

Camilla Jokinen

# *Multiplex* qPCR -menetelmän verifiointi hevosen herpesviruksen tyypeille 1 ja 4

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

17.9.2018

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Camilla Jokinen <i>Multiplex</i> qPCR -menetelmän verifiointi hevosen herpesviruksen tyypeille 1 ja 4 31 sivua 17.9.2018
Tutkinto	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	Erikoistutkija Riikka Holopainen Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena ja tavoitteena oli käyttöönottaa perinteistä PCR -menetelmää nopeampi ja tehokkaampi kvantitatiivinen PCR- eli qPCR-menetelmä hevosen herpesvirustyyppille 1 ja 4 (<i>Equine Herpesvirus, EHV</i>) Eviran eläinvirologian tutkimusyksikössä. qPCR-menetelmä toteutettiin <i>multiplex</i>-reaktiona eli molemmat virustyyppit analysoitiin omien koettimien avulla samanaikaisesti. Materiaalina käytettiin EU-referenssilaboratoriosta (Anses) Ranskasta saatuja EHV-1- ja EHV-4-DNA-näytteitä, Duvaxyn-rokotesuspensiota, joka sisälsi molempia EHV-tyyppejä sekä EHV-1- ja EHV-4-viruskantoja (Kentucky VR700 ja Newmarket), joista tehtiin matriisilaimennossarjat <math>10^1 - 10^{-7}</math> hevosen elinsuspensioon, sierainliimaan sekä solujen elatusaineeseen. Menetelmän olosuhteiden optimointi suoritettiin <math>10^{-1}</math>-<math>10^{-7}</math> rokotesuspensiolaimennossarjalla. Toistettavuuden ja uusittavuuden määrittämiseksi testattiin matriisilaimennossarjat: elinsuspensio- ja elatusainelaimennossarjalla suoritettiin vähintään viisi sekä sierainlaimennossarjalla kaksi onnistunutta testauskertaa. Referenssilaboratorion DNA-näytteistä tehtiin laimennossarjat <math>10^{-1}</math>-<math>10^{-3}</math>, joiden avulla määritettiin muun muassa menetelmän tarkkuus.</p> <p>Tuloksien avulla määritettiin menetelmän objektiivinen tarkkuus, yhdenmukaisuus, spesifisyys, sensitiivisyys, toistettavuus, uusittavuus sekä PCR-tehokkuus. Tarkkuus ja yhdenmukaisuus saatiin referenssinäytteiden EHV-virustyyppikohtaisia tuloksia vertailemalla, sensitiivisyys ja spesifisyys määritettiin vertaamalla referenssinäytteiden tuloksia matriisilaimennossarjojen tuloksiin. Toistettavuus määritettiin yhden tekijän kolmen toiston tulosten variaatiokertoimista, kun taas uusittavuus määritettiin kolmen tekijän toistojen tulosten välisistä variaatiokertoimista. Kaikista muista verifioitavista parametreista, paitsi PCR-tehokkuudesta, saatiin hyvät tulokset. PCR-tehokkuus eri matriiseilla oli viitearvoja suurempi.</p> <p>Menetelmän verifiointi todettiin onnistuneeksi ja se tullaan liittämään Eviran FINAS-akreditoituihin qPCR-menetelmiin.</p>	
Avainsanat	qPCR, <i>multiplex</i> -reaktio, <i>monoplex</i> -reaktio, Ct-arvo, dsDNA virus, hevosen herpesvirus 1 ja 4

