimusten ensimmäinen vaihe on nukleiinihappojen eristäminen. Nykyään kaikki kaupallisten toimittajien tarjoamat eristysmenetelmät eivät enää kuitenkaan vaadi tätä vaihetta. Nukleiinihappojen eristys alkaa aina solujen hajottamisella. Solujen hajottaminen voidaan tehdä kolmella toisistaan eroavalla tavalla. Näitä tapoja kutsutaan mekaaniseksi vaiheeksi, kemialliseksi vaiheeksi sekä entsyymaattiseksi vaiheeksi. Mekaaninen vaihe voi olla esimerkiksi solujen mekaanista jauhamista. Tämä tapa ei sovellu hauraille soluille, kuten esimerkiksi bakteerisoluille, mutta se ei myöskään välttämättä yksinään riitä paksun soluseinän omaaville soluille, kuten kasvisoluille. Solujen entsyymaattinen hajottaminen tehdään usein proteaasien avulla. Proteaasi on yhteinen nimitys niille entsyymeille, jotka pilkkovat proteiineja hajottamalla niiden aminohappojen välisiä sidoksia eli laukaisevat proteolyysin. Kemiallinen vaihe puolestaan pitää sisällään esimerkiksi detergenttien eli pinta-aktiivisten kemiallisten aineiden käytön. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010.)

Nukleiinihappojen eristämiseksi on kehitetty useita erilaisia menetelmiä ja niiden kanssa yhteensopivia reagenssipakkauksia. Näiden kaupallisten reagenssipakkausten etu on usein nopeus ja helppous, sillä valmistaja tarjoaa yksityiskohtaiset työohjeet menetelmän suorittamiseksi. Tällä hetkellä markkinoilta löytyy eri yritysten eristysreagenssipakkauksia, jotka perustuvat silikageelikolonniin, -kalvojen, lasikuitupintojen, magneettipartikkeleiden tai suolojen käyttöön. (Suominen ym. 2010.)

Solut sisältävät RNA- ja DNA juosteita hajottavia entsyymejä nukleaaseja. Kun solut on hajotettu, niiden sisältämät nukleaasit usein inaktivoidaan, jotta eristettävä materiaali ei tuhoutuisi. Tämä työvaihe ei ole välttämätön, eikä sitä aina tehdä. Vaihe voidaan usein myös yhdistää jo solujen hajottamisvaiheen kanssa. Inaktivoinnin jälkeen nukleiinihapot eristetään suodattamisen tai saostamisen avulla. Eristämisen jälkeen nukleiinihapot puhdistetaan. Eristetty näyte sisältää usein epäpuhtauksia, erityisesti proteiineja. Jotta nämä proteiinit saadaan pois reaktiosta, tarvitaan vielä yksi puhdistusvaihe. Myös tämä on työvaihe, jonka toteuttamiseen on kehitetty useita eri menetelmiä. Näitä menetelmiä ovat esimerkiksi uuttaminen ja saostaminen, elektroforeesi, sentrifugointi, dialyysi ja kromatografia. (Suominen ym. 2010.)

Nukleiinihappojen monistusreaktiot ovat herkkiä inhibitiolle, joka voi aiheutua huonosta erityksestä tai puhdistuksesta. Huono puhdistus voi aiheuttaa vääriä negatiivisia tai positiivisia tuloksia. Erilaisille eristysmenetelmille yhteistä on usein detergenttien käyttö. Lähes kaikissa menetelmissä yhtenä komponenttina toimii detergentsi. Erityisesti solukalvon lipidiosien hajottamisessa käytetään detergentejä. Proteiinien puhdistuksessa

detergentit hajottavat solujen kaksoislipidikerroksen ja saattavat niihin sitoutuneet kalvoproteiinit liukoiseen muotoon. (Suominen ym. 2010.)

RNA eristystä käytetään, kun näytteestä halutaan eristää solusta ribonukleiinihappoa. Tämä on työvaihe, joka voidaan tehdä monin eri tavoin. Eristystavan valinta riippuu näytemateriaalista sekä siitä mitä näytteestä halutaan tutkia. DNA:n ja RNA:n eristystavat eroavat toisistaan, ja esimerkiksi sillä kuinka paljon- tai kuinka puhdasta nukleiinihappoa halutaan eristää, on merkitystä eristystavan valinnassa. RNA-fragmentit ovat lyhyitä DNA:han verrattuna, joten ne kestävät paremmin mekaanista käsittelyä. RNA:n eristyksessä proteiinien poisto on tärkeää ja se on syytä tehdä huolellisesti, sillä RNA on usein sitoutunut tiukasti proteiineihin. Joskus RNA-eristys vaatii lisäksi reaktioon RNAasi-inhibiittoreita, joiden tehtävänä on estää ribonukleaaseja, jotka hajottavat RNA:ta nopeasti. (Suominen ym. 2010.)

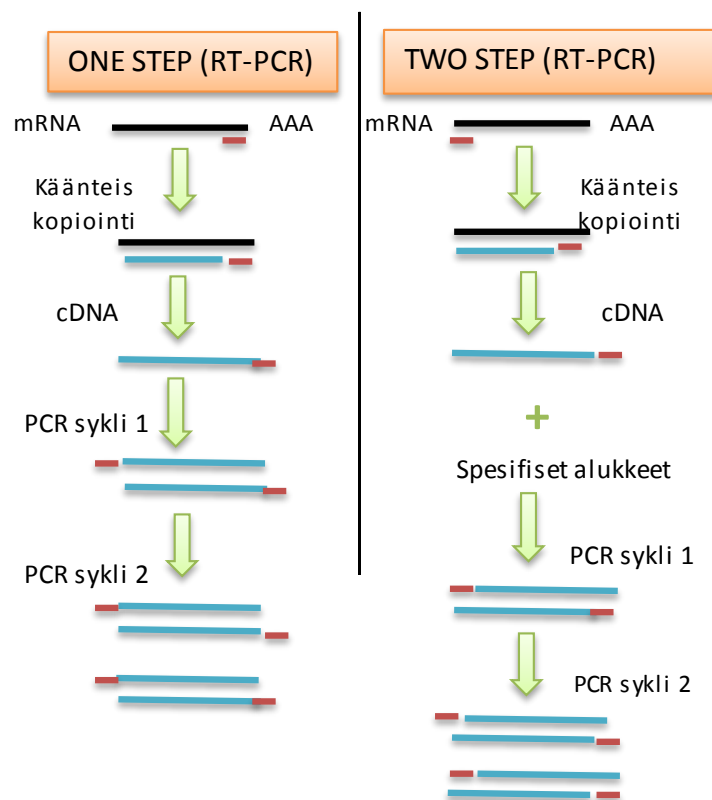
3.2 RT-PCR-menetelmä

PCR-menetelmä eli polymeerasiketjureaktio mahdollistaa yhden yksittäisen DNA-molekyylin kopioinnin ja monistamisen miljooniksi kopioiksi. PCR-reaktio tarvitsee toimiakseen näytteen eli monistettavan DNA:n, alukkeet, DNA-polymeerasin, nukleotidejä, puskuriliuoksen sekä ioneja. Yleisesti ottaen polymeerasiketjureaktio sisältää kolme sykliä, joita toistetaan haluttu määrä. Ensimmäinen kolmesta vaiheesta on DNA:n denaturointivaihe, jossa lämpötila nostetaan niin korkealle, että DNA juosteet eroavat toisistaan. Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa lasketaan, jotta alukkeet sitoutuvat nyt yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Kolmas vaihe nostaa lämpötilan polymeerasin toiminnan kannalta optimaaliseksi, jolloin yksijuosteinen DNA syntetisoituu taas kaksijuosteiseksi. Viimeisessä syklissä kolmas vaihe on usein hieman pidempi, jotta voidaan varmistua, että kaikki yksijuosteinen DNA muuttuu taas kaksijuosteiseksi. (Bustin 2004:51-53; Suominen ym. 2010; Ranki-Pesonen: 1994)

Reaaliaikainen käänteiskopiointi polymeerasiketjureaktio eli RT-PCR perustuu PCR reaktion toimintaan. Sen aikana monistumisen nopeutta ja DNA:n määrää voidaan kuitenkin seurata merkkiaineiden avulla reaaliajassa ja dataa kerätään koko reaktion ajan (Mikrobioni: 2012). Nykypäivänä RT-PCR on yksi eniten käytetty molekyylibiologian menetelmä (Bustin 2004:51). Menetelmä on tarkoitettu RNA:n käänteiskopiointiin ja monistukseen. Sen toiminta perustuu käänteiskopioijaentsyymiin (engl. *reverse transcriptase*, RT) ja polymeerasiketjureaktioon. Reaaliaikaisessa käänteiskopiointi PCR-

reaktiossa, ennen komplementaarisen DNA:n eli cDNA:n monistumisvaihetta tapahtuu RT-reaktio. Reaktion aikana RNA:sta tuotetaan yksijuosteista cDNA:ta RT-entsyymin avulla. Kokonaisuudessaan reaktio koostuu vaiheista, joista ensimmäisessä käänteiskopioija tuottaa yksisäikeisestä RNA:sta kaksijuosteisen RNA-DNA-hybridin. Tämä tuotettu DNA-juoste toimii PCR reaktiossa templaatti-DNA:na, jolloin tuotteena saadaan kaksijuosteista DNA:ta. Mitä korkeampi on tutkitun näytteen kopioluku, sitä nopeammin havaitaan nousua fluoresenssissa. (Bustin 2004:58; qPCR Guide)

Käänteiskopiointi ja cDNA:n monistaminen voidaan toteuttaa yksivaiheisena (one-step) tai kaksivaiheisena (two-step). Näiden vaiheiden erona on se, että yksivaiheisessa reaktiossa RT-reaktio tapahtuu samassa putkessa cDNA:n monistumisreaktion kanssa. Kaksivaiheisessa reaktiossa cDNA syntetisoidaan ensin RT-reaktiossa, jonka jälkeen syntetisoitua cDNA:ta käytetään PCR-reaktiossa monistettavana kohteena. (Bustin 2004:52–53). Reaktion kulku ja vaiheiden erot on esitelty kuviossa 3.



Kuvio 3. RT-PCR reaktion kulku sekä yksivaiheisen ja kaksivaiheisen reaktion erot. Mukailleen Bustin 2004.

Reaktioiden ilmestyminen perustuu joko koetinkemiaan tai kaksijuosteisen DNA:n havainnointiin fluoresoivilla väriaineilla. Yleisesti käytössä on SYBR Green väri, joka si-

toutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han. Koetinkemiaa puolestaan voidaan hyödyntää, mikäli halutaan tarkkailla spesifisempää tietyn kohdegeenin monistumista. RT-PCR reaktioihin voidaan myös liittää sulamiskäyräanalyysi, jonka avulla voidaan varmistaa monistustuotteen oikea koko. Tuotteiden sulamislämpötilaksi kutsutaan hetkeä, jossa DNA:n kaksoisjuosteet avautuvat ja fluoresenssi laskee äkillisesti kokonaan. Sulamislämpötila vaihtelee sen mukaan, minkä pituinen on monistustuote tai kuinka nukleotidit ovat siihen sitoutuneet. Jotta voidaan varmistua, että monistunut lopputuote on oikea, täytyy sulamislämpötilan mukaan muodostuneiden käyrien piikkien olla samassa pisteessä. (Bustin 2004:52–53.)

3.3 SIBA®-teknologia

Strand Invasion Based Amplification, SIBA®-teknologia, on Orion Diagnostican omistama isotermaalinen nukleiinihappojen monistusteknologia (Orion Diagnostica Oy: 2014). Isotermaaliset monistusmenetelmät pohjautuvat tasaiseen lämpötilaan ja hyödyntävät erilaisia entsyymejä geenien monistamisessa. SIBA®-teknologia on RNA:n ja DNA:n monistustekniikka, joka perustuu kaksoisjuosteen invaasioon ja toimii tasaisessa 41 asteen lämpötilassa. Isotermaaliset nukleiinihappojen monistusmenetelmät tarjoavat merkittäviä etuja vakiintuneeseen polymeerasiketjureaktioon verrattuna, sillä ne eivät vaadi laitteita, jotka kykenevät nostamaan ja laskemaan lämpötilaansa nopeasti. SIBA®-menetelmän etuna on sen korkea herkkyys. Lisäksi menetelmä on spesifinen. (Eboigbodin – Hoser: 2015.)

Reaktiossa tapahtuva yksijuosteisen keskioligon invaasio kaksoisjuosteen kohdesekvenssiin tapahtuu rekombinaasientsyymien ja ATP:n eli adenosiinifosfaatin toimesta. Kun keskioligo kiinnittyy kaksoisjuosteeseen, juoste avautuu ja kohde-spesifiset alukkeet pääsevät kiinnittymään. Polymeerasientsyymi toimii reaktiossa pidentäen alukkeita kiinnittämällä nukleotidejä alukkeista lähtien. Tämän jälkeen keskioligo irtoaa. Seuraavassa vaiheessa se kiinnittyy uuteen kohdesekvenssiin, jonka jälkeen sykli toistuu uudelleen. Edellä mainitut reaktiot aikaansaavat kohdesekvenssin monistumisen eksponentiaalisesti. SIBA®-reaktiolle ominainen keskioligo on kahta päätyaluketta pidempi ja osittain komplementaarinen kohdesekvenssin kanssa. Päätyalukkeiden on myös oltava ainakin osittain yhteensopivia kohdesekvenssin kanssa. (Hoser – Mansukoski – Morrical – Eboigbodin: 2014.)

SIBA®-teknologia kykenee erottamaan myös lähisukuiset lajit vain yhden molekyylin herkkyydellä yksinkertaisella ja edullisella laitteistolla. SIBA®-teknologialla on ominaisuuksia, jotka tekevät siitä resistentin epäspesifiselle monistumiselle. Alukkeet eivät voi aikaansaada reaktiota ja kohdesekvenssin monistumista ilman keskioligoa, sillä ne eivät ole substraatteja rekombinaasientsyymille. Keskioligon toisessa päässä oleva 2'-O-metyyli-RNA estää keskioligoa toimimasta alukkeena. Reaktiota voidaan seurata reaaliaikaisesti fluoresoivien merkkiaineiden avulla qPCR-laitteilla. (Hoser ym. 2014).

SIBA®-reaktion voi suorittaa käyttämällä märkäreagensseja tai kylmäkuivattuja reagensseja. SIBA®-reaktioon tarvittavia reagensseja ovat keskioligon ja alukkeiden lisäksi polymeraasientsyymi, rekombinaasientsyymi, rekombinaasin kofaktorit sekä kreaatiinifosfokinaasi ja tris-fosfokreatiini. Kaksi viimeiseksi mainittua reagenssia tuottavat reaktiolle välttämätöntä ATP:tä. Rekombinaasin käyttäessä ATP:tä, muodostuu reaktioon ylimääräistä fosfaattia, joka voi inhiboida reaktiota. Tästä syystä reaktiossa käytetään myös komponentteja, joiden tehtävänä on sitoa ylimääräinen fosfaatti inhiboimasta reaktiota. Näitä komponentteja ovat sakkaroosifosforylaasi sekä sakkaroosi, joilla on fosfaattia sitovia ominaisuuksia. Rekombinaasin toimintaan reaktio tarvitsee gp32-proteiinia sekä polyetyleeniglykolia eli PEG:iä. (Hoser ym. 2014.)

SIBA®-teknologiaa hyödyntää Orion Diagnostican Orion Genread, johon kuuluu pieni itsenäinen laite sekä käyttövalmiit testipakkaukset. Laite on suunniteltu soveltumaan monenlaisiin laboratorioympäristöihin ja se on tarkoitettu nimenomaan patogeenien nopeaan tunnistamiseen. Laite voi yhdellä käyttökerralla määrittää 1-12 näytettä. Tällä hetkellä Orion Diagnostica Oy tarjoaa SIBA®-teknologiaan perustuvia Orion Genread analysointitestejä ulostenäytteistä määritettävien *Clostridium Difficile*n ja *Kampylobakterin* diagnosointiin. (Orion Diagnostica Oy: 2014.)

4 Detergentit

Detergentit ovat pintajännitystä vähentäviä aineita, joiden ominaisuuksia hyödynnetään esimerkiksi pesuaineissa. Detergenttejä kutsutaan usein myös tensideiksi tai surfaktanteiksi. Detergenttien toiminta perustuu niiden molekyyliarakenteeseen ja pyrkimykseen kerääntyä faasien rajapinnoille. Molekyylibiologiassa detergenttien käyttökohteita ovat usein proteiinien puhdistus, nukleiinihappojen eristys tai näytteiden liuottaminen tai solujen hajottaminen. Detergenttejä voidaan myös käyttää estämään reagenssien saostumista tai epäspesifistä sitoutumista. (Caligur: 2008.)

Detergenttien rakenne koostuu rasvahakuisesta eli hydrofobisesta loppuosasta ja vesihakuisesta eli hydrofiilisesta päästä. Hydrofobinen pää on usein hiilivetyketju joka sisältää noin 8-20 hiiliatomia. Hydrofiilinen pää on puolestaan tyypillisesti jokin funktionaalinen pääteryhmä. Hydrofiilisen pään pääteryhmän mukaan detergentit voidaan jaotella ryhmiin. Tyypillisin tapa on luokitella detergentit anionisiin, kationisiin, kahtaisionisiin ja ionittomiin detergenteihin. (Caligur: 2008.)

Detergenttien ryhmät eroavat toisistaan hieman. Ionisilla detergenteilla on varautunut pääryhmä. Tämä ionisen detergentin pääryhmä voi olla joko negatiivisesti tai positiivisesti varautunut. Yleisesti käytettyjä ionisia detergentejä ovat esimerkiksi SDS eli natriumdodekyylisulfaatti ja sarkosyyli. Ioniset detergentit muokkaavat proteiinin rakennetta ja hajottavat niiden välisiä sidoksia enemmän kuin neutraalisti varautunut detergentti. Tämä luo haasteita ionisten detergenttien käyttöön nukleiinihappomonistusreaktioissa. Ionisia detergentejä pidetäänkin biologisilta ominaisuuksiltaan voimakkaina ja kovina aineina. Ioniset detergentit ovat erityisen herkkiä pH:n muutoksille. (Caligur: 2008.)

Ionittomia detergentejä sanotaan myös neutraaleiksi detergenteiksi, ja ne ovat biologisilta ominaisuuksiltaan miedompia, kuin ioniset detergentit. Näillä detergenteilla on varaukseton hydrofiilinen pääryhmä. Niillä ei ole sähkövarausta ja ne toimivat alhaisissa lämpötiloissa, eivätkä ole erityisen herkkiä veden kovuudelle. Ne eivät myöskään denaturoi proteiineja tai hajota niiden välisiä sidoksia kuten ioniset detergentit. Ionittomat detergentit hajottavat lipidien ja proteiinien tai pelkkien lipidien välisiä sidoksia. Tilanteissa, joissa proteiinin aktiivisuus halutaan säilyttää, on usein käytössä ioniton detergentti. Ionittomia detergentejä käytetään yleisesti solujen hajottamisessa korkeintaan 5 % pitoisuuksina, jolloin ne eivät ole riittävän voimakkaita rikkomaan solun tumakalvoa. Ne kuitenkin kykenevät rikkomaan solukalvon ja vapauttamaan solun sisäiset materiaalit kuten proteiinit ulos solusta. (Caligur: 2008).

Kahtaisioniset detergentit muistuttavat ominaisuuksiltaan sekä ionisia että ionittomia detergentejä. Kahtaisioniset detergentit eivät denaturoi proteiineja yhtä rajusti kuin ioniset ja ne sisältävät sekä positiivisen että negatiivisen varauksen. Tällöin molekyyli on varaukseton. Ne ovat kovempia ja tehokkaampia kuin ionittomat detergentit, sillä ne häiritsevät proteiinien välisiä sidoksia ja vähentävät aggregaatiota. (Caligur: 2008.)

Hydrofiilistä pääteryhmää käytetään usein apuna oikean detergentin valinnassa haluttuun tarkoitukseen. Ei kuitenkaan ole olemassa ideaalia detergenttiä kaikkiin molekyy-

libiologiisiin sovelluksiin, vaan parhaan tuloksen saavuttaa usein vain kokeilemalla. Ominaisuuksiltaan hieman erilaisten detergenttien yhdistäminen on usein kokeilun arvoinen vaihtoehto. (Caligur: 2008; Johnson 2014; Applichem 2008.)

Detergenteille voidaan niiden ominaisuuksien esittämisen helpottamiseksi määrittää kriittinen misellinmuodostuskonsentraatio, CMC-arvo (engl. *Critical Micelle Concentration*), jonka ylittyessä detergentit alkavat muodostaa misellejä. Misellit ovat pallomaisien molekyylien muodostamia lipidirakenteita yleensä vesiliuoksessa. Vesiliuoksessa muodostuvat misellit ovat tasapainossa sitä ympäröivän aineen kanssa, sillä detergentin konsentraation kasvaessa molekyyliä pakkautuu sen rajapinnalle, josta aiheutuu vesifaasin pintajännityksen lasku. Tämä johtuu detergenttimolekyylien pyrkimyksestä asettua niin, että sen hydrofiilinen pää sijoittuu vesifaasiin ja toinen, hydrofobinen pää osoittaa toisen faasin suuntaan. Jos detergentin konsentraatio kasvaa lisää, pakkautuu molekyyliä rajapinnoille yhä enemmän ja pintajännitys laskee entisestään. (Caligur: 2008; Johnson 2014.)