Author Title Number of Pages Date	Camilla Jokinen The Verification of <i>Multiplex</i> qPCR Method for Equine Herpesvirus Types 1 and 4 31 pages 17 September 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Program	Laboratory Sciences
Instructors	Riikka Holopainen, Senior Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The verification this study concerns was conducted in the Veterinary Virology Research Unit of Finnish Food Safety Authority (Evira) during spring 2018. The goal of the verification was to replace a traditional PCR method for Equine Herpesvirus (EHV) 1 and 4 diagnostics with a more efficient quantitative PCR or qPCR. The qPCR analysis was conducted as a <i>multiplex</i>-reaction, in which both viruses were analyzed at the same time with virus-specific probes.</p> <p>The study material included EHV-1 and -4 reference DNA-samples from the EU reference laboratory Anses, France, Duvaxyn-vaccine that contained both EHV types, and EHV-1 and -4 virus strains (Kentucky VR700 and Newmarket), from which dilution series to different sample matrices, such as equine organsuspension, cell culture medium and nostril mucus, were made. The optimization of qPCR conditions was conducted using a vaccine dilution series from dilution <math>10^{-1}</math> to <math>10^{-7}</math>. After the optimization of the <i>multiplex</i>-reaction, at least five successful tests of <math>10^{-1}</math> to <math>10^{-7}</math> dilution series from organsuspension and culture medium were done. From nostril mucus, only two dilution series were tested. With matrix dilutions, the repeatability and reproducibility were defined. The dilution series <math>10^{-1}</math> to <math>10^{-3}</math> of the reference DNA-samples were tested to define the accuracy of the <i>multiplex</i>-reaction.</p> <p>Using the results, different parameters of the <i>multiplex</i> qPCR method were analysed. The accuracy and conformity were analysed from the results of reference material of both virus types, specificity and sensitivity were analysed by comparing the results of reference material to the results of matrix dilutions. The repeatability was analysed by calculating the coefficient of variation from three repeats performed by the same person and the coefficient of variation for the reproducibility was calculated from the repeats performed by three different persons. Results for the parameters obtained in the verification were as expected. Only the PCR-efficiency calculated from matrix dilutions was greater than generally recommended for optimal qPCR reaction.</p> <p>All in all, the verification was successful, and the method will be included to the FINAS-accredited qPCR methods of Evira.</p>	
Keywords	qPCR, <i>multiplex</i> -reaction, <i>monoplex</i> -reaction, dsDNA virus, Ct-value, Equine Herpesvirus 1 and 4

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Hevosien herpesvirus ( <i>Equine Herpes Virus</i> , EHV)	2
2.2	Herpesvirusdiagnostiikkaa qPCR-menetelmällä	4
2.2.1	qPCR-menetelmän tulosten analyysi	6
2.2.2	<i>Multiplex-</i> ja <i>monoplex-</i> PCR	7
2.3	qPCR-menetelmän verifiointi	8
3	Toteutus	11
3.1	Käytetyt näytteet ja laimennossarjojen teko	11
3.1.1	DUVAXYN-rokotesuspension laimentaminen	12
3.1.2	Viruskantojen laimennossarjat eri näytematriiseissa	12
3.1.3	Ranskan referenssinäytteiden laimentaminen	13
3.2	DNA-eristys	14
3.3	qPCR-monistukset	15
4	Tulokset	17
4.1	Menetelmän optimoinnin tulokset	17
4.2	Menetelmän tarkkuus ja yhdenmukaisuus	19
4.3	Menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys	20
4.4	Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus	23
4.5	Menetelmän PCR-tehokkuus	26
5	Pohdinta ja lopputulos	28
	Lähteet	30
	Liite 1: Fluoresenssikuvaaja	

## Lyhenteet

Ct-arvo	<i>Cycle Threshold</i> , sykli-raja-arvo
dNTP	Deoksinukleotidit
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i> , kaksijuosteinen DNA
EHV	<i>Equid Herpesvirus</i> , hevosen herpesvirus
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , naudan sikiön seerumi
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , solujen elatusaine
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acid</i> , glutamiiniton, ei-välttämättömiä aminohappoja sisältävä lisäaine solujen elatusaineissa
NFQ	<i>Non-Fluorescent Quencher</i> , ei-fluoresoiva sammuttaja
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , kvalitatiivinen polymeraasiketjureaktio
PS	Penisilliini-streptomysiini antibioottisekoitus

## 1 Johdanto

Hevosien herpesvirukset ovat hevoseläimiin tarttuvia ja niissä lisääntyviä herpesviruksia. Erilaisia virustyyppijä on tavattu ainakin viisi [1], joista tyypit 1 ja 4 ovat yleisempiä. Etenkin virustyyppi 4 on erittäin yleinen ja sen vasta-aineita tavataan lähes aina muun muassa Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä tutkituissa näytteissä. EHV-1 ja EHV-4 aiheuttavat pitkälti hengitystieinfektioita, mutta EHV-1 voi pahimmillaan aiheuttaa muun muassa virusabortteja ja hermosto-oireista tautia, joka voi olla hevoselle kohtalokas. Yleisimmin herpesviruksien aiheuttamaa hengitystiesairautta tavataan nuorilla, alle 3-vuotiailla hevosilla. Virukset tarttuvat pisaratartuntana herkästi hevosesta toiseen tai välillisesti ihmisten vaatteiden tai käsien kautta. Tartunnat itävät nopeasti, ja taudin tauti on myös nopeasti tartuttava. Oireileva yksilö tulee eristää mahdollisimman nopeasti muista hevosista taudinleviämisen ehkäisemiseksi. [2.]

Herpesviruksille tyypillisesti myös EHV-1 ja EHV-4 voivat jäädä piileviksi isännän elimistöön. Virus voi aktivoitua uudestaan esimerkiksi stressin takia, jolloin tauti on jälleen tartuttava ja hevonen voi saada oireita. Uudestaan aktivoituessaan herpesviruksen aiheuttamat oireet ovat yleensä kuitenkin lievempiä tai saattavat puuttua kokonaan, mikä vaikeuttaa diagnosoimista sekä taudinleviämisen ehkäisyä. [2.]

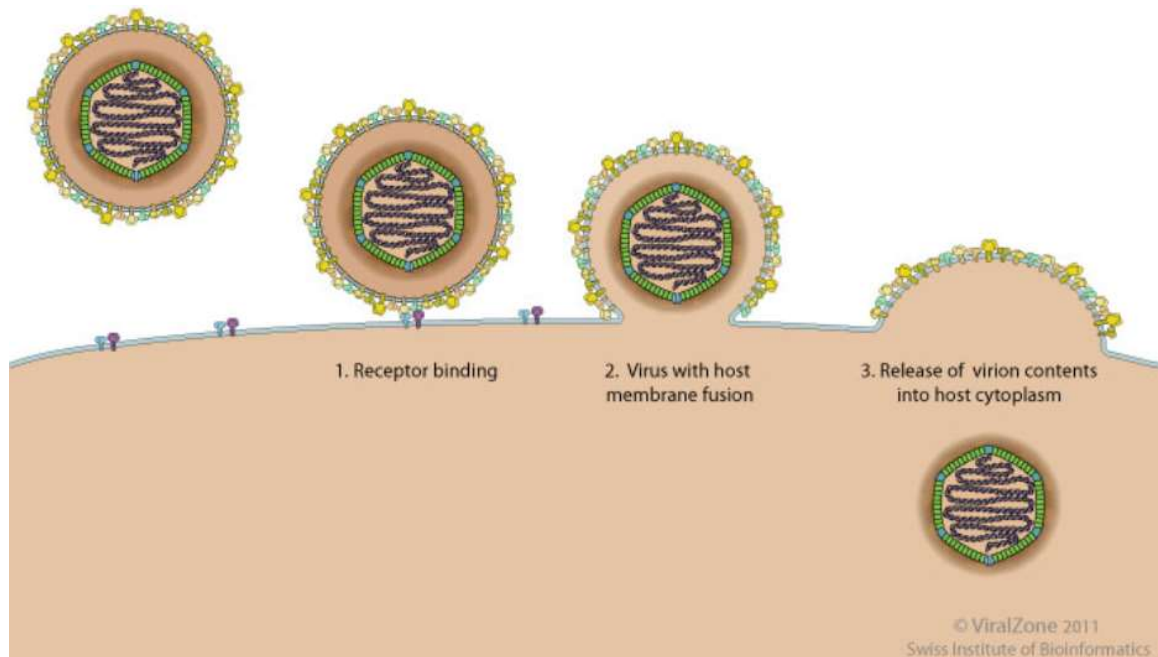
Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida Australiassa validoitu EHV-1 ja EHV-4 qPCR-menetelmä [1] Elintarviketurvallisuusvirastossa. Menetelmän verifiointi helpottaa ja nopeuttaa kyseisten virustyyppien diagnosoimista Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä luotettavasti Suomeen tuotavien ja Suomesta vietävien hevosten kohdalla. Nopeuttamalla diagnosoimista, hevosen herpesvirusten 1 ja 4 leviämistä voidaan kontrolloida paremmin niin Suomessa kuin myös Suomen ulkopuolella. Taudin nopea ja herkkä leviäminen on globaali ongelma muun muassa kansainvälisten kilpailujen ja hevosnäyttelyiden takia. Helpottamalla diagnostiikkaa mahdollistetaan myös rutiinomaiset EHV-seulonnat, joiden avulla voidaan ehkäistä taudin leviämisen kyseisissä tapah- tumissa ja taudin vähentää tartuntoja.