Yksinkertaistettuna voidaan sanoa, että mitä matalampi CMC-arvo on, sitä stabiilimpi on muodostunut miselli. Tämä johtuu detergentin pidemmästä hiilivetyketjusta, joka saa aikaan isomman misellin, jolloin molekyylien kulkeutuminen sisään tai ulos on hitaampaa. Tällöin sen muodostumiseen tarvitaan myös vähemmän detergenttimolekyyliä ja pienempi detergentin konsentraatio riittää proteiinien ja lipidien liuotukseen. Korkeampi CMC-arvo puolestaan kertoo detergentistä, jonka hydrofobinen sitoutuminen on heikompaa ja näin ollen nämä aineet eivät ole detergentteinä yhtä tehokkaita. Ionisten detergenttien CMC-arvo on yleensä suurempi kuin ionittomien detergenttien. Detergenttien kanssa täytyy myös muistaa, että tuoreiden liuosten käyttö on suositeltavaa, jotta vältetään liuoksen tahattomalta hydrolysoitumiselta tai hapettumiselta. (Caligur: 2008; Johnson 2014; Applichem 2008.)

5 Opinnäytetyön tavoite

Opinnäytetyön kokeellinen osuus tehtiin, koska Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä haluttiin saada alustavaa tietoa ulosteperäisten RNA-analyyttien näytteenkäsittelystä. Näytteenkäsittely on yksi keskeisimmistä asioista norovirusdiagnostiikkaa kehitettäessä. Alustavien tutkimustulosten mukaan Orion Diagnostica Oy:n kaupallinen Orion Genread *Clostridium Difficile* bakteerin tunnistamiseen tarkoitettu testi ja sitä varten suunniteltu näytteenkäsittely eivät ole optimaalisimpia noroviruksen diagnostiikkaan.

Kyseinen näytteenkäsittelymenetelmä on kehitetty bakteeri-DNA:lle. Bakteeri-DNA eroaa ominaisuuksiltaan tässä opinnäytetyössä tutkimuksen kohteena olevasta virus-RNA:sta. Voidaankin päätellä, että bakteerille kehitetty näytteenkäsittelymenetelmä ei ole optimaalinen RNA-virukselle, vaikka molempia edellä mainittuja taudinaiheuttajia määritetään ulostenäytteestä. *C. difficile* bakteeria varten kehitettyä näytteenkäsittelyä on kuitenkin käytetty soveltuvin osin opinnäytetyön laboratorio-osuudessa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää alustava detergentteihin pohjautuva näytteenkäsittelyprotokolla noroviruksen nukleiinihappomonistusta varten. Tavoitteena oli määrittää näytteenkäsittelyn olosuhteet ja tehdä noroviruksen näytteenkäsittelylle optimaalisia reagenssivalintoja. Näytteenkäsittely suunniteltiin yhteensopivaksi kylmäkuivattujen SIBA®-reagenssien kanssa. Lopullinen diagnostinen testi sisältää kylmäkuivatut reagenssit, joihin käsitelty näyte lisätään. Tavoitteeni tälle opinnäytetyölle oli kehittää optimaalinen näytteenkäsittelyvaiheen työnkulku ja löytää näytteenkäsittelyreagenssit, jotka vastaavat ulosteen näytemateriaalina asettamiin haasteisiin ja toimivat optimaalisesti noroviruksen näytteenkäsittelyyn. Opinnäytetyö vastaa seuraaviin tutkimuskysymyksiin.

- Kuinka detergenttipohjainen näytteenkäsittely toimii noroviruksen kanssa?
- Minkälainen on optimaalinen noroviruksen näytteenkäsittelyn työnkulku?
- Kuinka detergentit käyttäytyvät ulosteen ja RNA-viruksen kanssa ja voiko niiden kautta parantaa monistusreaktiota?

Kaikki edellä luetellut kysymykset käsitellään tässä opinnäytetyössä. Yhtenä opinnäytetyön tavoitteena oli myös tehdä laadukas ja asianmukaisesti dokumentoitu tutkimus, jonka tuloksia voidaan hyödyntää Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen töissä myös tulevaisuudessa, jos norovirusdiagnostiikan kehittämistä halutaan jatkaa. Tavoitteena oli, että opinnäytetyöstä saatuja tuloksia voidaan hyödyntää myös muiden taudinaiheuttajien diagnostiikkaa ja näytteenkäsittelyä kehitettäessä. Lisäksi työn tavoitteena oli laatia tasokas opinnäytetyö, joka esittelee kattavasti tutkimuksista saadut tulokset ja työn suorituksen etenemisen. Raportin sisältämä teoriatieto suunniteltiin tukemaan työn laboratorio-osuutta. Tarkoituksena oli pohtia työssä vastaan tulleita haasteita ja ongelmatilanteita sekä työn luotettavuutta ja mahdollisten ongelmien syitä.

6 Opinnäytetyön suoritus

6.1 Näytemateriaalit

Ulostenäytteet

Osassa opinnäytetyön laboratoriotöissä käytettiin näytemateriaalina muovisiin, tilavuudeltaan 5 ml, näyteputkiin pakastettuja ulostenäytteitä. Ulostenäytteitä säilytettiin -25°C pakastimessa. Näytemateriaali sulatettiin aina haluttuja tutkimuksia varten. Ulostenäytteitä käyttämällä tavoiteltiin mahdollisimman todellisuutta vastaavia tutkimusolosuhteita. Oletuksena ennen laboratoriotöiden aloittamista oli, että ulostenäytteet eivät sisältäneet norovirusta. Näytteet oli Orion Diagnostica Oy:n toimesta analysoitu rinoviruksen ja rotaviruksen osalta negatiivisiksi. Norovirusta ulostenäytteistä ei ollut analysoitu, joten ennen tutkimuksia ei voitu pitää varmuutena sitä, että näytemateriaali oli noroviruksen osalta negatiivista.

Tutkimuksissa käytetyt ulosteet olivat alkuperältään Fimlab Laboratoriot Oy:n potilasnäytteitä. Käytetty näytemateriaali oli sekoitettu monen eri näytteenantajan ulosteesta. Tämä oli tehty, sillä ulosteen ominaisuudet vaihtelevat suuresti. Tällä tavalla voitiin minimoida ulosteen koostumuksesta ja sisällöstä riippuvat vaihtelut, joilla saattoi olla vaikutuksia saatuihin tuloksiin, kun haluttiin verrata eri näytteenkäsittelyjä keskenään alkuvaiheen tutkimuksissa. Näytteet antaneista henkilöistä ei ollut käytettävissä minkäänlaisia taustatietoja. Käytetyt näytteet olivat hyvin tasalaatuisia ja ne merkitty juoksevin numeroin. Tutkimuksessa käytetty ulostenäytteen numero kirjattiin työohjeeseen, jotta tulokset ovat jäljitettävissä.

Noroviruskontrollipartikkelit

Näytteenkäsittelyn kehityksessä käytettiin kaupalliselta toimittajalta (Zeptomatrix Corporation), tilattuja noroviruskontrollipartikkeleita, jotka lisättiin ulostenäytteisiin. Käytössä oli NATtrol™ Norovirus Group I ja NATtrol™ Norovirus Group II partikkeleita, jotka edustivat noroviruksen kahta genotyyppiä. Valmistajan toimittaman tuoteselosteen mukaan käytetyt noroviruskontrollipartikkelit oli muodostettu puhdistetuista ja ehjistä rekombinaation kautta rakennetuista viruspartikkeleista. Viruspartikkelit oli muunneltu inaktiivisiksi, jotta niitä on turvallista käsitellä laboratorioissa ilman tartuntariskiä. Partikkeleihin oli lisätty puhdistettua proteiinia, jonka avulla pyrittiin jäljittelemään kliinistä

näyttemateriaalia. Valmistaja ei ilmoittanut viruspartikkeleiden pitoisuuksia tai kopiolukuja. Noroviruskontrollipartikkelien säilytyslämpötilaksi valmistaja suositteli 2-8°C lämpötilaa. Opinnäytetyön tutkimusten ajan viruspartikkelit säilytettiin jääkaapissa 4°C lämpötilassa. Laboratoriotyöskentelyn ajan viruspartikkeliputket pidettiin viileässä jäähauteessa laminaarikaapissa.

Kaupallisen viruksen käyttöön on perusteita siksi, että ihmisellä esiintyviä noroviruskantoja ei pystytä nyky menetelmillä kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa. Lisäksi, aktiivisen noroviruksen käyttäminen laboratoriossa aiheuttaa suuren tartunta ja kontaminaatio riskin. Helpon tarttuvuuden takia tällaisten kaupallisten inaktiivisten noroviruspartikkeleiden käyttäminen on järkevää näin aikaisessa tuotekehitysvaiheessa. Aktiivista virusta tutkittaessa käytössä on tyypillisesti mallivirus, joka on usein peräisin koirasta, kissasta tai hiirestä. Tässä opinnäytetyössä käytetyn muunnellun viruksen tapaan mallivirus vastaa kaikilta ominaisuuksiltaan ihmisillä esiintyvää norovirusta. (Salo – Rättö – Tsiko – Miettinen: 2013)

6.2 Detergenttien valinta ja valmistaminen

Detergenttipohjaisen näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen aloitettiin tutkittavien detergenttien valinnalla. Detergenttien valinta vaati paljon taustatyötä ja perehtymistä kaupallisten toimittajien tarjoamiin tuotteisiin. Detergenttien valinnassa oli otettava huomioon myös asiakkaan tarpeet. Tästä syystä detergentit, joiden säilyvyysaika oli lyhyt, jouduttiin hylkäämään heti opinnäytetyön alussa. Myös sellaiset detergentit, jotka suositeltiin liuotettuina säilyttämään pakastelämpötilassa, jouduttiin hylkäämään jo ennen tarkempia tutkimuksia. Asiakaslähtöisestä ajattelutavasta piti pitää alusta lähtien kiinni, sillä lyhyt säilyvyys tai pakastelämpötilassa säilytettävä testi ovat hankalia käyttäjälleen.

Lopulta edellä mainittujen perusteiden mukaisesti erilaisia detergentejä valittiin näytteenkäsittelyn tutkimuksiin ja detergenttiventailuihin yhteensä 11 kappaletta. Taulukossa 1 on listattu kaikki tutkimuksiin valitut detergentit nimillä, joita niistä tässä opinnäytetyössä käytetään. Taulukosta löytyy lisäksi detergentin luokitteluryhmä sekä CMC-arvo eli detergentin kriittinen misellinmuodostuskonsentraatio.

Taulukko 1. Taulukossa on listattuna kaikki opinnäytetyön näytteenkäsittelyn testauksiin valitut detergentit, detergentin ryhmä sekä CMC-arvo.

Detergentin lyhenne	Ryhmä	CMC
Brij C10	Ioniton	0,002 mM
Brij 58	Ioniton	0,008 mM
Tween 80	Ioniton	0,012 mM
Tween 20	Ioniton	0,06 mM
IGEPAL CA-630	Ioniton	0,08 mM
Brij L23	Ioniton	0,09 mM
C13E10	Ioniton	0,125 mM
Tergitol NP40	Ioniton	0,14-0,29 mM
Brij O10	Ioniton	0,22 mM
Triton x 100	Ioniton	0,2 -0,9 mM
C7BzO	Kahtaisioninen	ND

Jatkotutkimuksiin valittujen 11 detergentin lisäksi kaupallisilta toimittajilta tilattiin viittä muuta detergenttiä, jotka jouduttiin rajaamaan pois tutkimuksista, sillä opinnäytetyön laboratorio-osuus piti ehtiä tehdä sille määritetyn ajan puitteissa. Jos tutkimusta jatketaan tulevaisuudessa, myös nämä valitut viisi detergenttiä on hyvä ottaa mukaan kokeisiin. Tarkka lista kaikista tutkimuksia varten tilatuista detergenteistä on tarkasteltavissa tämän opinnäytetyön liitteessä 1. Liitteestä voi myös tarkastella detergenttien kemiallisia nimiä, sillä tässä opinnäytetyössä detergenteistä käytetään yleisemmin käytössä olevia lyhenn nimiä.

Lähes kaikki opinnäytetyön kokeita varten tilatut detergentit saapuivat laboratorioon kiinteänä aineena huoneenlämmössä. Kiinteän aineen koostumus riippui detergentistä ja vaihtelua oli hienojakoisesta jauheesta lähes nestemäiseen liimamaiseen koostumukseen tai suuriin rakeisiin. Koostumuksesta riippumatta detergentti punnittiin, jonka jälkeen se liuotettiin tiettyyn määrään suodatettua nukleiinivapaata vettä.

Kaikista opinnäytetyössä tutkituista detergenteistä valmistettiin ensin suurempia eriä 10 % liuosta. Tästä liuksesta valmistettiin työn edetessä tarvittavia jatkolaimennoksia ja liuoksia. Suuremmat erät kiinteästä detergentistä valmistettiin etukäteen detergentin

saapuessa, jotta näytteenkäsittelyä valmisteltaessa voitiin säästää aikaa ja vaivaa. Osa detergenteistä liukeni veteen erittäin huonosti. Täydellinen liukeneminen saattoi viedä muutaman päivän, ja osan detergenteistä kohdalla liuotusvaihe vaati myös kevyttä kuumentamista tai jatkuvaa sekoittamista. Kaikki 10 % detergenttiliuokset säilytettiin jääkaapissa tutkimusten välillä. Opinnäytetyön päivittäisissä tutkimuksissa käytetyt alle 10 % detergenttiliuokset sekä kaikki detergentin ja muun aineen seokset valmistettiin aina samana tai edellisenä päivänä ennen laboratoriokokeiden aloittamista. Tällä toimenpiteellä haluttiin varmistaa, että käytetty reagenssi oli aina tuoretta ja puhdasta.

6.3 Viruspartikkeleiden kopiolukujen määrittäminen

Opinnäytetyön alussa kaupallisten noroviruskontrollipartikkeleiden kopioluvun määrittämistä varten oli alkuperäisen työsuunnitelman mukaan tarkoituksena käyttää Ampli-run® Vircell (Vircell Microbiologists) norovirus RNA-kontrollia, sillä sen pitoisuus oli ennalta tiedossa. Valmistaja ilmoittaa RNA:n pitoisuudeksi tarkan määrän väliltä 12 500–20 000 kopiota mikrolitrassa liuotettuna valmistajan ilmoittamaan tilavuuteen. Valmistajan tuoteselosteen mukaan RNA sisältää puhdistetun noroviruksen genomia ja on suunniteltu käytettäväksi kontrollina nukleinihappomonistukseen perustuvissa testauksissa. Kontrolleja valmistettiin niin, että niiden pitoisuudet reaktiossa olivat 10, 100 ja 1000 kopiota. Työsuunnitelman mukaan kaupallisten partikkeleiden pitoisuus olisi määritetty tekemällä standardisuora kontrolleista, ja laskemalla kontrollipartikkeleiden pitoisuus.

Suunnitelma ei toteutunut, sillä yksikään tutkimusta varten tehdyistä RNA-kontrollilaimennoksista ei monistunut lainkaan RT-PCR-reaktiossa. Muut reaktiot olivat onnistuneita. Jokainen laimennos molemmista genotyypeistä kaupallisia noroviruskontrollipartikkeleita monistui reaktiossa hyvin. Reaktiossa mukana ollut positiivinen kontrolli monistui myös normaalisti. Negatiivinen kontrolli oli negatiivinen, kuten pitikin. Myös uudelleen toistetun tutkimuksen perusteella tämä menetelmä kaupallisten partikkeleiden kopiolukujen määrittämistä varten oli hylättävä. Saatu tulos saattoi johtua siitä, että kyseiset kontrollit eivät olleet yhteensopivia käytettyjen RT-PCR-reagenssien kanssa.

Käytössä olleiden kaupallisten partikkeleiden kopiolukujen määrittämiseen oli kuitenkin olemassa myös muita vaihtoehtoja. Koska kaupallinen RNA ei toiminut, tavoitteena oli tehdä samanlainen standardisuora itse eristetystä RNA:sta. Eristämiseen käytettiin QIAamp Viral RNA Minikit reagenssipakkausta (Qiagen). Työ suoritettiin reagenssipak-

kauksen sisältämiä valmistajan ohjeita noudattaen. RNA:ta eristettiin molemmista tutkimuskäyttöön suunnitelluista noroviruksen genotyypeistä. Valmistajan mukaan käytetty menetelmä sopii useiden eri virusten RNA:n eristämiseen. Eristäminen voidaan tehdä plasmasta, seerumista tai muista soluvapaista eritteistä. Käytetty eristysmenetelmä perustuu siihen, että solut hajotetaan, RNA sitoutuu membraaniin spinikolonneissa ja epäpuhtaudet pestään pois. Eristysprotokollaa noudatettiin ja työ suoritettiin nukleiinihappoeristykseen varten suunnitellussa laboratoriotilassa. RNA-eristuksen työohje ja tarkempi työnkulku on nähtävissä liitteessä 3.

Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen laboratoriotiloissa olivat käytössä NanoDrop (Thermo Fischer) sekä Qubit (Thermo Fischer) -laitteet. Mittausta kokeiltiin molemmilla laitteilla, mutta lopulta myös nämä vaihtoehdot jouduttiin rajaamaan pois. NanoDrop -laite on spektrofotometri, jonka herkkyys ei riitä matalien nukleiinihappokonsentraatioiden mittaamiseen. Noroviruksen RNA:n kanssa laite ei antanut lainkaan tulosta. Negatiivinen tulos johtui luultavasti siitä, että tutkimuksen kohteena olleen RNA:n kopioluku ei sijoittunut sille välille, jolla laite luotettavasti määrittää tuloksen. Qubit -laite on fluorofotometri, josta syystä se eroaa mittausominaisuuksiltaan NanoDrop -laitteesta. Laitteen käyttöjärjestelmää ei ollut päivitetty määrityksessä käytettävälle RNA-reagenssipakkaukselle, eikä sen antamia tuloksia tästä syystä voitu pitää luotettavina. Lopulta tultiin siihen tulokseen, että aikarajojen puitteissa detergenttipohjaisten näytteenkäsittelyiden testaus oli syytä aloittaa ennen käytettyjen noroviruskontrollipartikkelien kopiolukujen määrittämistä.

6.4 Näytteenkäsittely

6.4.1 Viruspartikkelien laimentaminen

Opinnäytetyön näytteenkäsittelytutkimukset aloitettiin kaupallisten noroviruskontrollipartikkelien laimentamisella haluttuun pitoisuuteen. Koska käytettyjen virusten kopiolukuja ei voitu määrittää, tehtiin viruspartikkeleista laimennossarja. Partikkelit laimennettiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen eli PBS-puskuriin (engl. *Phosphate-buffered saline*).

Noroviruskontrollipartikkelilaimennosta pyrittiin valmistamaan aina vain tutkimuksessa tarvittava määrä. Tämä määrä riippui kokeeseen valikoiduista reaktioista ja esimerkiksi siitä kuinka montaa eri detergenttiä tai olosuhdetta tutkittiin. Yhteen detergenttiä tai

muuta reagenssia sisältävään filtteriputkeen lisättiin 100 µl noroviruspartikkelilaimennosta, joten tarvittava määrä laskettiin sen mukaan. Ensimmäistä laimennosta tehtiin vain sen verran, että siitä oli mahdollista tehdä seuraava laimennos, jotta alkuperäistä kaupallista noroviruspartikkeliliuosta ei kuluisi reaktiossa ylimäärin. Laimennokset tehtiin aina yhtä RT-PCR-reaktiota varten ja yli jäänyt määrä laimennosta hävitettiin asianmukaisesti.

Ensimmäisessä laboratoriotyössä noroviruspartikkeleista tehtiin laimennossarja 1:10, 1:100, 1:1000 ja 1:10 000. Reaktioihin tutkitun detergentin kanssa valittiin 1:1000 ja 1:10 000 laimennokset. Tästä tutkimuksesta saatujen tulosten perusteella päädyttiin kokeilemaan hieman pienempää viruspartikkelilaimennosta. Seuraavaan tutkimukseen tehtiin laimennossarja vain 1:1000 asti. Tutkimuksiin valittiin 1:100 ja 1:1000 laimennokset. Tulosten perusteella nämä laimennokset näyttivät optimaalisilta jatkotutkimuksia ajatellen, ja niissä pysyttiin loppujen laboriokokeiden ajan. Tulokset on eritelty tarkemmin kappaleessa 7. Laimennokset pidettiin työtä jatkettaessa samoina, jotta saadut tulokset olivat keskenään vertailukelpoisia.

6.4.2 *C. difficile*n näytteenkäsittely

Opinnäytetyön ensimmäisiin laboriokokeisiin otettiin mukaan myös Orion Diagnostica Oy:n jo markkinoilla olevassa *Clostridium Difficile*n diagnosointiin tarkoitettussa Orion Genread testissä käytössä oleva näytteenkäsittely. *C. difficile* määritetään noroviruksen tavoin ulostenäytteestä, joten menetelmän toimivuutta oli olennaista kokeilla myös noroviruksen kanssa.

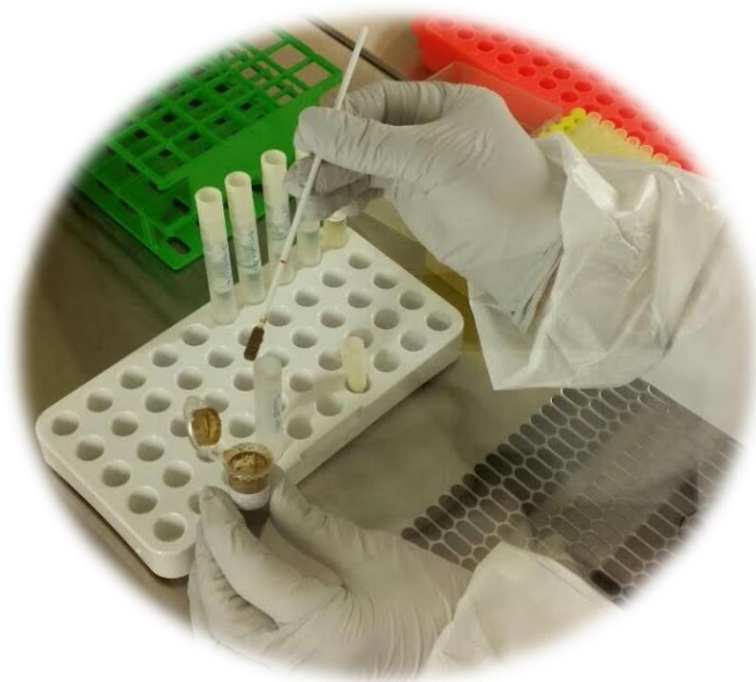
*C. difficile*n näytteenkäsittely suoritettiin kuten kaikki detergenttitutkimukset samoja työvaiheita noudattaen. Detergentin tilalle suodatinputkeen pipetoitiin *C. difficile*n näytteenkäsittelyliuosta. Tätä reaktioseosta ei tarvinnut valmistaa jokaista tutkimusta varten erikseen vaan sitä oli laboratoriossa valmiina liuksena. Tämän protokollan ja siinä käytössä olevan reaktioseoksen takia opinnäytetyön myöhempisiin tutkimuksiin valikoitui myös korkean konsentraation polyetyleeniglykoli, jonka toimivuutta tutkittiin myös eri detergenttien kanssa.

6.4.3 Näytteenkäsittelymenetelmä

Opinnäytetyön näytteenkäsittelyn kehittämiseen liittyvissä laboratoriokokeissa käytettiin pohjana Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen aiempia tutkimuksia. Orion GenRead *C. difficilen* näytteenkäsittelyn työnkulkua hyödynnettiin osittain näytteen suodatuksen, kuumennuksen, käytettyjen muovien ja ulosteenottotikun osalta. Myös aikaisempia detergenteillä ja viruksilla tehtyjä työsuunnitelmia hyödynnettiin näytteenkäsittelyä suunniteltaessa. Näytteenkäsittelyvaiheen laboratoriokokeissa oli käytössä suodatinputkia, joihin tutkittava reagenssi ja näyte pipetoitiin. Suodatinputken tarkoituksena oli siivilöidä ulosteesta RT-PCR-reaktiota häiritsevät ulosteen kiinteät partikkelit. Koska opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkastella nimenomaan filtteri-putkeen lisättäviä reagensseja, tämän vaiheen merkitys korostui opinnäytetyön laboratoriotöissä.

Filtteri-putken korkki avattiin ja näytteenkäsittely aloitettiin pipetoimalla putkeen 1500 µl detergenttiä tai muuta tutkittavaa reagenssia. Putket merkittiin sen mukaan mitä reagenssia ne sisälsivät. Tämän jälkeen reagenssin joukkoon pipetoitiin 100 µl laimennettuja noroviruskontrollipartikkeleita. Lähes jokaisessa opinnäytetyön tutkimuksessa reagenssitestauksia tehtiin kahdelle noroviruslaimennokselle eri konsentraatioissa. Tässä vaiheessa työtä samaa reagenssia sisältäviä suodatinputkia oli siis yleensä kaksi. Detergenttien nimillä merkityt putket merkittiin lisäksi noroviruslaimennosten mukaan. Tämän jälkeen putkeen lisättiin uloste. Ulostenäytettä otettiin näytepurkista siihen tarkoitettulla näytteenottotikulla. Näytteenottotikku koostui pitkästä helposti katkaistavasta varresta ja pienestä pehmeästä harjapästä. Harjapää kastettiin ulosteen joukkoon niin, että harjakset peittyivät kauttaaltaan. Käytetty näytteenottotikku ulosteenottohetkellä on nähtävissä kuviossa 4.

Kun näytteenottotikun harjapää oli kastettu ulosteen joukkoon, sitä puristeltiin ja pyyhittiin näyteputken reunoja vasten. Tällä haluttiin varmistaa, että ulostetta tuli näytteen sekaan vain pieni määrä. Rajana haluttuun ulosteen määrään pidettiin sitä, että tikun harjapään harjakset olivat havaittavissa ulostemassan läpi. Ulostetta ei siis saanut olla harjasten päällä paksuna mattona. Täytyi kuitenkin ottaa huomioon se, että ulosteen määrä ei tällä näytteenottotavalla ole stabiili tai jokaisessa näytteessä täysin sama. Toisaalta, uloste on näytemateriaalina muuttuva, jokaisen näytteenantajan uloste on koostumukseltaan ja rakenteeltaan erilaista, eikä tämä muuttuvuus saa vaikuttaa testin tulokseen.

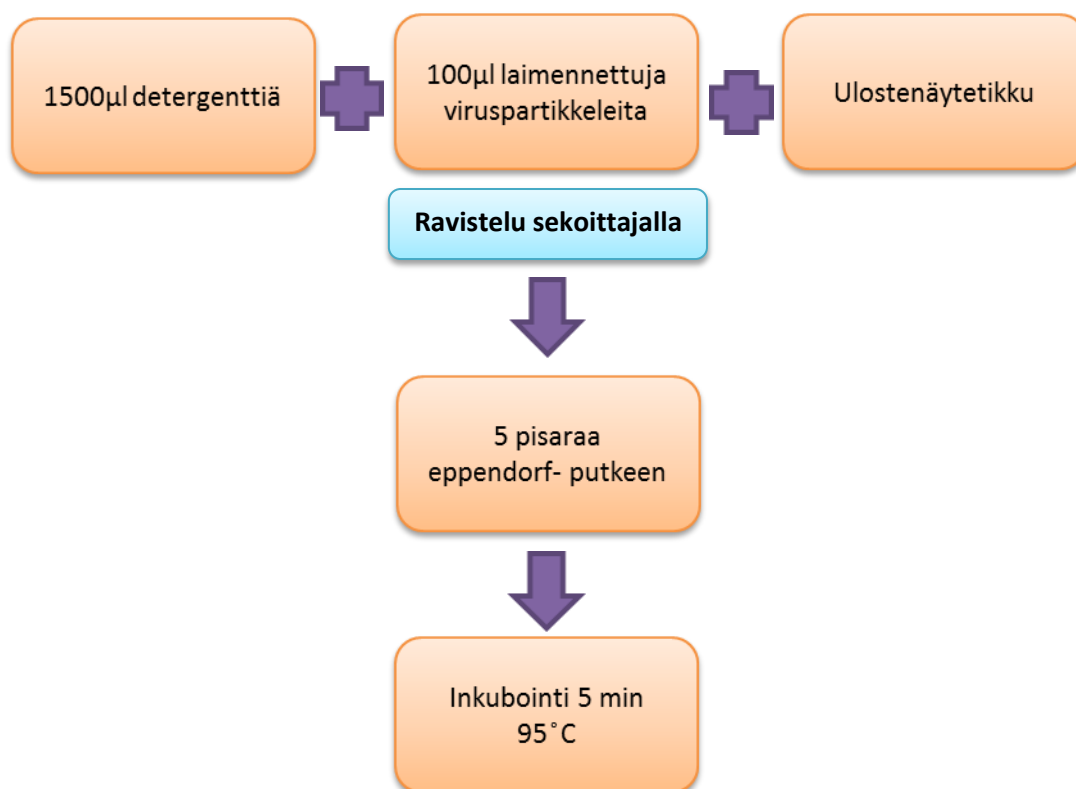


Kuvio 4. Kuviossa on nähtävissä näytteenkäsittelyvaiheessa käytössä ollut ulostenäytteenottotikku ja sen harjapään peittyneet harjakset.

Kehitetyn testin ja näytteenkäsittelyn täytyi olla sellainen, ettei ulosteen määrällä ole suurta vaikutusta lopputulokseen. Kun ulostetta oli tikussa tarvittava määrä, se asetettiin filteriputkeen ja sen varsi katkaistiin niin, että putki oli mahdollista sulkea korkilla. Tässä työvaiheessa tärkeää oli lisätä putkeen ensin viruspartikkelit ja sitten vasta ulostenäyte. Kun näytteenottotikku oli katkaistu putkeen, sen sisälle ei voinut enää pipetoida. Kun putki oli suljettu korkilla, sitä sekoitettiin huolellisesti kunnes uloste näytti sekoittuneen reagenssin sekaan tasaisesti. Näissä työvaiheissa käytettiin pohjana Orion Genread *C. difficile* reagenssipakkauksen ohjetta.

Seuraava vaihe oli näytteen ja reagenssin seoksen puristaminen suodattimen läpi. Tätä vaihetta varten merkittiin työohjeen mukaisesti mikrosentrifugiputket, joihin kuhunkin suodatinputken reunoja puristamalla tipautettiin viisi pisaraa reagenssi-virus-uloste seosta. Pisaroiden koko vaihteli hieman putken sisältämästä reagenssista ja ulosteen koostumuksesta riippuen. Koska lähes jokaisessa testauksessa mukana oli myös rinnakkaisia näytteitä ilman ulostetta, huomattiin, että ulosteen sisältämien suodatinputkien puristaminen oli sormille raskaampaa, kuin putkien, jotka sisälsivät vain detergenttiä ja laimennettua norovirusta. Myös eri detergentit reagoivat eri tavalla ja olivat koostumukseltaan erilaisia, joten osaa reagensseista oli hyvin raskasta puristaa suodattimen läpi.

Seuraavassa näytteenkäsittelyvaiheessa osaa näytteistä kuumennettiin 95°C lämpöhauteessa viisi minuuttia. Inkubointia ei tehty kaikille näytteille, joten tässä näytteenkäsittelyn vaiheessa yleisestä protokollasta poikettiin ja sen vaikutusta näytteeseen tarkasteltiin. Protokollaa noudatettiin samalla tavalla toistaen koko opinnäytetyön ajan tätä kuumennusvaihetta lukuun ottamatta. Kaikkiin näytteisiin ei myöskään aina lisätty ulostetta. Inkuboinnin jälkeen mikrosentrifugiputki sekoitettiin. Kokonaisuudessaan käytetty protokolla sisälsi kolme erillistä vaihetta, jotka ovat nähtävissä kuviossa 5.



Kuvio 5. Kuviossa on esitetty opinnäytetyössä käytetyn detergentteihin ja suodattamiseen perustuvan näytteenkäsittelyprotokollan vaiheet. Inkubointi oli mukana osassa testauksia.

Näytteenkäsittelyn jälkeen, ennen RT-PCR-reaktiokaivoihin pipetointia, näyte laimennettiin suhteessa 1:6 kylmäkuivatuille SIBA®-reaktioille tarkoitettuun reaktiopuskuriin. Näytteenkäsittelyä suunniteltiin kylmäkuivatuja SIBA®-reagensseja varten, joten tämä SIBA®-monistusreaktion kanssa yhteensopivaksi suunniteltu työvaihe otettiin mukaan tutkimuksiin jo heti alussa. Menetelmässä käytettiin SIBA®-teknologian vaatimia olosuhteita jo kehityksen alkuvaiheista asti. Alkuvaiheen kehitystyöt tehtiin RT-PCR-reaktioiden avulla, joiden kannalta näytteen laimentamisella SIBA®-reaktiopuskuriin ei

ollut merkitystä. Oli myös olennaista, että näytettä oli laimennettu kaikissa tutkimuksissa samassa suhteessa samoihin komponentteihin.

6.5 Nukleiinihappojen monistaminen

6.5.1 G-Dia Nota PCR-reagenssipakkaus

Kaikissa opinnäytetyön kokeellisen osuuden RT-PCR-reaktioissa käytettiin kaupallisen valmistajan *G-Dia Nota PCR* reagenssipakkausta (Diagenode Diagnostics). Reagenssipakkaus oli tarkoitettu noroviruksen genoryhmien I ja II määrittämiseen. Lisäksi sen avulla oli mahdollista määrittää samanaikaisesti myös rotavirusta, jota ei kuitenkaan tässä opinnäytetyössä tutkittu. Reagenssipakkaus sisälsi valmiin Master Mix -liuoksen, RNAasi-vapaaksi käsitellyn veden, sekä alukkeet ja koettimet valmiina sisältävän liuoksen. Lisäksi opinnäytetyön RT-PCR-reaktioissa käytettiin tämän kaupallisen reagenssipakkauksen sisältämää positiivista noroviruskontrollia. Tämä RNA-kontrolli oli mukana jokaisessa opinnäytetyön RT-PCR-reaktiossa. Valmistaja ei esittele tarkemmin kontrollin sisältöä tai pitoisuutta. Reagenssipakkaukseen kuului lisäksi negatiivinen kontrolli.

Reagenssipakkaus säilytettiin pakastinlämpötilassa ja tarvittu määrä reagensseja sulatettiin aina jokaista tutkimusta varten. Tilavuus yksittäisessä reaktiossa oli kokonaisuudessaan 25 µl. Oikeat suhteet ja tarvittava määrä jokaista reagenssia laskettiin valmistajan toimittamien ohjeiden mukaisesti riippuen siitä kuinka monta yksittäistä reaktiota tutkimuksessa oli mukana. Taulukossa 2 on nähtävissä opinnäytetyössä käytetyn PCR-reaktioseoksen sisältämät komponentit oikeassa suhteessa laskettuna 96 reaktiolle.

Taulukko 2. Taulukossa on nähtävissä opinnäytetyössä käytetyn G-Dia Nota PCR reagenssipakkauksen sisältämät komponentit oikeassa suhteessa laskettuna yhdelle ja 96 reaktiolle.

Final volume (µl)		25
G-DiaNota		Fill ↓
reagent	1 reaction µl	96 µl
RNase free water	11,25	1080
Optima PLUS Master Mix	6,25	600
PPp&c	2,5	240
Add template RNA	5	
	25	1920,0

Työ toteutettiin kolmessa erillisessä laboratoriotilassa. Ensimmäisessä vaiheessa puhtaassa tilassa sekoitettiin ensin PCR-reaktioseos, joka pipetoitiin 96-kuoppalevyn reaktiokaivoihin. Reaktiokaivot suojattiin ja kuoppalevyn kanssa siirryttiin puhtasluokitusjärjestyksessä seuraavaan laboratorioon, jossa kuoppalevylle pipetoitiin positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Tämän jälkeen suojatun kuoppalevyn kanssa siirryttiin pienemmän puhtasluokituksen laboratorioon, jossa ulostenäytteitä oli lupa käsitellä. Viimeisessä vaiheessa RT-PCR-reaktion valmistelua näytteet pipetoitiin kuoppalevylle. Esimerkkityöohje kaikkine vaiheineen on nähtävissä liitteessä 2. Ennen kuoppalevyn sijoittamista RT-PCR-laitteeseen se sentrifugointiin.

6.5.2 RT-PCR-reaktion olosuhteet

Jokaisessa opinnäytetyön RT-PCR-monistusreaktiossa oli käytössä samat olosuhteet käytetystä laitteesta riippumatta. Taulukossa 3 on nähtävissä ote työohjeesta, josta reaktiovaiheiden tarkkoja lämpötiloja ja ajallista kestoa voi tarkastella.

Taulukko 3. Taulukossa on nähtävissä opinnäytetyössä käytetyn G-Dia Nota PCR reagenssipakkauksen RT-PCR-reaktion olosuhteet.

Protocol:			
Reverse Transcription	50 °C	30 min	
Initial PCR activation	95 °C	10 min	
Denaturation	95 °C	15 s	45x
Annealing	55 °C	30 s	
Elongation	68 °C	30 s	

Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa käytössä oli kolme erilaista nukleiinihappojen monistamiseen optimoitua laitetta. Laitteet valikoituivat tutkimuksiin päivittäin sen mukaan, kuinka paljon muu laboratoriossa työskentelevä henkilökunta niitä tarvitsi, ja mitkä laitteet olivat vapaana opinnäytetyön laboratoriotutkimuksia varten. Kaikilla käytetyillä laitteilla oli reaktio-olosuhteiden asettamista ja tulosten käsittelyä varten erilaiset käyttöjärjestelmät. Opinnäytetyön noroviruksen nukleiinihappomonistusreaktioissa käytettiin ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fischer) ja Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fischer) -laitteita.

6.5.3 SIBA®-reaktiot

Tämän opinnäytetyön kokeelliseen osuuteen kuuluneissa SIBA®-reaktioissa käytettiin kylmäkuivattuja reagensseja. Kylmäkuivattu reagenssi oli valmiina reaktiokaivojen pohjalla, eikä sen käyttö vaatinut minkäänlaisia esivalmisteluita. Kylmäkuivatut reagenssit säilytettiin jääkaappilämpötilassa suljetussa purkissa, jonka kansi sisälsi kosteutta poistavan elementin. Kaivot oli suojattu foliokannella, joka poistettiin vasta käytön yhteydessä.

Reaktiokaivossa valmiina olevaan kylmäkuivattuun reagenssiseokseen pipetoitiin näyte, joka oli näytteenkäsittelyvaiheessa laimennettu SIBA®-puskuriin. Näytettä pipetoitiin reaktioon 40 µl. Työvaiheessa, jossa näyte pipetoitiin kylmäkuivatun reagenssin sekaan, oli tärkeää pitää reaktiokaivot kylmähauteessa. Kun puskuriin laimennettu näyte oli lisätty kaivoihin, sisälsi reaktio kaikki siihen tarvittavat elementit. Kylmäkuivatut reagenssit sekoitettiin huolellisesti nesteeseen lisäyksen jälkeen, jotta voitiin olla varmoja siitä, että kaikki kuivattu materiaali oli liennut nesteeseen. Reaktiokaivot suojattiin ja sentrifugoitiin kertaalleen. Tämän jälkeen ne sekoitettiin ja sentrifugoitiin uudelleen.

Kaikissa SIBA®-reaktioissa nukleinihappojen monistamiseen käytettiin Bio-Rad-laitteita (bio-rad). Laitteet valikoituivat käyttöön kylmäkuivattujen reagenssikaivojen takia, sillä ne olivat ainoita, joihin kylmäkuivatuille reagensseille optimoidut reaktioputket sopivat.

6.6 Opinnäytetyön eteneminen

Tässä kappaleessa esitellään opinnäytetyön kokeellisen osuuden etenemistä ja työn kokonaisuuden rakennetta. Tarkemmin eri työvaiheisiin ja niistä saatuihin tuloksiin keskitytään tämän opinnäytetyön kappaleessa 7. Liitteessä 2 on nähtävissä esimerkkityöohje, joka sisältää opinnäytetyössä eniten noudatetut työvaiheet detergenttien valmistamisesta RT-PCR-reaktioon asti.

Alkuvaiheen laboratoriotöitä määritti suuresti se, minkälaisia detergentejä oli heti kokeellisen osuuden käynnistyttyä saatavilla. Työssä edettiin sen perusteella mitkä kaupallisilta toimittajilta tilatut detergentit saapuivat ensimmäisinä. Karkeasti tarkasteltuna opinnäytetyö jakautui viiteen eri kokonaisuuteen. Nämä kokonaisuudet ja niissä tutkitut

detergentit on listattu taulukossa 4. Ensimmäisen kolmen työvaiheen tutkimuksissa käytettiin näytteenä noroviruksen genotyyppiä II. Taulukossa 4 punaisella merkityt detergentit on tässä opinnäytetyössä tutkittu toimiviksi myös noroviruksen genotyypin I kanssa.

Taulukko 4. Taulukosta nähdään opinnäytetyön kokeellisen osuuden jakautuminen eri kokonaisuuksiin. Taulukossa on listattu työvaiheissa vertailut detergentit ja reagenssien pitoisuudet.

Työvaihe	Detergentti	Detergentin pitoisuus	PEG-liuoksen pitoisuus
Vertailu ilman inkubointia	Brij 58	Matala ja korkea	-
	Brij O10, Brij C10, C13E10, Tween 20		
	Brij L23, C7BzO		
Vertailu inkuboinnin kanssa	Tween 80, Tergitol NP40	Matala	-
	Igepal CA-630, Triton x-100		
	Brij 58, C13E10		
	Brij O10, Tween 20		
	Brij C10, C7BzO		
	Brij L23		
Vertailu PEG + detergentti	Brij 58 , C13E10	Matala	Korkea
	Tergitol NP40 + Tween 80		
	Igepal CA-630 , Triton x-100, Brij O10 , Tween 20		
	Brij C10 , C7BzO		
	Brij L23		
Toimivuuden testaus SIBA®-reaktiossa	Brij 58 + PEG, Tween 20 + PEG, Tergitol NP-40 + PEG, Tergitol NP 40	Matala	Korkea
	Igepal CA630 + PEG, Brij L23 + PEG, Brij O10 + PEG, Tween80 + PEG		

Olosuhde testattu myös noroviruksen genotyypin GI kanssa

Ensimmäisessä vaiheessa detergenttikäsiteltyjen näytteiden toimivuutta vertailtiin ilman kuumennusvaihetta muuten näytteenkäsittelyprotokollaa noudattaen. Tämä tehtiin, sillä oletuksena oli, että kuumennusvaihe osana näytteenkäsittelyä todennäköisesti hajottaa soluja, ja haluttiin tutkia detergenttien vaikutuksia tähän vaiheeseen. Tähän työvaiheeseen liittyi paljon kokeiluja, työtapoihin totuttelua ja kontrollien tutkimista. Tämän vai-

heen aikana detergenttien ja noroviruslaimennosten pitoisuudet valittiin ja näissä pitoisuuksissa pysyttiin opinnäytetyön loppuun asti. Näiden tutkimusten perusteella valittiin myös näytteenkäsittelyn kontrolli, PBS-puskuri, jonka avulla tutkittiin jo tässä vaiheessa inkuboinnin vaikutusta näytteen monistumiseen.