## 2 Teoria

### 2.1 Hevosen herpesvirus (*Equine Herpes Virus*, EHV)

Hevosen herpesviruksia on useita erilaista, joista yleisimmät tyypit 1 ja 4 aiheuttavat useita hevosille jopa hengenvaarallisia oireita. Yleisempi EHV-4-infektio aiheuttaa erilaisia hengitystietauteja (rinopneumoniittia) sekä hengitystieoireita nuorilla hevosilla, kuten sierainvuotoa ja kuumetta. EHV-1 on toisaalta usein syynä hevosten virusabortteihin, tiineen tamman luomiseen tai varsojen syntymiseen kuolleena tai erittäin heikkoina. EHV-1 voi aiheuttaa myös harvinaisia, mutta vakavia hermosto-oireita. EHV-1-tyypin aiheuttamat hermosto-oireet vaihtelevat hevosen heikentyneestä koordinaatiokyvystä täydelliseen halvaantumiseen ja vaikeammat oireet ovat harvoin parannettavissa. Kumpaa-kin tutkittua virustyyppiä todetaan vuosittain ympäri maailmaa. [2.]

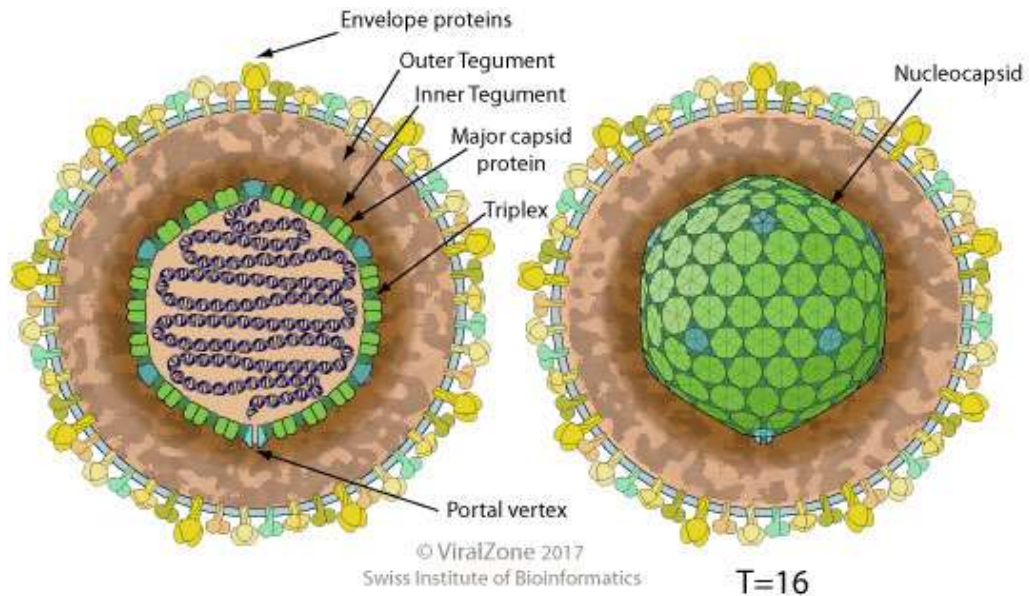
Hevosen herpesvirukset 1 ja 4 kuuluvat herpesviruksien *Varicellovirus*-sukuun (alalahko: *Alphaherpesvirinae*). *Varicellovirus*-sukuun kuuluvilla kaksijuosteisilla DNA -viruksilla (*dsDNA-virus*) on glykoproteiinikomplekseja sisältävä vaippa, joka on halkaisijaltaan 150–200 nm. Vaipan glykoproteiinikompleksien avulla virukset tarttuvat isäntäsolun solukalvon reseptoreihin, fuusioituen solukalvon lipideihin ja tunkeutuen sitä kautta isäntäsolun sisään (ks. Kuva 1). [3.]