Hyvin pian ensimmäisten tutkimusten jälkeen mukaan näytteenkäsittelyvaiheeseen otettiin 5 minuutin inkubointi. Tämän vaiheen aikana kaikkia 11 detergenttiä vertailtiin näytteenkäsittelyliuoksina ja niiden välille saatiin ensimmäisen kerran selkeitä eroja. Seuraavassa vaiheessa kaikista 11:stä detergentistä tehtiin detergenttiä ja polyetyleeniglykolia sisältävä näytteenkäsittelyliuos. Reaktioista saatuja tuloksia vertailtiin jälleen ilman kuumennusvaihetta ja kuumennuksen kanssa. Tämän vaiheen jälkeen osa detergenteistä rajattiin pois jatkotutkimuksista. Jatkoon valittiin seitsemän detergenttiä, jotka analysoitiin kahdessa RT-PCR-reaktiossa yhdessä noroviruksen GI genotyypin kanssa. Työvaiheen tarkoituksena oli selvittää, toimivatko viruksen II genotyypin näytteenkäsittelyssä optimaaliset detergentit samoin saman viruksen toisen yleisen genotyypin kanssa. Perusteet detergenttien valinnalle esitellään kappaleessa 7.

Opinnäytetyön viimeisissä laboratoriotöissä tutkittiin tähän vaiheeseen valikoitujen detergenttikäsitteltyjen näytteiden toimivuutta SIBA-reaktiossa. Toissijaisesti tarkasteltiin myös detergentin vaikutusta SIBA®-reaktioon. SIBA®-teknologiaan perustuvina kylmäkuivattuina reagensseina käytettiin Orion Diagnostica Oy:n kaupallista Orion Genread *Clostridium difficile*n diagnosointiin tarkoitettua reagenssipakkausta ja määritettävänä näytemateriaalina *C. difficile*-kantaa. Käytössä oli ATCC® 43255™-kanta. Tutkimuksissa bakteerikantaa käsiteltiin täysin noroviruskontrollipartikkeleiden tavoin.

Jokaisesta opinnäytetyössä tutkitusta näytteestä tehtiin aina myös rinnakkainen näyte. Kaikki kokeet tehtiin noroviruspartikkeleiden GII genoryhmälle, ellei tuloksia tarkasteltaessa toisin mainita. Kaikki näytteet valmistettiin sekä ilman ulostenäytteen lisäystä että sen kanssa. PBS-puskuriin laimennettu näyte toimi kontrollina reaktioissa. Jokainen detergenttikäsittelty näyte testattiin myös ilman kuumennusta ja kuumennuksen kanssa sekä ensimmäistä vaihetta lukuun ottamatta.

7 Tulosten tarkastelu

Opinnäytetyön kokeellinen osuus eteni vaiheittain ja jatkosta päätettiin usein edellisten tulosten perusteella. Tästä syystä opinnäytetyön laboratorikokeiden tulokset on esitet-

ty siinä järjestyksessä kuin niihin liittyvät laboratoriotutkimukset on suoritettu. Tulokset eritellään monistuskäyrien kuvaajien ja tarkempien reaktio-olosuhde kuvausten avulla, jos ne ovat vaikuttaneet suuresti myös tulevien töiden suorituksiin. Kaikissa RT-PCR-reaktioissa oli mukana positiivinen ja negatiivinen kontrolli, jonka tuloksia ei esitellä, ellei niissä ollut havaittavissa jotain poikkeavaa.

Tuloksiin liitetyissä monistuskäyrien kuvaajissa fluoresenssin signaalin kertoo y-akselilla sijaitseva ΔR_n eli delta R_n arvo (engl. *normalized reporter signal*). Kuvaajissa x-akselilla sijaitsevat syklit (engl. *cycle*). Syklejä voidaan kuvata myös Ct-arvon avulla, joka kertoo kynnyksarvon, jossa PCR tuotetta alkaa muodostua.

7.1 Detergenttien vertailu ilman inkubointia

Opinnäytetyön ensimmäisessä vaiheessa tutkittiin kahdeksan eri detergentin toimivuutta noroviruksen näytteenkäsittelyyn ulosteen kanssa. Näytteenkäsittelyprotokollaa noudatettiin, mutta 5 minuutin inkubointia 95°C lämpötilassa ei tehty. Tutkimukset ilman inkubointia jaettiin kolmeen eri RT-PCR-monistusajoon, jotka on eritelty tuloksineen tarkemmin alla olevissa kappaleissa. Detergentit valmistettiin reaktioihin kahdessa eri pitoisuudessa. Tutkimuksissa käytettiin korkeaa ja matalaa detergenttilaimennosta.

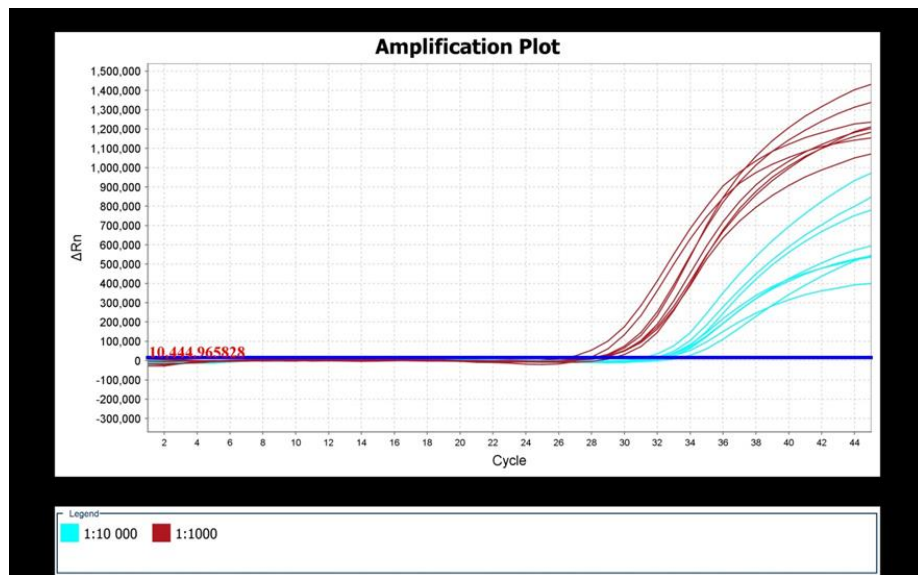
7.1.1 Brij 58-detergentti eri olosuhteissa

Detergentti Brij 58 valikoitui näytteenkäsittelyn reagenssiksi ensimmäisiin tutkimuksiin, sillä sitä oli tilattu valmiiksi laboratorioon eikä sen saapumista tarvinnut odottaa. Detergenttiä oli alustavasti testattu, mutta tietoa sen toimivuudesta noroviruksen näytteenkäsittelyyn ulosteen kanssa ei kuitenkaan ollut. Brij 58 detergentin ohella tarkasteltiin myös *C. difficilen* näytteenkäsittelyn toimivuutta ulosteen ja noroviruksen kanssa. Opinnäytetyön ensimmäisissä tutkimuksissa haluttiin detergenttikäsiteltyjen näytteiden toimivuuden lisäksi nähdä kuinka uloste vaikuttaa näytteen monistumiseen RT-PCR-reaktiossa. Tässä kokeessa suodatinputkeen lisättiin partikkeleita, jotka oli laimennettu 1:1000 ja 1:10 000. Haluttu tilavuus laskettiin niin, että partikkelilaimennosta riitti jokaiseen tutkittavaan olosuhteeseen 100 μ l.

Tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että PBS-puskuriin sekoitetut noroviruspartikkeli-näytteet monistuivat RT-PCR-reaktioissa sekä ilman ulostetta että ulosteen kanssa. Näytteenkäsittelyvaiheessa kuumettu näyte näytti monistuvan hieman nopeammin kuin

kuumentamaton näyte. Ero kuumennetun ja kuumentamattoman välillä näkyi etenkin niissä näytteissä joihin oli lisätty ulostetta. Ne näytteet, joissa oli ulostetta ja jotka oli kuumennettu, monistuivat lineaarisemmin kuin kuumentamattomat ulostenäytteet. Tämä PBS-puskuriin laimennetun näytteen antamat tulokset olivat tärkeitä havaintoja myös tulevien vielä suunnitteilla olevien laboratorikokeiden kannalta. Selkeästä monistumisesta johtuen PBS-puskuriin laimennettu näyte voi tulevaisuudessa toimia hyvänä kontrollina reaktiossa.

Ulosteen vaikutus näytteeseen näkyi PBS-puskuriin laimennettuja näytteitä paremmin Brij 58 detergenttikäsittelyjen näytteiden tuloksia tarkasteltaessa. Näytteet, joihin ei lisätty ulostetta, monistuivat optimaalisesti Brij 58 detergentin toimiessa näytteenkäsittelypuskurina. Brij 58 detergentin konsentraatioiden välillä ei ollut monistumisajoissa suuria eroja, mutta matalan konsentraation liuokseen laimennettu näyte näytti monistuvan hieman nopeammin kuin vahvempi detergenttiliuos. Ne reaktiot, jotka sisälsivät Brij 58 detergentin ja joukkoon lisätyn ulosteen, eivät monistuneet lainkaan. Kuvio 6 on nähtävissä Brij 58 detergenttikäsittelyjen näytteiden monistumiskuvaajat ViiA 7 Real Time PCR system -ohjelmassa ilman ulostetta. Kuten kuvio 6:stä nähdään, detergenttikonsentraatioiden välillä ei ole suuria eroja. Väreillä on kuviossa erotettu noroviruspartikkelilaimennokset.



Kuvio 6. Kuviossa on esitetty noroviruspartikkeleiden monistumiskuvaajat Brij 58 detergentin kanssa ilman lisättyä ulostenäytettä. Punainen kuvaaja kuvaa 1:1000 ja sininen kuvaaja 1:10 000 suuruisia viruspartikkelilaimennoksia.

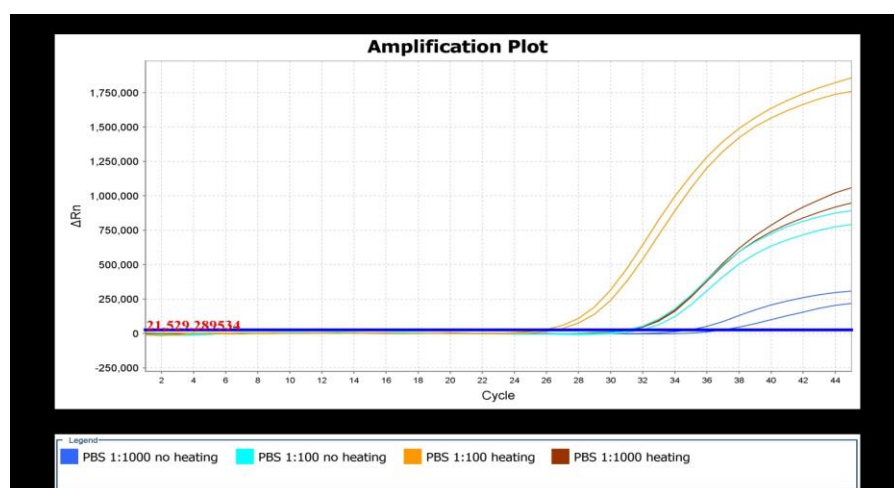
Tutkimuksessa tarkasteltiin myös *C. difficile*n näytteenkäsittelyprotokollan mukaan käsiteltyjä näytteitä. Tulokset kuitenkin osoittivat, että tämä reagenssiseos ei toimi ulos-

teen ja noroviruksen kanssa. Selkeää monistumista ei ollut havaittavissa missään näytteissä, ilman ulostetta tai ulosteen lisäyksen jälkeen. *C. difficilen* näytteenkäsittelyprotokollan toimivuus tullaan testaamaan vielä uudelleen, jotta se uskalletaan sulkea täysin pois mahdollisten toimivien reagenssien joukosta.

7.1.2 Muut detergentit

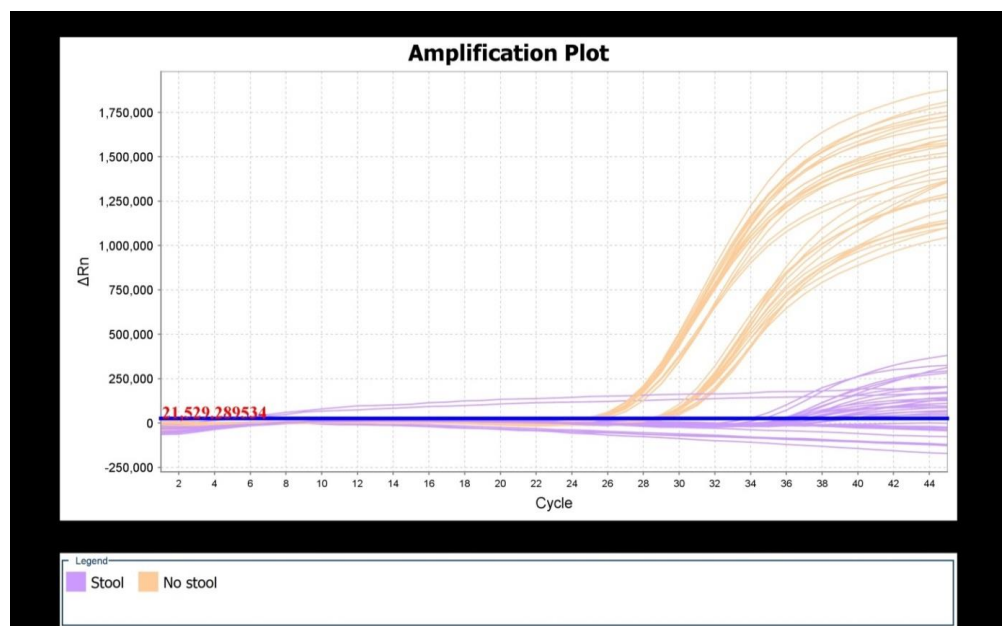
Seuraavassa osuudessa vertailtiin Brij O10, Brij C10, C13E10, Tween 20, Brij L23 sekä C7BzO detergentein käsiteltyjä näytteitä jaettuna kahteen erilliseen laboratoriokokeeseen. Noroviruspartikkelilaimennoksia muutettiin näitä tutkimuksia varten. Edellisten tulosten perusteella päädyttiin laimennoksiin 1:100 ja 1:1000, jotta monistuminen olisi hieman nopeampaa ja voitiin minimoida rinnakkaisten näytteiden hajontaa. Mukana reaktioissa oli jälleen PBS-puskuriin sekoitettu näyte, jonka toimivuutta kontrollina tarkasteltiin uudelleen. Kokeeseen otettiin mukaan edellisen tutkimuksen tavoin *C. difficilen* näytteenkäsittelyprotokollaa seuraten valmistettu näyte, vaikka ennakolettamuksena aiemman laboratoriokokeen perusteella oli, että se ei noroviruksen kanssa toimi.

Tuloksia tarkasteltaessa nähtiin, että PBS-puskuriin sekoitetut näytteet monistuvat edellisen kokeen tapaan, kuten kuviosta 7 on havaittavissa. Kuviossa on nähtävissä ViiA 7 Real Time PCR system -ohjelman monistumiskuvaaja PBS-puskuriin laimennetuista näytteistä, joihin oli lisätty ulostetta. Myös tämän kokeen perusteella PBS-puskuria voidaan pitää hyvänä näytteenkäsittelyvaiheen kontrollina jatkotutkimuksissa.



Kuvio 7. Kuviossa on nähtävissä PBS-puskuriin sekoitetun näytteen erot kahdessa eri noroviruslaimennospitoisuudessa. Kuumennetut näytteet (oranssi ja ruskea) monistuvat nopeammin kuin kuumentamattomat (siniset).

Kaikkien tutkittavien detergenttien kohdalla nähtiin samankaltainen ilmiö. Niiden näytteiden kohdalla, joihin lisättiin vain noroviruskontrollipartikkelit, mutta ei ulostetta, molemmat rinnakkaiset näytteet monistuivat tasaisesti samaan aikaan. Täysin samaa näytteenkäsittelyä noudattaen tehdyt näytteet, samoista detergenteistä, lisätyn ulosteen kanssa eivät monistuneet reaktioissa lähes lainkaan. Monistuminen oli hitaampaa ja monistuskäyrien delta-Rn-arvot olivat huomattavasti matalampia kuten kuviosta 8 on havaittavissa. Eri detergentein käsiteltyjen näytteiden välillä ei ollut suurta eroa, eikä niiden monistumisaikoja ole tässä vaiheessa tarkemmin eritelty. Ulostetta sisältämättömien näytteiden antamien tulosten perusteella nähtiin kuitenkin se, kuinka paljon lisätyllä ulosteella on tuloksen kannalta merkitystä.



Kuvio 8. Kuviossa on nähtävissä Brij O10, Brij C10, C13E10 ja Tween 20 detergentteihin laimennettujen norovirusnäytteiden monistumiskuvaajat ilman ulostetta (oranssi) ja ulosteen kanssa (violetti).

Tässä tutkimuksessa *C. difficilen* näytteenkäsittelyprotokollan mukaan sekoitetut näytteet monistuivat kuumentamattomina hieman paremmin kuin edellisessä kokeessa. Kuumentamattomat näytteet eivät kuitenkaan toimineet lainkaan. Tämä reagenssiseos ei kahdesta viimeisimmästä tutkimuksesta saatuun tietoon pohjautuen toimi kovin hyvin ulostenäytteiden kanssa, joten se rajattiin tässä vaiheessa pois tutkimuksista.

Ensimmäisen kolmen tutkimuksen pohjalta voitiin siis sanoa, että kaikki valitut detergentit näyttivät toimivan noroviruskontrollipartikkelien kanssa hyvin ja monistuminen oli optimaalista. Detergenttien välillä oli pieniä eroja, mutta mitään jatkoon kannalta merki-

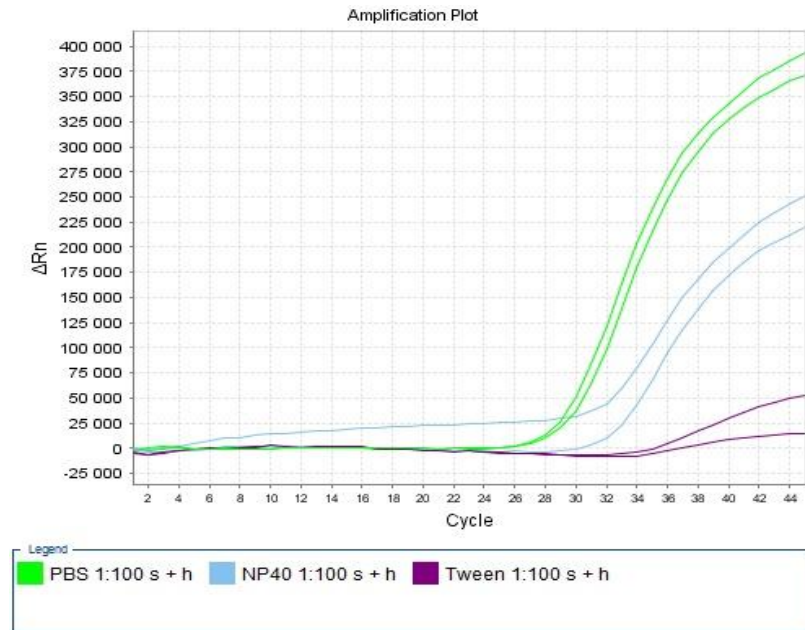
tyksellistä ei vielä tässä vaiheessa ollut havaittavissa, eikä mitään detergenttiä voida sulkea pois. Näyttää siltä, että pienempi detergentin konsentraatio saattoi mahdollisesti olla noroviruksen monistumisen kannalta optimaalisempi, vaikka suuria eroja ei ollut havaittavissa. Kun näytteenkäsittelyvaiheessa joukkoon lisättiin uloste, yksikään detergentti ei soveltunut näytteenkäsittelyreagenssiksi noroviruksen kanssa, eikä monistumista ollut havaittavissa lainkaan. Oli ennaltakin tiedossa, että uloste on näytemateriaalina hankala.

7.2 Detergenttien vertailu inkuboinnin kanssa

Seuraaviin tutkimuksiin lisättiin inkubointi näytteenkäsittelyn viimeiseksi vaiheeksi. Näytettä inkubointiin 95°C 5 minuuttia. Tarkoituksena oli kuumennusvaiheen lisäämisen jälkeen tarkastella kuinka tämä lisä näytteenkäsittelyssä vaikuttaa noroviruksen monistumiseen. Tavoitteena tämän muutoksen taustalla oli nähdä etenkin se, kuinka kuumennus vaikuttaa näytteisiin, joihin on lisätty ulostetta. Jotta kuumennusvaiheen merkitys voitaisiin analysoida mahdollisimman tarkasti, mukana oli myös näytteitä joihin ei lisätty ulostetta. Tutkimuksia jatkettiin vain yhdellä detergenttikonsentraatiolla, sillä aikaisemmat tulokset näyttivät, ettei konsentraation muutoksella ole merkittävää eroa tulosten kannalta. Tässä työvaiheessa oli myös tärkeää saada mukaan tutkimuksiin mahdollisimman paljon erilaisia eri detergenttejä sisältäviä näytteenkäsittelyn olosuhteita. Konsentraatioiden optimointi oli järkevämpää jättää työn loppuvaiheeseen, kun parhaat detergentit on valikoitu.

7.2.1 Tween80 ja Tergitol NP40

Ensimmäiseen testaukseen kuumennuksen kanssa valittiin Tween80 ja Tergitol NP40 detergentit. Kokeesta saadut tulokset olivat merkittäviä siinä suhteessa, että kuumennusvaiheen lisäämisen jälkeen saatiin ensimmäisen kerran selkeitä eroja eri detergenttien välille. Inkuboiduista näytteistä, joihin oli lisätty ulostetta, kontrolliin, PBS-puskuriin, lisätyt näytteet monistuivat edelleen paremmin ja nopeammin kuin detergenttiin lisätty näyte. Nyt kontrollin lisäksi myös detergenttikäsittelyt näytteet, joihin oli lisätty ulostetta, monistuivat molemmissa norovirus laimennoksissa. Kuviossa 9 on nähtävissä kahden tässä testauksessa käytetyn detergentin sekä PBS-puskuriin laimennetun näytteen monistuskäyriä 7500 Real-Time PCR System -ohjelmista.



Kuvio 9. Kuviossa on esitelty kaikki tässä kokeessa tutkitut reagenssit ulosteen ja kuumennusvaiheen kanssa. Vihreä monistuskäyrä kuvaa kontrollia. Sinisen kuvaajan näytteet on käsitelty Tergitol NP40 detergentillä. Violetti kuvaaja kuvaa Tween 80 detergenttikäsiteltyjä näytteitä.

Kuten kuviosta 9 nähdään, Tween80 detergenttikäsitellyn näytteen monistuminen on hitaampaa ja heikompaa kuin Tergitol NP40 detergenttikäsitellyn näytteen monistuminen sekä syklien että delta-Rn arvojen osalta. Tämän testauksen perusteella näyttää siltä, että Tergitol NP40 voisi olla potentiaalinen detergentti noroviruksen näytteenkäsittelyyn ja se toimii paremmin kuin toinen testattu detergentti Tween80. Kun noroviruskontrollipartikkeleita laimennetaan 1:1000, Tween80 detergenttikäsitellyn näytteen monistumista ei ole enää juurikaan havaittavissa.

Kokeesta selviää myös se, että kuumennusvaihe parantaa ulostetta ja noroviruskontrollipartikkeleita sisältävän näytteen monistumista RT-PCR-reaktiossa. Samoilla detergenteillä käsitellyt näytteet ilman inkubointia eivät monistuneet reaktiossa lainkaan. Tween80 näyttää toimivan toista detergenttiä paremmin testauksissa ilman ulostetta, eli täysin päinvastoin kun ulostenäytteen kanssa. Täytyy ottaa huomioon, että lopullisessa ja valmiissa testissä norovirusnäyte tulee sisältämään ulostetta ja lopulliseen testaukseen valitun näytteenkäsittelyn tulee toimia sen kanssa. Detergentejä tarkasteltiin ilman ulosteen lisäystä, sillä haluttiin tarkastella niiden hajotuskykyä. Näiden tulosten perusteella näyttäisi siltä, että ulostenäyte vaatii kuumennuksen ennen RT-PCR-reaktiota. Jos kuumennusvaihetta ei ole näytteenkäsittelyssä mukana, uloste näyttää inhiboivan reaktiota, eikä monistumista ole havaittavissa lainkaan.

7.2.2 IGEPAL CA-630 ja Triton x-100

Seuraavassa kokeellisen osuuden tutkimuksessa mukaan valittiin jälleen kaksi uutta detergenttiä IGEPAL CA-630 sekä Triton x-100. Edelliseen detergenttitutkimukseen verrattuna tästä laboratoriokokeesta saadut tulokset eivät olleet yhtä merkittäviä.

Molemmat detergentit toimivat jälleen ilman ulostetta sekä kuumentamatta että kuumennusvaiheen kanssa. Kuumennetut näytteet monistuivat kuumentamattomia aavistuksen nopeammin ja lineaarisemmin. Kun uloste lisättiin mukaan reaktioon, ei monistumista ollut enää havaittavissa. Näiden detergenttien kohdalla kuumentaminen ei siis auttanut monistusreaktiota ulosteen ollessa mukana. Näyttää siis siltä, että nämä detergentit ainoana näytteenkäsittelyn reagenssina, eivät toimi noroviruksen ja ulosteen kanssa, oli inkubointivaihe mukana tai ei. Kun tuloksia vertaa edellisestä kokeesta saattuihin tuloksiin, huomataan, että eri detergenttien välillä on selviä eroja.

7.3 Detergenttien vertailu PEG-liuoksen kanssa

Opinnäytetyön laboratorio-osuuden seuraavissa työvaiheissa tutkittiin detergenttien toimivuutta yhdessä polyetyleeniglykolin eli PEG-liuoksen kanssa. PEG-liuos valittiin mukaan testauksiin, koska aiempien tutkimuksien perusteella näytti siltä, ettei detergentti yksin näytteenkäsittelyreagenssina ole välttämättä paras ratkaisu. PEG-liuos valittiin mukaan testauksiin, sillä se on Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen aiemmissa tutkimuksissa ollut toimiva reagenssi ulosteen kanssa tehtäviin määrittäyksiin. Vaihtoehtona olisi myös ollut tehdä kokeita sekoittamalla eri detergentejä toisiinsa. Tässä vaiheessa työskentelyä päädyttiin kuitenkin tutkimaan PEG-liuosta ja detergenttiä reaktioliuoksena.

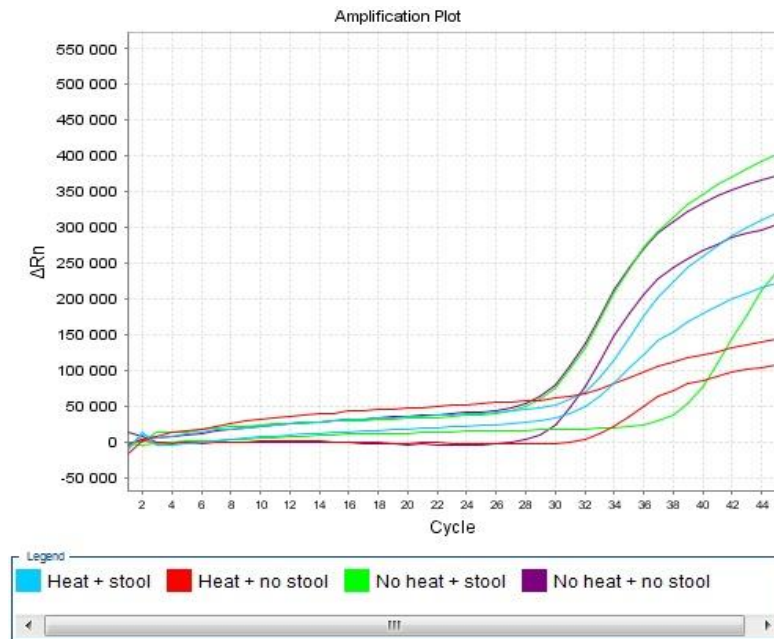
Polyetyleeniglykoli on koostumukseltaan pipetoitavissa olevaa viskoosia liuosta, eikä ennalta tiedetty kuinka se reagoi eri detergenttien kanssa. Tässä työvaiheessa piti pitää mielessä asiakaslähtöisyys, sillä näytteenkäsittelyprotokolla pitää sisällään vaiheen, jossa detergentti-ulostenäyteseosta puristetaan käsin filterin läpi mikrosentrifugiputkeen. Jos puristettavan reagenssin koostumus on liian vahamaista, filterin läpi puristaminen on käsin haastavaa ja raskasta.

7.3.1 Brij 58, C13E10, Tween 80 ja Tergitol NP40 PEG-liuoksen kanssa

Ensimmäiseen PEG-liuoksen kanssa tehtyyn kokeeseen valittiin detergentit Brij 58 ja C13E10. Näitä detergentejä oli tutkittu opinnäytetyön alkuvaiheessa reaktiossa reagenssina ilman inkubointia. Tähän työvaiheeseen haluttiin tästä syystä ottaa mukaan PEG-liuoksen lisäksi näiden kahden detergentin inkubointi näytteenkäsittelyvaiheessa, sillä vielä ei ollut tiedossa kuinka viiden minuutin kuumennus vaikuttaa juuri näiden detergenttikäsiteltyjen näytteiden toimintaan. Tutkimukseen otettiin PBS-puskuriin laimennetun näytteen lisäksi kontrolliksi mukaan detergentin tilalla pelkkää veteen laimennettu näyte. Tuloksia tarkasteltaessa, huomattiin, että sekä veteen että PBS-puskuriin laimennettu näyte monistui myös silloin, kun näytteenkäsittelyvaiheessa mukaan oli lisätty ulostetta. Myös vesikontrolli monistui PBS-puskuriin laimennetun näytteen tavoin optimaalisemmin, kun näytteenkäsittelyssä oli mukana kuumennusvaihe.

Näytteisiin, jotka sisälsivät vain toisen testatuista detergenteistä, kuumentaminen ei näyttänyt vaikuttavan. Ilman ulostetta kuumennettu näyte toimi, mutta, kun uloste lisättiin joukkoon, tulos oli sama kuin kuumentamattomalla näytteellä – monistumista ei ollut havaittavissa lainkaan. Kun PEG lisättiin näytteenkäsittelyvaiheessa reaktioon detergentin kanssa, saatiin lupaavampia tuloksia. Molempien detergenttien kohdalla monistumista oli havaittavissa myös näytteissä, jotka sisälsivät ulostetta.

Rinnakkaiset tulokset eivät olleet kovin yhteneviä keskenään, joten tuloksista ei voi luotettavasti tulkita onko kuumennettu vai kuumentamaton näyte parempi kummallakaan yhdistelmällä. Tuloksissa oli kuitenkin huomattavasti eroa siihen nähden, onko kyseessä pelkkä detergentti vai detergentti-PEG-reaktioseos. Tulokset olivat parempia, kun näytteenkäsittelyssä käytettiin Brij 58 detergenttiä sisältävää puskuria, kuin silloin, kun reaktiossa puskurina toimi C13E10 detergentti. Brij 58 ja PEG-seoksen monistuskäyriä 7500 Real-Time PCR System -ohjelmassa on nähtävissä kuviossa 10. Kuviossa esitetään sekä näytteet ilman ulostetta, että sen kanssa.



Kuvio 10. Kuviossa on esitetty monistumiskuvaajat Brij 58 ja PEG seoksen toimiessa näytteenkäsittelyliuoksina. Tuloksissa on esitelty näyte ulosteen kanssa ilman kuumennusta (vihreä), ilman ulostetta ja ilman kuumennusta (violetti), kuumennuksen ja ulosteen kanssa (sininen) sekä kuumennettu näyte ilman ulostetta (punainen).

Kuten monistuskuvaaja näkee myös näytteet, joihin oli lisätty ulostetta, monistuvat, kun näytteenkäsittelyssä käytettiin detergentti-PEG liuosta. Yksinään Brij 58 detergentin kanssa näytteen monistumista ei ollut havaittavissa lainkaan. Tässä työvaiheessa eroja detergenttien välillä alkoi näkyä ja oli selvää, että näytteen kuumentaminen vaikuttaa noroviruksen monistumiseen hyvin detergentistä riippuen. Detergentti – PEG yhdistelmä näytti jo ensimmäisten tulosten perusteella lupaavalta kombinaatiolta, jonka parissa oli syytä jatkaa. Yhdisteleminen tekee myös eroja detergenttien välille, kuten havaitaan tässä testissä C13E10 detergenttiä paremmin näytteenkäsittelyn reagenssina toiminut Brij 58.

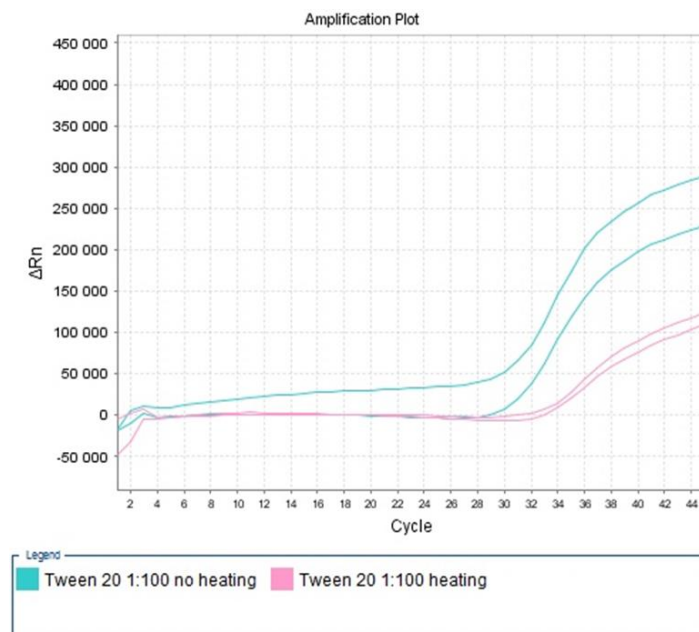
Seuraavaan tutkimukseen valittiin Tween80 ja Tergitol NP40 detergentit. Nämä detergentit valikoituivat mukaan PEG-liuoksen kanssa tarkasteltaviksi tässä vaiheessa työtä, sillä etenkin Tergitol NP40 detergentistä aikaisemmin saadut tulokset olivat lupaavia. Tuloksia vertaillen havaittiin, että Tergitol NP40 detergentin kanssa monistusreaktio näytti nopeammalta ja lineaarisemmalta ilman PEG-liuoksen lisäystä reaktioon. Koska reagensseja ei vertailtu saman RT-PCR-reaktion aikana, tuloksia ei voida pitää täysin luotettavina, mutta suuntaa antavina silti. Noroviruksen replikaatiota oli havaittavissa myös näytteissä, joiden käsittelyssä käytettiin Tergitol NP40 ja PEG-liuosta. Tween 80 detergentin ja polyetyleeniglykolin seoksen toimiessa näytteenkäsittelyn puskurina ei tuloksia tarkasteltaessa havaittu suuria eroja ulostetta sisältävien ja sisältämättömien

näytteiden välillä. Myöskään kuumennus ei näyttänyt merkittävästi vaikuttavan reaktioon. Monistumista oli havaittavissa kaikissa olosuhteissa, mutta missään niistä se ei ollut kovin lineaarista tai selvää.

7.3.2 Igepal CA630, Triton x-100, Tween20 ja Brij O10

Seuraavassa vertailussa detergentit Igepal CA630, Triton x-100, Tween20 ja Brij O10 tutkittiin yhdessä PEG-liuoksen kanssa. Tämän lisäksi Tween20 ja BrijO10 detergentit otettiin mukaan reaktioon myös yksin, jotta voitiin tarkastella kuumennuksen vaikutusta detergenttikäsiteltyjen näytteiden monistumiseen.

Kaikkien tässä koeasetelmassa mukana olleiden detergentti- ja PEG-käsiteltyjen näytteiden kohdalla oli havaittavissa sama ilmiö. Kuumentamattomat ulostenäytteet monistuiivat paremmin, kuin ne, joiden näytteenkäsittelyyn oli lisätty viiden minuutin kuumennusvaihe. Kuumennetut näytteet, joihin oli lisätty ulostetta, monistuiivat huonosti tai eivät juuri ollenkaan, kun taas kuumentamattomien näytteiden kohdalla monistuminen oli hyvin havaittavissa. Ilmiö on siis päinvastainen kuin yksittäisten detergenttien kohdalla, jossa kuumennettu näyte monistui paremmin kuin kuumentamaton näyte. Kuviossa 11 on nähtävissä noroviruksen monistumiskuvaaja Tween20 detergentti-PEG-seoksen ollessa reagenssina näytteenkäsittelyssä.

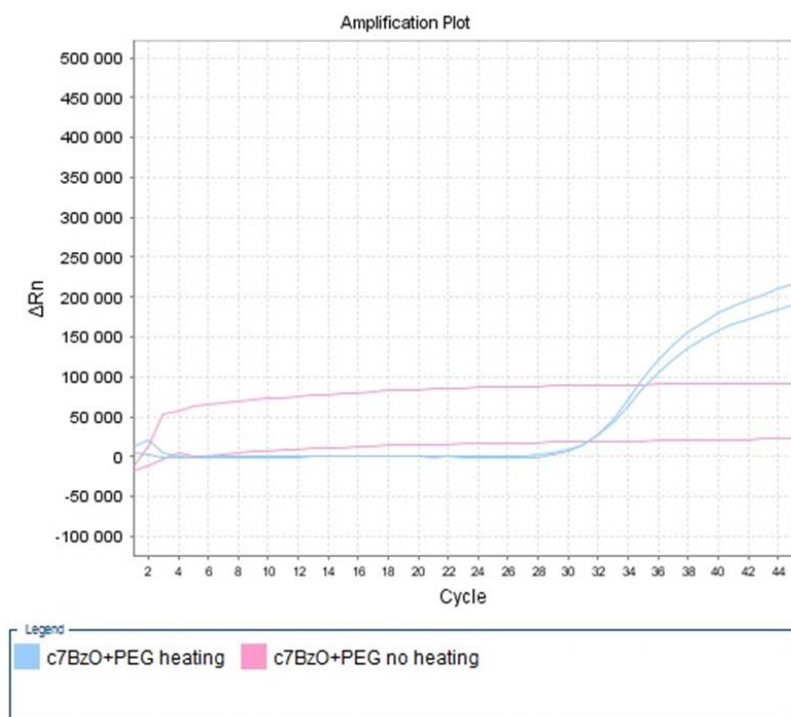


Kuvio 11. Kuviossa on esitetty Tween20 ja polyetyleeniglykolin seos reaktiossa ulosteen kanssa. Kuumentamaton näyte (sininen) monistuu nopeammin kuin kuumennettu näyte (punainen).

Hyvin samaa kaavaa noudattivat kaikki tässä testauksessa mukana olleet detergentit polyetyleeniglykolin kanssa. Kuvan detergentti Tween20 näytti toimivan hieman muita detergenttejä paremmin. Tässä tutkimuksessa ainoana näytteenkäsittelyn reagenssina mukana olleet Tween20 ja Brij O10 detergentit eivät toimineet yksin näytteiden kanssa, joihin oli lisätty ulostetta.

7.3.3 Brij C10, C7BzO ja Brij L23 PEG-liuoksen kanssa

Seuraavissa kokeissa tutkittiin Brij C10, C7BzO ja Brij L23 detergentein käsiteltyjen näytteiden toimivuutta PEG-liuoksen kanssa. Kaikki kolme detergenttiä otettiin mukaan tutkimukseen matalan konsentraation liuoksena myös yksin, jotta voitiin tarkastella kuumennuksen vaikutusta juuri kyseisiin detergentteihin. Brij C10 ja C7BzO detergentti-PEG reagenssiseosten kohdalla havaittiin aikaisemmista tuloksista poikkeavia monistumiskäyriä. Molempien ulostetta sisältävien reagenssiseosten kohdalla kuumennettu näyte toimi kuumentamatonta näytettä paremmin. Kuviossa 12 on nähtävissä C7BzO detergentin monistumiskuvaaja, josta näkee kuumennetun näytteen monistuvan kuumentamatonta paremmin.



Kuvio 12. Kuvioista on nähtävissä detergentti C7BzO ja PEG-liuoksen reagenssiseoksen monistumiskuvaajan. Näytteenkäsittelyvaiheessa kuumennettu (sininen) näyte monistuu paremmin kuin kuumentamaton näyte (punainen).

Brij C10 detergenttiin laimennettu norovirusnäyte replikoitui hyvin samalla tavalla kuin kuviossa 12 esitellyn C7BzO detergentin kanssa. Brij L23 detergenttiin sekoitetut norovirusnäytteet, joihin oli lisätty ulostetta, monistuivat RT-PCR-reaktioissa hieman paremmin, jos kuumennussyklin jätti pois. Ero oli havaittavissa etenkin pienemmässä noroviruskontrollipartikkelilaimennoksessa. Tähän laboratorikokeeseen valittiin mukaan myös näytteenkäsittelyn reagenssiseos, joka sisälsi pelkästään korkean konsentraation polyetyleeniglykolin. Tämä oli mukana siksi, että haluttiin tarkastella liuoksen toimivuutta yksin, ilman detergentin lisäystä. Alkuvaiheen kokeissa kävi ilmi, ettei Orion Genread *C. difficilen* näytteenkäsittely ollut optimaalinen noroviruksen kanssa. Viimeisimmissä kokeissa on kuitenkin saatu tuloksia, joiden mukaan PEG-liuos näyttää parantavan detergentin tehoa ja toimivuutta ulostenäytteiden kanssa. Yksittäin PEG-liuokseen laimennettu norovirusnäyte monistui kuumennettuna ulosteen lisäyksen kanssa. Monistumista tapahtui, mutta se ei ollut nopeampaa tai optimaalisempaa kuin detergenttien kanssa.

7.4 GI noroviruskontrollipartikkelien analysointi

Tämän työvaiheen laboratoriotyöt jaettiin kahteen eri RT-PCR-monistusreaktioon. Työvaiheiden tarkoituksena oli analysoida tässä vaiheessa jatkotutkimuksiin valitut detergentit myös noroviruksen toisen genoryhmän viruspartikkeleiden kanssa. Tutkimukset suoritettiin täysin edellisten laboratorikokeiden kaavaa noudattaen, mutta nyt käyttäen GI partikkeleita, sillä oli olennaista, että detergenttipohjainen näytteenkäsittely on optimaalinen molempien genotyyppien kanssa. Tähän työvaiheeseen valittiin mukaan kahdeksan aiemmissä tutkimuksissa parhaiten toiminutta detergenttiä. Seitsemän detergenttiä valmistettiin reaktioon yhdessä PEG-liuoksen kanssa. Vain Tergitol NP40 detergentti oli aiemmissä tutkimuksissa toiminut optimaalisemmin yksin ainoana näytteenkäsittelyn reagenssina, joten se analysoitiin matalan konsentraation liuoksena.