Kuva 1. Useat virustyytit pystyvät fuusioitumaan isäntäsoluun pintaproteiiniensa avulla. Kyseistä fuusiotekniikkaa käyttävät myös herpesvirukset, joihin EHV-1 ja EHV-4 kuuluvat [4].

Vaipan sisällä on 162 kapsomeeria sisältävä ydinkapsidi, jota ympäröi amorfinen tegumentti-matriksi. Vaipan ja ydinkapsidin suojassa on viruksen kaksijuosteinen, lineaarinen DNA, jonka pituus EHV-1-viruksella on noin 150 000 emäsparia ja EHV-4-viruksella 145 000 emäsparia [5]. *Varicellovirus*-suvun viruksen rakenne on kuvattuna kuvassa 2. [3.]





Kuva 2. *Varicellovirus*-suvun herpesviruksen rakenne [6].

Geneettisesti EHV-1 ja -4 ovat lähes identtisiä. Kummallakin on 76 uniikkia ja lähes samanlaista geeniä, joiden identtisyys on yli 80 % [5]. Aminohappotasolla virusten homologisuus on noin 90 % [1]. Virusten samankaltaisuus viittaa samantyyppiseen funktionaaliseen toimintaan, mutta siitä huolimatta virusten taudinkuvat ovat hyvin erilaiset. Virusten geneettinen identtisyys on myös rajaava tekijä virusten diagnostiikassa ja erotte- lussa. Esimerkiksi serologiset testit tai perinteinen PCR ovat harvoin riittäviä erottele- maan virukset toisistaan. Viruksien glykoproteiini B -geeni on tosin todettu olevan erilai- nen viruksien kesken. Kyseisen geenin avulla ollaan kehitetty muun muassa gB-spesifi- nen kvantitatiivinen PCR -menetelmä virusten erottelemiseksi [1].