Noroviruksen toista genoryhmää ei ollut testattu, eikä sen reaktioita detergenttikäsittelyjen ulostenäytteiden kanssa ei voitu tietää. Tästä syystä mukaan otettiin monenlaisia näytteenkäsittelyn olosuhteita. Oletuksena tässä vaiheessa oli se, että GI partikkelit käyttäytyisivät hyvin samalla tavalla kuin aiemmin tutkittu genotyyppi, sillä kopiokäytön määritystä varten tehdyissä alkuvaiheen laboratoriotöissä genotyyppien monistumisessa ei ollut havaittavissa juurikaan eroa. Taulukossa 5 on nähtävissä kaikki tässä vai-

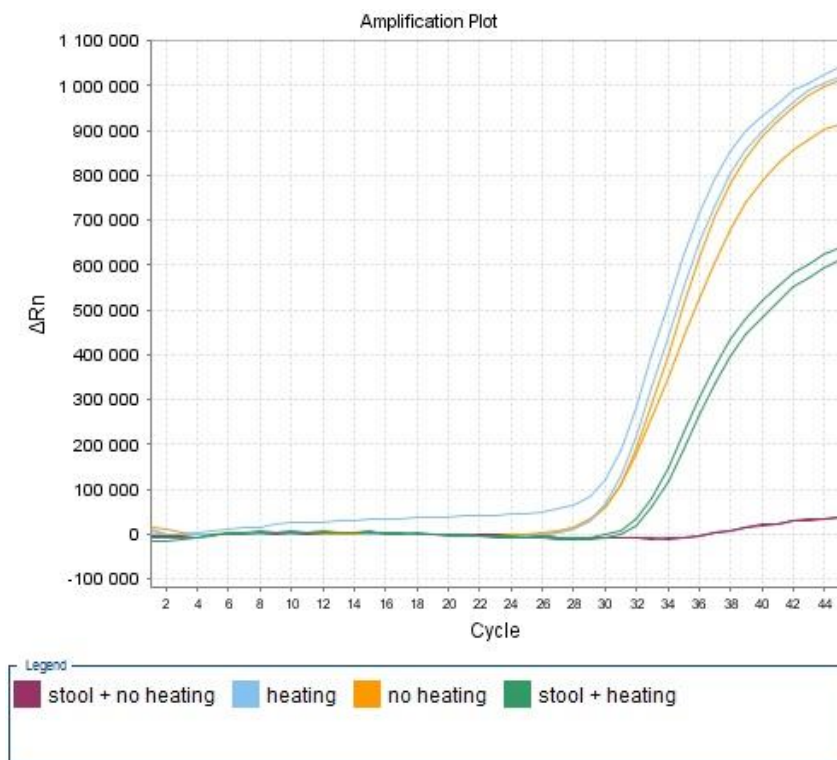
heessa tutkitut näytteenkäsittelyn reagenssit sekä analyseissa tutkitut reaktio-olosuhteet.

Taulukko 5. Taulukossa on listattu tutkimuksissa mukana olleet detergentit ja reaktio-olosuhteet.

	Detergentit	Viruspartikkelilaimennokset	Inkubointi	Uloste
RT-PCR-reaktio 1	Tergitol NP40	1:100, 1:1000	+/-	+/-
	Brij 58 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-
	Igepal CA630 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-
	Brij O10 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-
RT-PCR-reaktio 2	NP40 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-
	Brij C10 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-
	Brij L23 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-
	Tween 20 + PEG	1:100, 1:1000	+/-	+/-

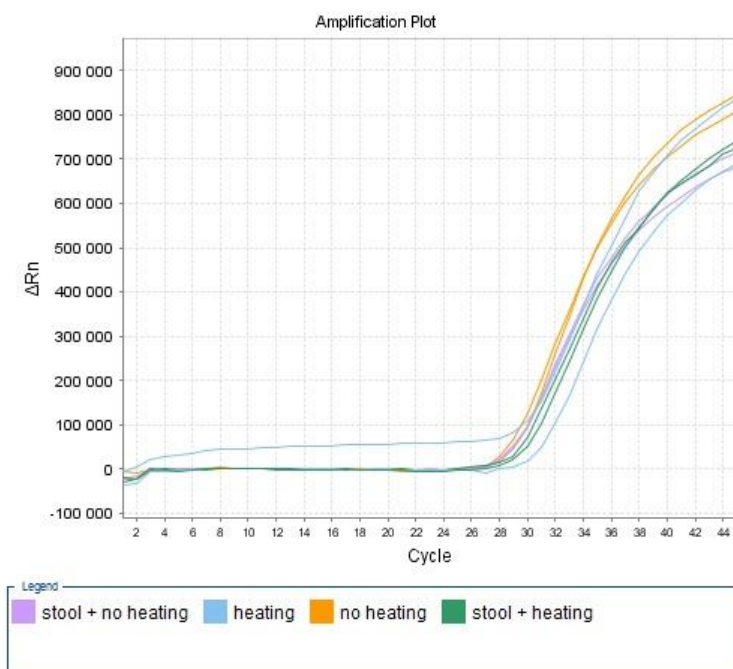
Tutkimuksesta tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että ryhmän GI viruspartikkelit monistuivat selvästi tehokkaammin kaikkien reagenssien kanssa verrattuna genotyyppiin II. Sama reaktio oli havaittavissa myös kaikissa kontrolleissa. Kaikki ensimmäisessä laboratoriokokeessa mukana olleet detergentit monistuivat reaktiossa myös ulosteen lisäyksen jälkeen. Suurin ero oli havaittavissa delta-Rn arvoissa, jotka olivat luokan GI viruspartikkelien kohdalla huomattavasti suurempia. Kuviossa 13 on nähtävissä noroviruksen monistumiskuvaajan Tergitol NP40 detergentin toimiessa näytteenkäsittelyliuoksena. Kuvioista nähdään kaikki tutkitut olosuhteet ja niiden erot. Tämän kuvaajan perusteella voidaan päätellä, että Tergitol NP40 detergentti vaatii inkuboinnin, jos näyttemateriaalina toimii uloste.

Tutkimuksessa mukana olleiden detergenttien välillä monistumiskäyrissä ei ollut havaittavissa selkeitä eroja. Detergentit näyttivät monistuvan lähes samanaikaisesti. Lähes kaikkien tutkittujen detergenttien kohdalla kuumennettu näyte, johon oli lisätty ulostetta, monistui optimaalisesti. Poikkeuksen teki detergentti Brij L23, sillä näytteen kohdalla inkuboinnilla ei havaittu olevan merkitystä monistumisen kannalta.



Kuvio 13. Kuviossa on nähtävissä Tergitol NP40 detergentin monistumiskuvaaja. Näytteet, joihin uloste on lisätty (vihreä ja lila) monistuvat huomattavasti paremmin kuin näytteet ilman ulosteen lisäystä. Kuumennettu näyte (vihreä) toimii kuitenkin selvästi paremmin kuin kuumentamaton (violetti).

Jälkimmäisessä RT-PCR-reaktiossa oli mukana näytteenkäsittelyliuoksena Tergitol NP40 ja polyetyleniglykolin seos jonka näytteen monistumiskuvaajaa (kuvio 14) on havainnollistavaa verrata kuvioon 13, josta on nähtävissä kuvaaja, jossa yksittäinen detergentti toimii näytteenkäsittelyliuoksena. Alemmassa kuvaajassa on esitelty täysin samat olosuhteet kuin kuviossa yllä. Samanlaisia selkeitä eroja eri olosuhteiden välillä ei kuitenkaan ole havaittavissa. Esimerkiksi ulosteen lisäys ei näytä vaikuttavan reaktion monistumiseen juuri ollenkaan. Lisäksi kuumennettujen ja kuumentamattomien näytteiden välillä ei näytä olevan juurikaan eroja. Näyttää siltä, että PEG-liuokseen sekoitettu detergentti on huomattavasti stabiilimpi ja ulosteen ja olosuhteiden vaikutuksista riippumattomampi.



Kuvio 14. Kuviossa on esitelty noroviruksen monistumiskuvaaja detergentin Tergitol NP40 ja PEG-liuoksen toimiessa näytteenkäsittelyliuoksena. Kuviossa on esitelty sama liuos kaikissa eri olosuhteissa. Kuten kuviossa nähdään, eroja olosuhteiden välillä ei juuri ole.

Tästä laboratoriokokeesta saadut tulokset olivat tärkeitä kokeellisen osuuden lopputuloksen kannalta ja niihin voi olla tyytyväinen, sillä on selvää, että näytteenkäsittely soveltuu myös ryhmän GI noroviruskontrollipartikkeleiden analysointiin. Näiden RT-PCR-monistusreaktioiden perusteella ei kuitenkaan voida sulkea pois yhtäkään detergenttiä, sillä niiden välillä ei nähty selkeitä eroja.

7.5 SIBA®-reaktiot

Menetelmän kehittämisen seuraavassa ja viimeisessä vaiheessa tutkittiin detergenttien ja näytteenkäsittelyolosuhteiden toimivuutta SIBA®-reaktiossa. Työvaiheeseen valikoituivat aikaisempien tutkimusten perusteella optimaalisimmat detergentit. Erilaisia testattavia reagenssiolosuhteita oli viimeisessä vaiheessa yhteensä kahdeksan. Tutkimukset jaettiin kahteen eri SIBA®-reaktioon, jotka tehtiin peräkkäisinä päivinä. Eri detergenttejä viimeiseen vaiheeseen valikoitui seitsemän, joista osa testattiin reaktiossa yksin ja osa seoksena polyetyleeniglykolin (PEG) kanssa. Kahteen SIBA®-reaktioon valikoituneet reagenssit ja näytteenkäsittelyn olosuhteet on listattu taulukossa 6.

Taulukko 6. Taulukossa on listattu viimeiseen vaiheeseen valikoituneet reagenssit, reagenssien pitoisuudet ja viimeisessä vaiheessa testatut näytteenkäsittelyolosuhteet.

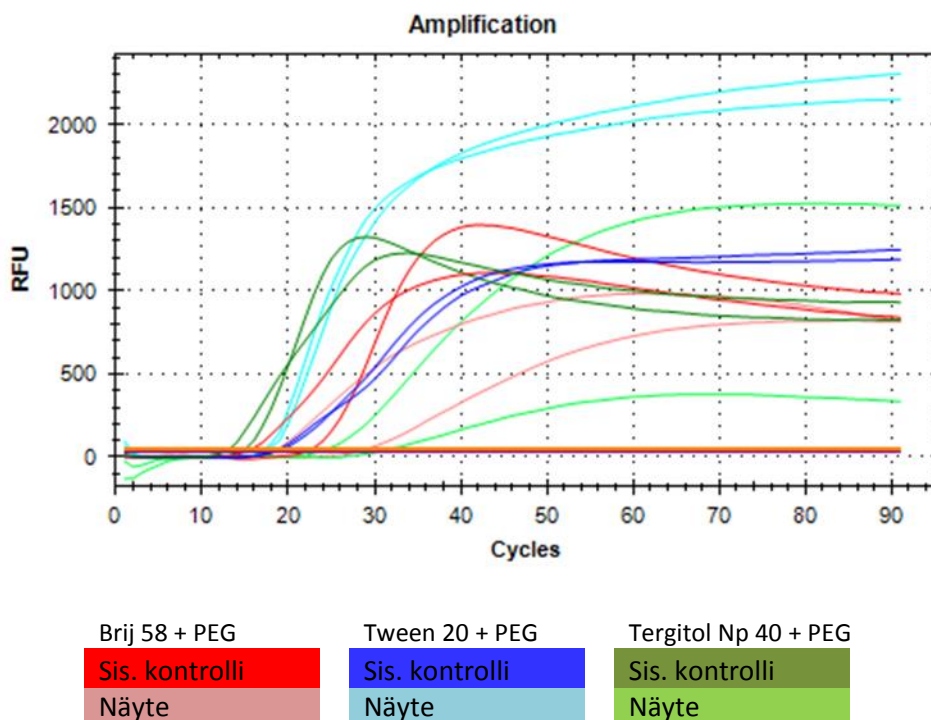
Reagenssi	Inkubointi	Uloste
Brij58 + PEG	+/-	+
Tween 20 + PEG	+/-	+
Tergitol NP40 + PEG	+/-	+
Tergitol NP40	+/-	+
Igepal CA 630 + PEG	+/-	+
Brij L23 + PEG	+/-	+
Brij O10 + PEG	+/-	+
Tween 80 + PEG	+/-	+

Jokaiseen näytteeseen lisättiin ulostetta, sillä tässä työvaiheessa oltiin kiinnostuneita siitä, kuinka uloste vaikuttaa SIBA-reaktioon. Viimeisiin vertailuihin haluttiin ottaa vielä kerran mukaan kuumennuksen vaikutuksen testaaminen, sillä SIBA®-reaktio on erilainen kuin aiemmin testauksissa käytetty RT-PCR-reaktio. Näitä detergentejä ja detergentti-PEG yhdistelmiä ei ollut ennen tutkittu ulostenäytteenkäsittelyn reagensseina SIBA®-reaktioissa.

Norovirus SIBA®-testiä ei ollut käytettävissä, joten tästä syystä hyödynnettiin Orion Diagnostican jo markkinoilla olevaa Orion Genread *C. difficileä* molekyylitestiä. Käytössä olivat *C. difficile* testaukseen tarkoitetut kylmäkuivatut reagenssit. Näytteenkäsittely toistettiin kuten kaikissa aiemmissa testauksissa, mutta noroviruspartikkeleiden tilalta käytettiin aiempien kokeiden tapaan laimennettua *C. difficileä*. SIBA®-reaktioissa kontroleina käytettiin Orion Genread *C. difficile* näytteenkäsittelyyn optimoitua reagenssipuskuria. Jokainen SIBA®-reaktio sisälsi myös sisäisen kontrollin. Sisäisen kontrollin monistuminen oli merkki reaktion toimivuudesta ja sitä oli syytä tarkastella *C. difficile* monistumisen ohella, jotta voitiin nähdä inhiboiko uloste reaktiota.

Ensimmäiseen kahdesta erillisestä tutkimuksesta valikoituneet detergentit näyttivät kaikki toimivan näytteenkäsittelyn reagensseina. Niiden välillä oli kuitenkin selkeitä eroja. Kuvioista 15 on nähtävissä kaikkien ensimmäisessä kokeessa mukana olleiden detergenttikäsitteltyjen *C. difficile* näytteiden monistumiskuvaajat BioRad CFX Manager -ohjelmassa. Kuten kuvioista on nähtävissä, Tween 20 detergenttikäsittellyt näytteet erot-

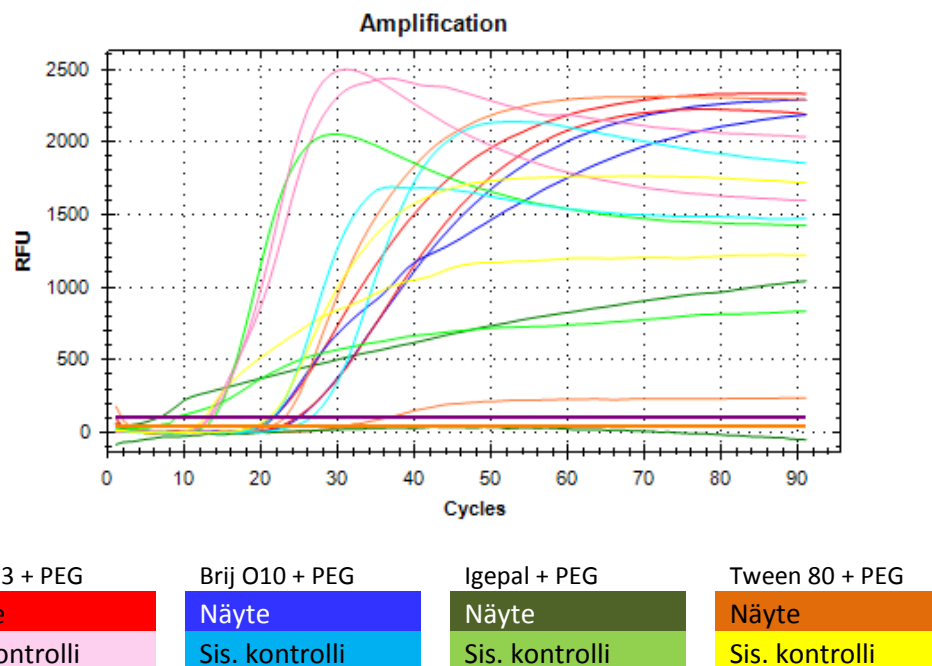
tuvat joukosta edukseen. Kun sitä on käytetty näytteenkäsittelyssä reagenssina, monistuu näyte huomattavasti nopeammin kuin silloin, kun joku muu detergentti on toiminut näytteenkäsittelyvaiheen reagenssina. Kuviossa esitellyt näytteet on kaikki käsittelyvaiheessa kuumennettu.



Kuvio 15. Kuviossa on esitelty Brij 58, Tween 20 ja Tergitol NP40 ja PEG käsitelyjen näytteiden SIBA®-reaktion monistumiskuvaaja.

Kuumennetut näytteet toimivat SIBA®-reaktioissa paremmin, kuin kuumentamattomat näytteet kaikkien näytteenkäsittelyreagenssien kanssa. Näiden tutkimusten perusteella näyttää siis siltä, että kuumennusvaihe on oleellinen SIBA®-reaktiossa. Näissä kokeissa käytetty kuumentamaton ulostenäyte inhiboi SIBA®-reaktiota, mutta lisää kokeita eri ulostenäytteillä täytyisi tehdä, jotta asiasta voitaisiin vetää tarkempia johtopäätöksiä.

Jälkimmäisen SIBA®-reaktion monistumiskuvaaja on nähtävissä kuviossa 16. Myös kaikki kuvaajassa esitellyt näytteet on näytteenkäsittelyvaiheessa kuumennettu. Joukosta erottuu Igepal CA630 näyte, joka monistuu selvästi muita heikommin. Brij L23 detergentti puolestaan erottuu joukosta positiivisesti, sillä sen toimiessa näytteenkäsittelyliuoksena näytteiden monistuminen on nopeampaa kuin muiden detergenttien kohdalla. Näiden tutkimusten perusteella näyttää siltä, että ulostetta sisältävät Tween 20 ja Brij L23 detergenttikäsitellyt näytteet toimivat parhaiten SIBA®-reaktiossa.



Kuvio 16. Kuviossa on esitelty SIBA®-reaktion monistumiskuvaajat kaikkien jälkimmäisessä kokeessa tutkittujen detergenttien osalta. Värikoodit on selitetty kuviossa.

Tutkimuksen tuloksena löydettiin näytteenkäsittely, jonka avulla norovirus monistuu, eikä SIBA-reaktio inhiboidu. Täytyi kuitenkin ottaa huomioon, että SIBA®-reaktiossa määritettiin *C. difficile*n esiintymistä näytteessä Orion Genread *C. difficile* reagenssipakkauksen avulla. Norovirukselle kehitetyn testin ja reagenssien kanssa detergentit saattavat jälleen toimia eri tavalla. Toisaalta mukana oli ulostetta, joten voidaan sanoa, että uloste ei näitä reaktioita inhiboi ja detergenttien tiedetään aiempien tutkimusten perusteella toimivan näytteenkäsittelyssä myös noroviruksen kanssa.

7.6 Yhteenveto

Kokeellisen osuuden ensimmäisen vaiheen tutkimuksista ei saatu selkeitä tuloksia eri detergenttiä sisältävien näytteenkäsittelyreagenssien toimivuudesta. Ilman inkubointia ne norovirusnäytteet, joihin lisättiin ulostetta, eivät monistuneet RT-PCR-reaktioissa yhdenkään detergentin kanssa. Tästä syystä detergenttien välille ei saatu ulosteen lisäyksen jälkeen mitään eroja. Tämä työvaihe kuitenkin näytti ja todisti ulosteen haasteet näyttemateriaalina. Näissä kokeissa käytetty kuumentamaton ulostenäyte inhiboi RT-PCR-reaktiota. Noroviruksen RNA monistui reaktiossa ilman ulostetta, mutta ulosteen lisäyksen jälkeen, reaktio estyi eikä monistumista ollut enää havaittavissa. Tämän

työvaiheen aikana luotiin toimintatavat ja valittiin detergenttien pitoisuudet, käytetyt kontrollit ja noroviruslaimennoksen suhde, joissa pitäydyttiin tutkimuksen loppuun asti.

Seuraavassa työvaiheessa detergenttien välille saatiin eroja näytteenkäsittelyprotokollaan lisätyn 5 minuutin inkubaation avulla. Kuumentaminen paransi huomattavasti ulostenäytteiden monistumista RT-PCR-reaktioissa. Tästä huolimatta vain yksi detergentti, Tergitol NP40, erottui muista paremmilla monistumiskäyrillä. Kuumentaminen kuitenkin paransi reaktioita ja ensimmäisen kerran myös eri reagensseihin näytteenkäsittelyvaiheessa laimennettujen ulostenäytteiden välillä oli havaittavissa eroja. Tämä työvaihe todisti, että kuumennus vaikuttaa reaktioon paljonkin, mutta tämän vaiheen jälkeen oli myös selvää, että näytteenkäsittelyprotokolla vaati lisää kehittämistä.

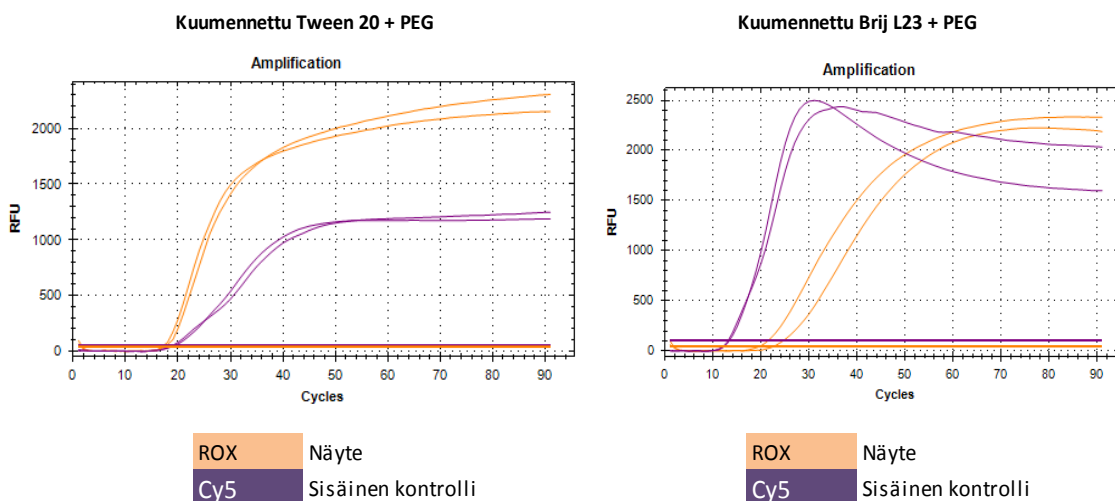
Kun detergenteistä näytteenkäsittelyvaiheessa tehtiin seoksia polyetyleeniglykolin kanssa, saatiin huomattava parannus RT-PCR monistumiskäyriin myös näytteiden kohdalle, joihin oli lisätty ulostetta. Tämän työvaiheen aikana eri detergentein käsiteltyjen näytteiden välille saatiin näkymään hyvin selkeitä eroja. Suuri osa tutkimukseen valikoiduista detergenteistä monistui reaktiossa polyetyleeniglykolin kanssa hyvin. Tämä työvaihe oli ensimmäinen, jonka jälkeen osa detergenteistä uskallettiin sulkea pois lopuista tutkimuksista.

Noroviruksen GI genoryhmän näytteet analysoitiin RT-PCR-reaktioissa kahdeksan jatkoon valitun näytteenkäsittelypuskurin kanssa. Tällä haluttiin varmistaa, että valittu detergentin toimintaan perustuva näytteenkäsittely on optimaalinen molemmille yleisimmistä noroviruksen genotyypeistä. Tutkimuksesta saadut tulokset olivat positiivisia, sillä kaikki detergenttipolyetyleeniglykoli seokset toimivat näytteenkäsittelyliuoksina myös GI genotyypille. GI tyyppi näytti monistuvan jopa paremmin kuin koko aiemman tutkimuksen ajan kohteena ollut GII tyyppi.

Opinnäytetyön viimeinen vaihe koostui detergenttikäsiteltyjen näytteiden analysoinnista SIBA®-reaktioissa. Tämän työvaiheen tarkoituksena oli määrittää, vaikuttavatko valitut detergentit SIBA®-reaktioon ja toimivatko detergenttikäsitellyt ulostenäytteet kylmäkuivattujen SIBA®-reagenssien kanssa. Myös näistä viimeisen vaiheen laboratoriotöistä saadut tulokset olivat lopputuloksen kannalta onnistuneita tuloksia, sillä osa tiettyihin detergenteihin laimennetuista näytteistä monistui reaktiossa hyvin niin sisäisen kontrollin kuin *C. difficile* näytteiden kanssa. Opinnäytetyön aiemmissa laboratoriotöissä RT-PCR-reaktioissa käytetty reaktiotalavuus on pieni verrattuna kylmäkuivattujen SIBA®-reagenssien vaatimaan työnkulkuun. Detergenttien välillä oli jälleen havaittavissa

eroja ja joukosta erottui muutama paremmin kylmäkuivatuille SIBA®-reagensseille ulostenäytteenkäsittelyyn soveltuva detergentti.

Viimeisen vaiheen tutkimuksista SIBA®-reaktiossa esiin nousivat detergentti Tween 20 ja Brij L23 käsitellyt näytteet. Kuviossa 17 esitellään *C. difficile*n monistumiskuvaaja SIBA®-reaktiossa BioRad CFX Manager -ohjelmassa detergentin Tween 20 ja PEG-liuoksen sekä Brij L23 ja PEG seoksen toimiessa näytteenkäsittelyreagenssina. Kuten kuviosta nähdään, näytteet monistuvat reaktiossa optimaalisesti ja rinnakkain. Mukana kuvaajassa on myös sisäisen kontrollin monistumiskuvaaja.



Kuvio 17. Kuviossa ovat nähtävissä SIBA®-reaktiossa muita detergentejä paremmin monistuneet Tween 20 (vasen) ja Brij L23 (oikea) detergenttiin laimennetut rinnakkaiset näytteet.

Kun viimeisimpiä monistumiskäyriä verrataan alkupään töistä saatuihin monistumiskäyriin, on kehitys selvästi havaittavissa. Alkuvaiheessa ne norovirusnäytteet, joihin oli lisätty ulostetta, eivät monistuneet lainkaan. Työn loppuvaiheessa kuumennettu detergentillä ja polyetyleeniglykolilla käsitelty näyte monistui myös ulosteen lisäyksen jälkeen lineaarisesti. Taulukossa 7 on esitelty yhteenveto saaduista tuloksista.

Taulukko 7. Taulukossa on esitelty yhteenveto opinnäytetyön kokeellisen osuuden tuloksista vaiheittain.

Tulosten yhteenveto:			
Työvaihe	Detergentit	Työvaiheen merkitys	Johtopäätökset
Vertailu ilman inkubointia	Brij 58	Todisti ulosteen haasteet näytemateriaalina. Detergenttien pitoisuudet, käytetyt kontrollit, noroviruslaimennoksen suhde tarkentuivat.	Ei selkeitä tuloksia eri detergenttien toimivuudesta.
	Brij O10, Brij C10, C13E10, Tween 20		
	Brij L23, C7BzO		
Vertailu inkuboinnin kanssa	Tween 80, Tergitol NP40	Kuumennusvaiheen merkitys tarkentui. Näytteenkäsittelyprotokolla vaatii yhä kehittämistä.	Kuumentaminen paransi ulostenäytteiden monistumista. Tergitol NP 40 erottui joukosta.
	Igepal CA-630, Triton x-100		
	Brij 58, C13E10		
	Brij O10, Tween 20		
	Brij C10, C7BzO		
Vertailu PEG + detergentti	Brij L23	Detergenttejä voitiin sulkea pois.	Huomattava parannus ulostenäytteiden monistumiseen.
	Brij 58, C13E10		
	Tergitol NP40 + Tween 80		
	Igepal CA-630, Triton x-100, Brij O10, Tween 20		
	Brij C10, C7BzO		
Toimivuuden testaus GI genoryhmän kanssa	Brij 58 + PEG, Tween 20 + PEG, Tergitol NP-40 + PEG, Tergitol NP 40, Igepal CA630 + PEG, Brij L23 + PEG, Brij O10 + PEG, Tween80 + PEG	Todistettiin, että valitut detergentit toimivat myös noroviruksen GI tyyppin kanssa.	GI monistuu jopa paremmin kuin GII tyyppi.
	Brij 58 + PEG, Tween 20 + PEG, Tergitol NP-40 + PEG, Tergitol NP 40, Igepal CA630 + PEG, Brij L23 + PEG, Brij O10 + PEG, Tween80 + PEG		
Toimivuuden testaus SIBA-reaktiossa	Brij 58 + PEG, Tween 20 + PEG, Tergitol NP-40 + PEG, Tergitol NP 40, Igepal CA630 + PEG, Brij L23 + PEG, Brij O10 + PEG, Tween80 + PEG	Ulostenäytteet toimivat detergenttien kanssa SIBA-reaktioissa.	Tween 20 ja Brij L23 detergentit nousivat esiin.

Lopputuloksena tästä opinnäytetyöstä saatiin kokoon kattava pohjatyö noroviruksen näytteenkäsittelyprosessille ennen SIBA®-monistusreaktiota. Tuloksena saatiin kokonaisuus, joka koostui detergenttikäsiteltyjen näytteiden vertailusta useissa eri olosuhteissa. Detergenttikäsiteltyjen näytteiden käyttäytymistä korkean konsentraation PEG-liuoksen kanssa tarkasteltiin ja niiden toimivuuden huomattiin parantuvan. Loppuun valittujen detergenttipohjaisten näytteenkäsittelyreagenssien tiedetään toimivan noroviruksen näytteenkäsittelyyn ryhmien GI ja GII kanssa. Lisäksi tiedetään, että näissä kokeissa käytetty kuumentamaton ulostenäyte inhiboi SIBA®-reaktiota, mutta lisää kokeita eri ulostenäytteillä täytyisi tehdä, jotta asiasta voitaisiin vetää tarkempia johtopäätöksiä. Jos johtopäätös pitää paikkansa, kuumennusvaihe on välttämätön.

8 Tulosten luotettavuuden tarkastelu

Opinnäytetyössä noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä ja tutkimusetiikkaa. Työn kokeellinen osuus suoritettiin huolellisesti ja tarkasti. Työn suoritus ja siinä käytetyt reagenssit kirjattiin ylös. Tulokset dokumentointiin ja esitettiin rehellisesti sellaisina kuin ne oli saatu. Kaikki kirjattiin ylös huolellisesti sekä verkkolevyille sähköiseen muotoon, että kirjallisesti laboratoriopäiväkirjaan.

Näytteenkäsittelyn reagensseja tarkasteltaessa työn tulosten luotettavuutta ajatellen on tärkeää, että kaikki opinnäytetyössä käytetyt liuokset tehtiin Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen laboratorioden liuostenteko-ohjeita noudattaen. Tarkat työvaiheet ja käytetyt reagenssit tietoisena kirjattiin laboratorion liuoskirjaan. Tutkimuksissa detergenttien punnitsemiseen käytetty vaaka kalibroitiin joka viikko ennen ensimmäistä käyttökertaa. Jokaiselle tehdyille liuokselle annettiin myös erääntymispäivämäärä, joka 10 % detergenttiliuoksilla oli kuusi kuukautta. Työohjeet sisälsivät myös tarkat dokumentoinnit siitä miten ja milloin käytössä olleet detergentit oli valmistettu, jotta jokainen reagenssi ja työvaihe ovat jäljitettävissä.

Optimaalisinta opinnäytetyöstä saatujen tulosten kannalta olisi ollut se, että koko työn kokeellisen osuuden ajan kaikkiin detergenttivotailuihin ja reagenssitutkimuksiin olisi käytetty samaa RT-PCR-laitetta. Tällöin tulokset olisivat olleet keskenään vertailukelpoisempia. Nyt saatuja tuloksia on kuitenkin tarkasteltu, koottu ja muokattu eri ohjelmilla, jotka antavat esimerkiksi toisistaan graafisesti eroavat monistuskäyrien kuvaajat. Toisaalta tämän tuotekehitysvaiheen tutkimuksissa oli pääasiassa tarkoituksena tarkastella detergenttien toimivuutta ulosteen ja noroviruksen kanssa. Vasta myöhem-

mässä vaiheessa olennaiseksi tulevat tarkemmat vertailut toimivien detergenttien välillä. Tulevaisuuden työvaihe vaatii useita toistoja ja on erityisen tärkeää, että silloin olosuhteet eri RT-PCR-reaktioiden välillä eivät vaihtele, vaikkakin useat RT-PCR-reagenssipakkaukset ovat validoituja monille eri laitteille.

Kaikkiin käytössä olleisiin laitteisiin voitiin kuitenkin asettaa identtinen monistusohjelma, joten työssä käytetyistä laitteista saatuja tuloksia voidaan siis pitää keskenään vertailukelpoisina samanlaisten ajo-olosuhteiden takia, vaikka tulosten ulkoasu grafiikan osalta eroaakin hieman. Täytyy myös ottaa huomioon, että saman laitteen sisäisissä PCR-reaktioissa saattaa olla pientä muuttuvuutta.

RT-PCR-reaktioista saadun datan käsittely ja laitteiden käyttöjärjestelmien hallinta oli suuri osa tätä opinnäytetyötä. Tulosten oikeaoppinen käsittely vaati paljon harjoittelua. Datat siirtäminen dokumentoitavaan muotoon oli tärkeä työvaihe, joka oli tehtävä ennen seuraavaa tutkimusta, sillä usein työ eteni seuraavaan vaiheeseen edellisten tulosten perusteella. Kaikista saaduista tuloksista koottiin Excel-välilehti, johon liitettiin tärkein yhteenveto monistuskuvajia helposti tarkasteltavaan muotoon. Kaikissa RT-PCR-reaktioissa käytettiin joko ViiA™ 7 Real-Time PCR System- tai Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System -laitteita ja työn loppuvaiheen SIBA®-reaktioissa Bio-Rad -laitteita. Dokumentointi oli tehtävä niin, että tuloksia voi helposti ja luotettavasti tarkastella myös jälkikäteen.

Jokaisessa opinnäytetyön kokeellisen osuuden laboratoriotutkimuksessa ja RT-PCR-reaktiossa oli mukana kontrolleja. Kontrollien avulla haluttiin varmistaa jokaisen reaktion toimivuus ja parantaa saatujen tulosten luotettavuutta. Kontrolleita oli mukana sekä näytteenkäsittelyvaiheessa että lopullisissa RT-PCR-reaktioissa. Tutkimuksen suorittaminen oli kokonaisuudessaan pitkä prosessi, joka alkoi detergenttien liuottamisella, kulki näytteenkäsittelyn kautta RT-PCR-reaktion valmisteluun, ja päättyi lopulta valmiin näytteen lisäykseen kuoppalevyn reaktiokaivoon. Näin monivaiheisessa työssä virhelähteitä on lukuisia ja tästä syystä kontrollit ovat tärkeitä luotettavuuden mittareita tutkimuksen jokaisessa vaiheessa.

Näytteenkäsittelyvaiheen kontrollina opinnäytetyössä käytettiin PBS-puskuria. Detergenttikäsittelyn kontrolliksi valittiin suodatinputki, joka ei sisältänyt hajottavia reagensseja. Mikäli kontrollin monistumiskuvajassa havaittiin jotain normaalista poikkeavaa, oli syytä epäillä virhettä näytteenkäsittelyvaiheessa. Tällöin muita samasta tutkimuksesta saatuja tuloksia ei voitu pitää luotettavina. Toisaalta, jos kontrollinäyte monistui

kuten pitääkin, voitiin olettaa, että myös muiden samoin käsiteltyjen näytteiden tulokset olivat luotettavia.

Näytteenkäsittelyn lisäksi kontrolleita oli mukana jokaisessa RT-PCR-reaktiossa. PCR-reaktion kontrolleita käsiteltiin kuten muita näytteitä ja niitä pipetoitiin reaktioon sama määrä. Reagenssipakkauksen valmistajan toimittamista positiivisesta ja negatiivisesta kontrollista tehtiin aina rinnakkaiset reaktiot, jotta niiden antamia tuloksia voitiin pitää luotettavina. Näiden kaupallisten kontrollien avulla varmistuttiin kontaminaatiolle herkän PCR-reaktion toimivuudesta ja puhtaudesta. Kaupallisten kontrollien lisäksi näytteen tavoin kuoppalevyille pipetoitiin PBS-puskuria. Tässä vaiheessa käytössä oli sama pus-kuri, johon norovirusnäyte laimennettiin ja joka toimi näytteenkäsittelyn kontrollina. Puskuri oli mukana reaktiossa, sillä sitä käytettiin reagenssina monessa tutkimuksen kannalta olennaisessa vaiheessa ja sen puhtaudesta haluttiin varmistua.

Edellä esiteltyjen jokaisessa reaktiossa mukana olleiden vakiokontrollien lisäksi osaan reaktioista valikoitui mukaan myös muita kontrolleja. Kontrollit valittiin usein tutkimuksesta ja sen sisällöstä riippuen. Usein mukana kontrollina oli myös vesi. Opinnäytetyön alkuvaiheen tutkimuksissa erilaisia kontrolleja, laimennoksia ja yhdistelmiä tutkittiin tarkemmin, jotta reaktion kulku voitiin vaihe vaiheelta todeta luotettavaksi, ja jotta reagenssien väliset ristikontaminaatiot voitiin sulkea pois.

Opinnäytetyön luotettavuuden ja tulosten toistettavuuden kannalta käytettyjen noroviruspartikkeleiden kopiokopiojen määrittäminen olisi ollut tärkeää ja olennaista. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista keinoilla, joita oli tässä vaiheessa laboratoriotyöskentelyä käytettävissä. Toisaalta, näin alkuvaiheessa näytteenkäsittelyn kehittämistä oli tärkeintä löytää noroviruksen kanssa toimivia detergentejä, tarkoista kopiokopioista riippumatta, sekä saada näkyviä eroja eri detergentsuhteiden välille. Mikäli näytteenkäsittelyn optimointia tämän opinnäytetyön jälkeen halutaan jatkaa, voidaan määrittää käytetyn viruksen tarkat kopiokopiot, jotta testin herkkyys on tiedossa. Opinnäytetyön laboratoriotöissä jouduttiin miettimään tarkkaan noroviruskontrollipartikkelien laimennossuhteita ja sopivan laimennossuhteen löytyessä, tämä pidettiin samana koko opinnäytetyön tutkimusten ajan. Tämä oli tärkeää siksi, että tuloksia voitiin pitää keskenään vertailukelpoisina. Perusteet laimennossuhteiden valinnalle on selitetty kappaleessa 7 tulosten tulkinnasta.

9 Pohdinta

Detergentteihin pohjautuvan näytteenkäsittelyn kehittäminen noroviruksen nukleiinihappodiagnostiikkaan onnistui odotettua paremmin. Opinnäytetyöprosessi oli opettavainen kokonaisuus ja sen kokeellinen osuus oli haastava, mutta kehittävä vaihe. Koska käytössä ollut aika oli rajallinen, työ oli rajattava sen tulosten ja sujuvuuden mukaan ja keskeytettävä aikarajojen puitteissa. Aiheen rajaaminen etukäteen oli hankalaa, sillä työ eteni usein seuraavaan vaiheeseen edellisten tulosten perusteella. Tästä syystä tarkkaa työsuunnitelmaa oli haastavaa etukäteen tehdä ja koko työn ajan täytyi pitää mielessä kokeellisen osuuden rajallisuus. Oli tärkeää lopettaa työ kokonaisuuden kannalta hyvään vaiheeseen.

Ennen opinnäytetyön aloittamista ohjaajien toimesta painotettiin sitä, että myös negatiiviset tulokset ovat tuloksia, ja on hyvä varautua siihen, että mikään suunniteltu ei välttämättä toimi. Tähän alkuoletukseen nähden opinnäytetyöstä saadut tulokset olivat kiitettäviä ja sille asetetut tavoitteet toteutuivat. Näytteenkäsittelyn kehittämistä olisi lopputulosten kannalta voinut myös jatkaa eteenpäin. Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet liittyivät kuitenkin alkuvaiheen tuotekehitykseen ja on selvää, että näytteenkäsittelyn kehittäminen ja optimointi on pitkä prosessi. Esimerkiksi opinnäytetyön alussa tilattuja detergentejä, ei kaikkia ehditty kokeilla lainkaan. Detergentejä valikoitui lopullisiin tutkimuksiin 11, joka sekin oli jo kattava luku.

Lopputulosta ajatellen olisi kuitenkin ollut optimaalista päästä tutkimaan kaikkia tilattuja detergentejä näytteenkäsittelyliuoksina noroviruksen ja ulosteen kanssa, sillä nyt monia potentiaalisia detergentejä jäi tutkimusten ulkopuolelle. Olisi myös ollut hyvä päästä vertaamaan eri detergenttien toimivuutta yhdessä, sillä detergenttien yhdistelemistä suositeltiin useissa tähänkin opinnäytetyöhön lainatuissa artikkeleissa sekä valmistajien manuaaleissa. Erilaisten detergenttiyhdistelmien tutkiminen olisi kuitenkin vaatinut reilusti enemmän aikaa kuin käytössä oli, ja jotta erilaisia olosuhteita olisi voinut tarkemmin tutkia, olisi detergentejä pitänyt alkujaankin olla tutkimuksissa vähemmän. Detergenttien pitoisuuksia olisi myös voinut optimoida lisää, sillä tutkimuksiin valikoitunut matalan konsentraation detergentti päätettiin muutaman kokeen perusteella. Eri detergentit ovat myös erilaisia ja niiden ominaisuudet ja esimerkiksi optimaalinen konsentraatio reaktiossa eroavat toisistaan. Jos aikaa olisi ollut enemmän, myös detergenttien konsentraatioita olisi voinut optimoida hieman enemmän.

Viimeisen työvaiheen jälkeen olisi ollut hyvä jatkaa esimerkiksi tarkempien konsentraatioiden optimoinnilla ja Ct-arvojen vertailulla, jonka jälkeen eroja näytteenkäsittelyreagenssien välillä on helpompi havaita. Myös pienemmän noroviruspartikkelikonsentraatiot saattavat näyttää detergenttien välillä olevat erot.