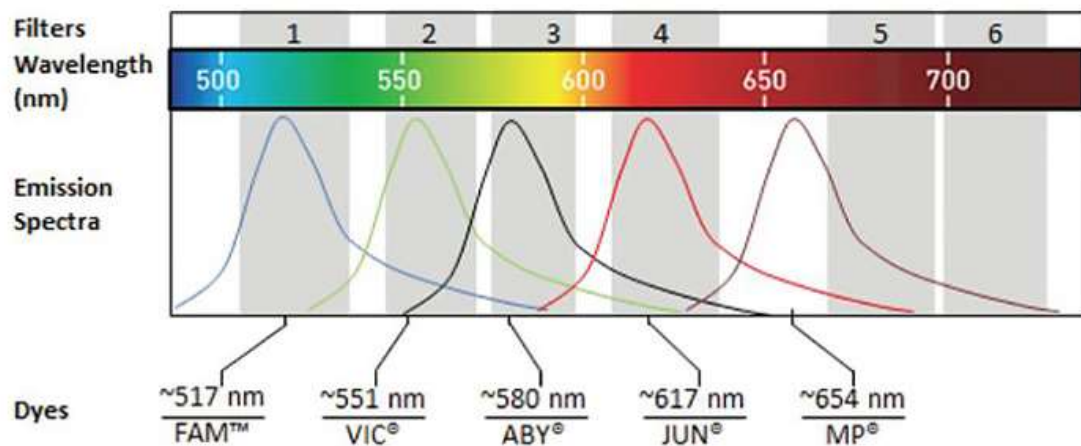
## 2.2 Herpesvirusdiagnoosiikkaa qPCR-menetelmällä

Kvantitatiivinen PCR eli qPCR (*Quantitative polymerase chain reaction*) on polymeeraa- siketjureaktiomenetelmä, joka perustuu DNA:n kahdentumiskykyyn. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä käytetään alukkeita, DNA-polymeeraasientsyymejä, deoksinukleoti- deja ja templaatti-DNA:ta sekä koettimia, joiden avulla mittaus tapahtuu. Kyseisen qPCR-menetelmän suosio on kasvanut viime vuosina sen kvantitatiivisten ominaisuuksien sekä nopeuden takia.

Kahdentumisreaktio tapahtuu qPCR-menetelmässä samalla tavalla kuin perinteisessä PCR -menetelmässä. Lämpötilaa säätelemällä DNA:n kaksoisjuosteet saadaan erilleen

(denaturaatio), alukkeet saadaan kiinnittymään DNA:n erillisiin juosteisiin (hybridisaatio) sekä monistumaan deoksinukleotidien ja DNA-polymeraasientsyymin avulla. Kuumiin lämpötila on yleensä denaturaatiovaiheessa, jonka jälkeen lämpötilaa lasketaan reilusti. Monistumista varten lämpötilaa nostetaan jälleen. Sykliä toistetaan tarvittavan ajan ja mittaus tapahtuu reaaliaikaisesti.

Kyseisessä menetelmässä käytettävien koettimien tarkoitus on tarttua monistuvaan DNA:han emittoiden mitattavaa valoa. Koettimissa on leimat, jotka aiheuttavat fluoresenssin synnyn ja tätä fluoresenssia mitataan leimojen spesifisillä emissioaallonpituusalueilla (ks. Kuva 3).



Kuva 3. Jokaisella leimalla on tietty emissioaallonpituus, johon mittaus kohdistuu. Eri leimojen erilaiset aallonpituudet ovat mahdollistaneet useiden leimojen samanaikaisen käytön useissa kohteissa eli niin kutsutun *multiplex* qPCR -tekniikan. [7].