Opinnäytetyön aikana pohdin paljon sitä miksi norovirusdiagnostiikkaa kehitetään ja minkälaisille toimijoille tuotteita valmistetaan. Miksi kehittää tunnistavaa diagnostiikkaa sellaista taudinaiheuttajaa vastaan, jonka tartuntaa valtaosalla väestöstä hoidetaan levolla ja joka on itsestään ohi muutamassa vuorokaudessa? Oma kokemukseni kyseisestä viruksesta ennen tätä tutkimusta rajoittui sairaalamaailmaan, joissa norovirusepidemiat näkyivät laboratorion työntekijälle vain eristyspotilaiden lisääntymisenä näytteitä haettaessa. Eristymiseen pukeutuminen ja sitä varten varautuminen vie laboratorion henkilökunnalta huomattavasti enemmän aikaa kuin normaalin potilaan kanssa työskentely. Samat säännöt koskevat toki myös muuta sairaalan henkilökuntaa. Jos potilaalla epäiltiin norovirusta tai muuta ripulitautia, oli toimittava hyvin nopeasti ja varauduttava siihen, että kyseessä on jokin helposti tarttuva ja leviävä tauti. Tästä syystä noroviruksen tai muun ripulia aiheuttavan patogeenin saanut eristettiin heti, jotta voitiin ennaltaehkäistä taudin leviäminen koko sairaalan sisäiseksi epidemiaksi.

Toimintaohjeet ovat samat riippuen siitä mitä ripulia aiheuttavaa tautia tartunnan saanut henkilö sairastaa. Itse näen haasteita norovirusdiagnostiikalle osana sairaaloiden työtä, sillä diagnoosista riippumatta toimintaohjeet ovat samat ja on tärkeää toimia jo ensimmäisten oireiden ilmestyessä. Toisaalta, jos testi on helppo ja nopea tehdä, sen avulla voidaan sulkea pois luultuja norovirustartuntoja, jouduttaa toimenpiteitä ja vähentää potilaiden turhaa eristämistä. Täytyy miettiä myös sitä, että norovirusta sisältävien näytteiden käsittelyssä on omat riskinsä. Nykymaailmassa ihmisten tietoisuus sairauksista kuitenkin kasvaa, ja yhä useampi haluaa diagnoosin jokaiselle vaivalle, ja on myös valmis maksamaan siitä tiedosta.

Rajua ripulia, esimerkiksi norovirusta, sairastavan ihmisen ei kannata lähteä lääkäriasemalle hakemaan diagnoosia ensimmäisinä päivinä sairastumisesta. Norovirus on hyvin helposti tarttuva joten taudin leviäminen on hyvin suuri riski, jos sairaana lähtee tiloihin, joissa on paljon muita ihmisiä. Jos tauti ei muutamassa päivässä helpotu ja tai katoa tilanne on toki eri ja tällöin on hyvä, että tiettyjä vaihtoehtoja voidaan sulkea pois. Jos tilanne on tämä, tietyt vaihtoehdot on optimaalista sulkea pois jo taudin alkuvaiheessa. Norovirus tarttuu laajalti myös ruuan ja veden kautta, ja aiheuttaa usein näiden reittien kautta laajoja epidemioita. Tällöin on tärkeää diagnosoida tartunnan aiheuttaja

ja löytää tartuntareitti, jolloin voidaan ennaltaehkäistä taudin leviämistä ja välttää vastaavia tilanteita tulevaisuudessa.

Opinnäytetyön virhelähteitä on myös hyvä pohtia ja eritellä. Yhtenä mahdollisena virhelähteenä pidän sitä, että kaikki opinnäytetyöhön liittyvät laboratoriotutkimukset ja niiden työhjeet suunniteltiin itse. Jos kukaan muu ei tarkasta tai lue työhjeita, on aina riski virheisiin, joita tekijä ei itse huomaa. Virheet kuitenkin tulevat vastaan ja jäävät kiinni myöhemmissä tuotekehityksen vaiheissa. Lähes kaikki se mitä tämän opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa tuli vastaan, oli itselleni uutta opeteltavaa. Opetellessa virheitä sattui, mutta jos virheet itse tiedosti, niistä oli mahdollisuus oppia, ja niiden vaikutus tuloksiin voitiin havaita ja minimoida.

Myös työn monivaiheisuus oli riski, sillä yksi laboratorion koe piti päästä aloittamaan aamulla, jotta tulokset ehtivät seuraavaksi päiväksi. Näin monivaiheisessa työssä virheiden mahdollisuus lisääntyy. Kun käytäntöjä oppi, työn suorittaminen nopeutui ja helpotui. Oli myös osattava suunnitella seuraavan päivän töitä esimerkiksi detergenttiliuosten valmistamisen osalta. Koska myös dokumentointi ja esimerkiksi tulosten tulkinta oli hyvin tärkeää, sille piti osata ottaa aikaa ja hyväksyä se, että ihan jokaisena päivänä ei välttämättä ehdi lainkaan laboratorioon.

Uskon, että jatkossa norovirusdiagnoositiikan näytteenkäsittelyä mahdollisesti kehitettäessä Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitys saa opinnäytetyöstäni kattavan pohjatiedon ja hyödyn. Matkaa toki on vielä lopulliseen näytteenkäsittelyyn, mutta kehitystyö on aloitettu ja siinä on päästy jo pitkälle. Tutkimuksesta voi olla hyötyjä myös muiden virusten tai bakteerien näytteenkäsittelyä kehiteltäessä, sillä uusia detergenttejä tilattiin laboratorioon useita. Opinnäytetyöstä saatiin myös tietoa detergenttikäsitteltyjen ulosteenäytteiden käyttäytymisestä RT-PCR- ja SIBA-reaktioissa.

Opinnäytetyön aikana opin paljon tuotekehityslaboratorion toiminnasta ja työtavoista. Kehityin itsenäisenä työskentelijänä ja opin myös arvostamaan enemmän omaa osaamistani ja luottamaan itseeni ja ammattitaitooni. Opin paljon dokumentoinnin tärkeydestä. Sain kattavan kuvan molekyylibiologian ja RT-PCR-menetelmän toimintatavoista ja esimerkiksi puhtausluokituksista ja työturvallisuudesta. Kokonaisuudessaan aika Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä oli opettavaista ja antoisaa.

Lähteet

- Applichem 2008. Detergents. Verkkodokumentti. <<http://www.laboratornichemikalie.cz/data/upload/files/Detergents.pdf>>. Luettu 8.10.2016.
- Anttila, Veli-Jukka – Nieminen, Tea – Maunula, Leena 2010. Norovirusten aiheuttamat gastroenteriitit laitosten ongelmana. Katsaus. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. <http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&viewType=viewArticle&tunnus=duo98916>. Luettu 6.9.2016.
- Bustin, Stephen 2004. A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology Series. 51-58.
- Caligur, Vichi 2008. Detergent Properties and Applications. BioFiles verkkodokumentti. <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/detergent-properties.html>>. Luettu 2.11.2016.
- Eboigbodin, Kevin – Hoser, Mark 2015. Multiplex Strand Invasion Based Amplification (mSIBA) assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Verkkodokumentti. <<http://www.nature.com/articles/srep20487>>. Luettu 10.10.2016.
- Elintarviketurvallisuusvirasto 2016. Norovirus. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-virusia/norovirus/usein-kysyttya-noroviruksesta/>>. Luettu 7.9.2016.
- Eskelinen, Seija 2016. Vieritestit. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03204> Luettu 6.9.2016.
- Hoser, Mark – Mansukoski, Hannu – Morrical, Scott – Eboigbodin, Kevin 2014. Strand Invasion Based Amplification (SIBA®): A Novel Isothermal DNA Amplification Technology Demonstrating High Specificity and Sensitivity for a Single Molecule of Target Analyte. Verkkodokumentti. <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112656>>. Luettu 2.10.2016.
- Huovinen, Pentti 2005. Teoksessa Meri, Seppo - Peltola, Heikki - Vaara, Martti - Vaheeri, Antti - Valtonen, Ville. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1, Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 599-600.
- Huslab 2016. Tutkimusohjekirja. Norovirus, nukleiinihappo. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/4940.html>>. Luettu 15.11.2016.
- Jaakola, Sari – Lyytikäinen, Outi – Rimhanen-Finne, Ruska, Salmenlinna, Saara – Vuopio, Jaana – Roivanen, Merja – Nohynek, Hanna – Löflund, Jan-Erik – Kuusi, Markku – Ruutu, Petri (toim.) 2013. Tartuntataudit suomessa 2012. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Raportti. <http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/104475/URN_ISBN_978-952-245-890-2.pdf?sequence=1>. Luettu 7.9.2016
- Johnson, Mary 2014. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. Verkkodokumentti. <<http://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>>. Luettu 2.11.2016.

Lappalainen, Maija – Vainionpää, Raija – Hedman, Klaus 2011. Virologiset tutkimukset. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 54-64.

Lounamo, Kari – Tuuminen, Tamara – Kotilainen, Hannele 2014. Infektioiden tarttuvuustekijät. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. <http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/uusinnumero?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articlepolet&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=Duo11602&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_>. Luettu 18.3.2016.

Lumio, Jukka 2012. Norovirus. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00738>. Luettu 18.3.2016.

Mattila L – Järvinen A 2011. Maha – suolikanavan infektiot ja ripulitaudit. Teoksessa Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Verkkopainos. Helsinki. Kustannus Oy Duodecim.

Mikrobioni 2012. PCR – kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio. <<http://www.mikrobioni.fi/palvelut/analyysipalvelut/qpcr-menetelma/>>. Verkkodokumentti. Luettu 8.9.2016.

Nordlab 2016. Potilasohje. Ulostenäytteenotto mikrobiologian tutkimuksiin. <http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/ulostenayte.pdf>. Luettu 7.11.2016.

Ranki-Pesonen, Marjut 1994. Diagnostiset ongelmat. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Verkkodokumentti. <http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&viewType=viewArticle&tunnus=duo40130&_dlehti_haku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth=>>. Luettu 8.9.2016.

Robilotti, Elizabeth – Deresinski, Stan – Pinsky, Benjamin A 2015. Norovirus. Clinical Microbiology Reviews. Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA. <<http://cmr.asm.org/content/28/1/134.full.pdf>>. 134–164

Rönqvist, Maria 2013. Viruskontaminaatioiden hallinta elintarviketuotannossa. Seminaari. Helsingin yliopisto. <https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/riskinarviointi/seminaarit/evira_nettiin12_4__maria_.pdf>. Luettu 29.10.2016. 2-24.

Orion Diagnostica Oy 2016. Orion GenRead. Tuotetiedot. Verkkodokumentti. <<http://www.oriondiagnostica.fi/tuotteet/Orion-GenRead/Orion-GenRead-C-difficile/>>. Luettu 18.3.2016.

Salo, Satu – Rättö, Marjaana – Tsiko, Irina – Miettinen, Hanna 2013. Virusriskin vähentäminen Elintarviketuotannossa. VTT Expert Services Oy. Verkkodokumentti. <http://www.ravitsemusneuvottelukunta.fi/files/attachments/fi/riskinarviointi/virus_evira_salo_120413_netdiversio.pdf>. Luettu 15.10.2016.

Suominen, Ilari - Pärssinen, Raimo - Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulu. <<http://julkaisut.turkuamk.fi/geenitekniikka/index.html>>. Luettu 9.9.2016.

THL 2016. Noroviruksen esiintyvyys 2015. Tartuntatautirekisteri. Verkkodokumentti.
<<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiat/tartuntatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyys-2015/noroviruksen-esiintyvyys-2015>>. Luettu 15.11.2016

qPCR Guide. Eurogentec. Verkkodokumentti.
<<http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>>. Luettu 7.11.2016

Detergenttilista

Liitteessä 1 on esitelty kaikki opinnäytetyötä varten tilatut detergentit.

CMC = Critical Micelle Concentration

Detergentit	Tehty	Ryhmä	CMC	Synonyymi
Brij C10	10 %	Non-ionic	0,002 mM	Polyethylene glycol hexadecyl ether, Polyoxyethylene (10) cetyl ether. <i>huom! Muodostaa PEGin kanssa sitkeän seoksen!</i>
Brij 58 x	10 %	Non-ionic	0,008 mM	Polyethylene glycol hexadecyl ether, Polyoxyethylene (20) cetyl ether
Tween 80 o	10 %	Non-ionic	0,012 mM	POE(20)sorbitan monooleate, Polyethylene glycol sorbitan monooleate, Polyoxyethylenesorbitan monooleate, Polysorbate 80
Tween 20 x	10 %	Non-ionic	0,06 mM	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate, Polyoxyethylenesorbitan monolaurate.
IGEPAL CA-630 o	10 %	Non-ionic	0,08 mM	Nonident P 40 , octyl phenoxy polyethoxyethanol
Brij L23 o	10 %	Non-ionic	0,09 mM	Vanha nimi Brij 35. C12E23, Polyoxyethylene (23) lauryl ether
C13E10	10 %	Non-ionic	0,125 mM	Polyoxyethylene (10) tridecyl ether ja mixture of C11 to C14 iso-alkyl ethers with C13 iso-alkyl predominating
Tergitol NP40 x x	10 %	Non-ionic	0,14-0,29 mM	Nonyl phenoxy polyethoxyethanol
Brij O10 o	10 %	Non-ionic	0,22 mM	Vanha nimi Brij 97. C18-1E10, Polyoxyethylene (10) oleyl ether
Triton x 100	10 %	Non-ionic	0,2 -0,9 mM	
C7BzO	10 %	Zwitterionic	ND	

2 (2)

ASB-14	10 %	Zwitterionic	ND	Amidosulfobetaine-14
SB3-10	10 %	Zwitterionic	25-40 mM	Caprylyl sulfobetaine ja 3-(Decyldimethylammonio)propanesulfonate inner salt
DDM	10 %	Non-ionic	0,15 mM	n-Dodecyl- β -D-maltoside ja Lauryl- β -D-maltoside
CHAPS (x2)	10 %	Zwitterionic	4-6 mM	
Sodium Deoxycholate		Anionic	2 to 6 mM	
N-Lauroylsarcosine sodium salt solution		Anionic	14.57 mM	
OG	10 %	Non-ionic	20-25 mM	Octyl glucoside ja Octyl β -D-glucopyranoside (Liuos säilyy 3 pvää!)
OTG	10 %	Non-ionic	9 mM	Octyl β -D-1-thioglucopyranoside tai Octyl thioglucoside (Liuos säilyy 3 pvää!)
ND = not determined				

Esimerkkityöohje

Liitteessä esitellään työn suorituksen kulku esimerkkityöohjeen avulla. Ohjeessa on käytetty esimerkkinä Brij L23 detergenttiä. Työohjeeseen ei ole liitetty pipetointikaaviota eikä tulosten dokumentointiin liittyvää sivua.

Norovirus Quick Prep: NATtrol detergents 10

x.x.2016/AW

Aim of testing:

Aim is to test does quick prep extraction work with NATtrol Norovirus GII Stock with stool samples and with Brij L23 detergent and PEG solution. There will be tested different reagents and different concentrations for quick prep. It was made a solution of Brij L23 and Brij L23 with PEG. Also PBS and will be tested with Norovirus and with and without stool samples. Aim is also to test if heating affects to the samples. This run includes 1:100 and 1:1000 dilutions

NATtrol dilutions GII

1:10 12, 5 µl GII stock + 112, 5 µl PBS

1:100 125 µl 1:10 + 1125 µl PBS

1:1000 125 µl + 1125 µl PBS

100 µl needed per sample preparation

Quick prep protocol:

- 1) Take 1500 µl reagent into Far tube
- 2) Spike with 100 µl of diluted norovirus and add one stool swab (part of the samples).
- 3) Squeeze 5 drops into Eppendorf tube.
- 4) Heat if needed (95 °C 5 min) (part of the samples)

Reagents: Detergent preparation (low / high concentration), PEG preparation (high concentration)

Samples:

PCR reaction parallels are made from every reaction! Plate has 96 wells, 96/2 = 48 sample preps/plate minus controls.

Nro.	Norovirus	Reagent	heating	stool
1	1:100	PBS	+	+
2	1:100	PBS	-	+
3	1:1000	PBS	+	+
4	1:1000	PBS	-	+
5	1:100	60% PEG	+	+
6	1:100	60% PEG	-	+
7	1:1000	60% PEG	+	+
8	1:1000	60% PEG	-	+
9	1:100	2 % Brij L23	+	+
10	1:1000	2 % Brij L23	+	+
11	1:100	2 % Brij L23 + 60 % PEG	+	+
12	1:100	2 % Brij L23 + 60 % PEG	-	+
13	1:1000	2 % Brij L23 + 60 % PEG	+	+
14	1:1000	2 % Brij L23 + 60 % PEG	-	+
15	1:100	60% PEG	+	+
16	1:100	60% PEG	-	+
17	1:1000	60% PEG	+	+
18	1:1000	60% PEG	-	+
19	1:100	2 % Brij L23	+	+
20	1:1000	2 % Brij L23	+	+
21	1:100	2 % Brij L23 + 60 % PEG	+	+
22	1:100	2 % Brij L23 + 60 % PEG	-	+
23	1:1000	2 % Brij L23 + 60 % PEG	+	+
24	1:1000	2 % Brij L23 + 60 % PEG	-	+

Sample preparation materials:

PBS (Ca & Mg Free) Mat. no. 130818 Erä: 1691509 Pvm. 18.12.2015 Exp: 2016-12-12 Jaettu 21.1.2016	Sample NATtrol Norovirus GII Stock Ref NATNOVII.ST Lot 315119 Strain N/A Volume 1,0ml Exp 2016/10/01 av. 7.4.2016	PBS (Ca & Mg Free) Mat. no. 130818 Erä: 1691509 Pvm. 18.12.2015 Exp: 2016-12-12 av. 11.3.16 Jaettu 19.4.16
V189 SIBA buffer 23.9.2016 JF	Sigma water Lot RNBD8377 W4502 av. 2.3.16	Stool pool 1 (Fimlab) Rota & Rhino neg. 8.5.2015 KL Nro 32
W3 10% PVP 15.1.2016	Brij L23 W39 10% Brij L23	100% PEG Polyethylene glycol

Exp 14.1.2017	14.4.2016 JF Exp 10/16	202398-500G Lot # BCBK7824V 4.10.2013 Exp 10/18
Orion Genread C. difficile reagent -kit Lot 53600 Exp 2016/05 PBS Mat. no. 130818 Erä: 1691509 Pvm. 18.12.2015 Exp: 2016-12-12 Av. 11.3.16 Jaettu 19.4.16		Water SIGMA water molecular biology reagent Lot RNBD7452 W4502 av 5.10.2015

RT-PCR MIX One Step: (Final volume (µl) 25)

reagent	1 reaction µl	Fill↓
		µl
Rnase free water	11,25	56 630
Optima PLUS Master Mix	6,25	350
PPp&c	2,5	140
Add template RNA	5	
	25	1120,0

Equipment: 7500

Protocol:			
-			
Reverse Transcription	50 °C	30 min	
Initial PCR activation	95 °C	10 min	
Denaturation	95 °C	15 s	45x
Annealing	55 °C	30 s	
Elongation	68 °C	30 s	

PCR materials:

Positive control	Negative control	Water
DDGG-10-L100 04005L 2017-12	DDGG-10-L100 04005L 2017-12	Ref DDGG-10- L100 Lot 04005L Exp 2017-12

Nota Pro&Pri Norol/Noroll/Rota/RNA EIC Ref DDGG-10-L100 Lot 04005L Exp 2017-12	Optima Plus master mix Ref DDGG-10- L100 Lot 04005L Exp 2017-12
---	--

Templates:

Pipet 20 µl RT-PCR master mix + 5 µl sample/control

Results:

PBS samples with stool worked. Heated samples worked better than samples with no heating. PEG samples with stool and heating worked. There is also some amplification samples without heating. Samples including PEG, but no stool, are clearly seen that the heated samples worked better. Samples with Brij L23 without stool worked well. Samples with stool did not work at all. Samples with Brij L23 and PEG worked with and without heating but it could be said that the samples with heating worked better and more linearly.

Original results: [Link to original results](#)

Summary and amplification curves can find on excel page *results*.

RNA-eristyksen kulku

Liitteessä on esitelty RNA-eristyksen työn kulku.

QIAamp Viral RNA mini kit extractation: Norovirus (GI ja GII)

24.03.16/AW

Laboratory notebook: 101 page 3

Aim of testing:

Aim is to extract norovirus RNA.

Work was done according to the instructions.

Protocol:

- 1** Pipet 560 µl of prepared Buffer AVL into a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- 2** Add 140 µl plasma, serum, urine, cell-culture supernatant, or cell-free body fluid to the Buffer AVL in the microcentrifuge tube. Mix by pulse-vortexing for 15 s.
- 3** Incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min.
- 4** Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.
- 5** Add 560 µl of ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the tube to remove drops from inside the lid.
- 6** Carefully apply 630 µl of the solution from step 5 to the QIAamp Mini column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
- 7** Carefully open the QIAamp Mini column, and repeat step 6.
- 8** Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl of Buffer AW1. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.
- 9** Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl of Buffer AW2. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Continue directly with step 11, or to eliminate any chance of possible Buffer AW2 carryover, perform step 10, and then continue with step 11.
- 10** Recommended: Place the QIAamp Mini column in a new 2 ml collection tube (not provided), and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.
- 11** Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Discard the old collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column and add 60 µl of Buffer AVE equilibrated to room temperature. Close the cap, and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

Materials:

Buffer AVL

Viral lysis buffer
Lot 151051193
Mat nro. 1014777

Ethanol

Absoloiitu
ETAX Aus Alt Oyj
Lot 1516.1
Jaettu 4.2.16

Buffer AW1

Wash buffer 1
Lot 151050999
Mat nro 1014780

Buffer AW2

Wash buffer 2
Lot 151047383
Mat 1014592

QIAamp Viral RNA mini kit
EXP 2017-09-21

Buffer AVE

Elution buffer
Lot 151048798
Mat no. 101 0371

Samples

GII Stock

Ref NATNOVII.ST
Lot 315119
Strain: N/A
Exp 2016/10/1
Huom! Been in -70C

GII Stock

Ref NATNOVI-ST
Lot 315823
Strain N/A
Exp 2017/02/01