Eri mekanismeilla toimivia koettimia on useita. Koettimia ovat erilaiset hydrolyysikoettimet, *Molecular Beacon* -koettimet, kaksoishybridisaatiokoettimet, pimennyskoettimet sekä alukkeisiin perustuvat koettimet, kuten *Amplifluor Assays* -koettimet, skorpionin PCR, LUX PCR- ja QZyme PCR -alukkeet. [10.] Näistä yleisimpiä koettimia ovat hydrolyysikoettimet. Hydrolyysikoettimet ovat spesifejä, sillä niiden sekvenssit ovat komplementaarisia monistettavaan DNA:han. Hydrolyysikoettimissa voidaan käyttää useita eri leimoja, kuten reportteri-leimoja sekä sammuttaja-leimoja, samanaikaisesti. EHV-virus-typpejä 1 ja 4 on tutkittu käyttämällä kahta leimaa: reportteri-leimana EHV-1-virukselle on käytetty leimaa 6FAM ja EHV-4-virukselle leimaa VIC [1]. Reportteri-leimojen lisäksi koettimissa on käytetty sammuttaja-leimaa NFQ eli ei-fluoresoivaa sammuttajaa (*Non-Fluorescent Quencher*) [9], joka estää reportteri-leiman fluoresenssin ennen kuin koetin on tarttunut monistettuun DNA:han. Kun koetin tarttuu komplementaariseen DNA:han ja

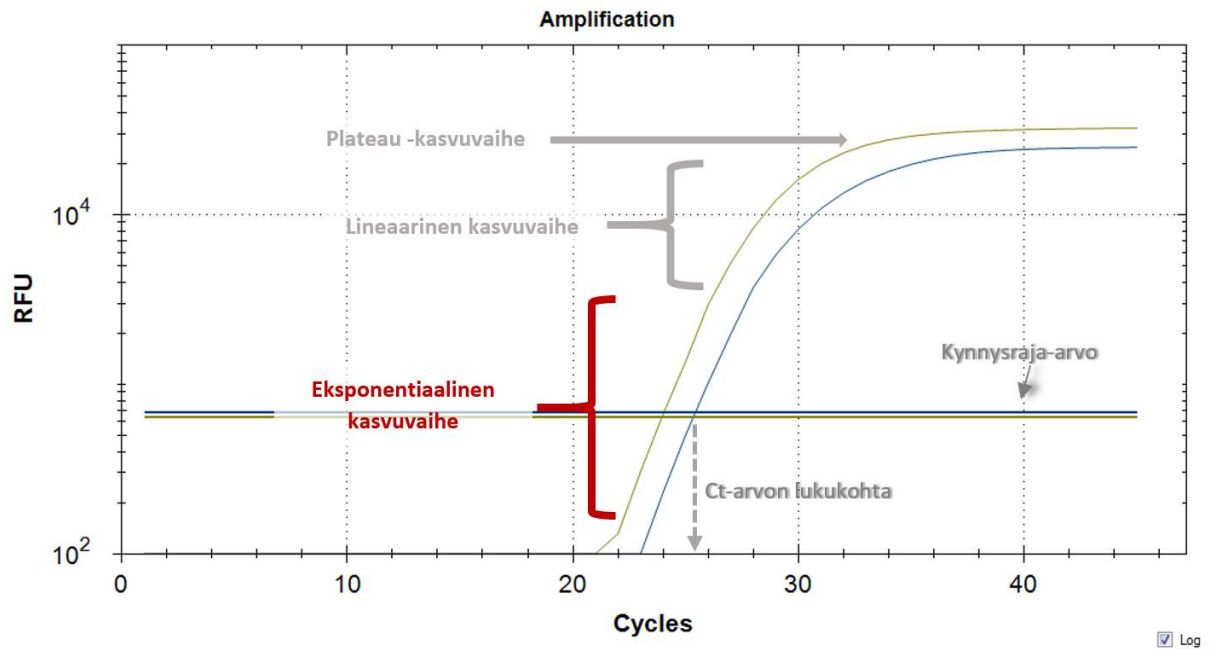
polymeraasientsyymi alkaa monistaa DNA-templaattia, reportteri-leima ja sammuttaja irtoavat templaattista sekä toisistaan, jolloin reportteri-leiman fluoresenssia ei estä enää mikään ja se on mitattavissa. [10.] Lisäksi koettiin voidaan lisätä MGB (*Minor Groove Binder*) eli lyhyisiin koettiin liitettävä lisäosa, joka mahdollistaa lyhyempien ja spesifisten koettimien suunnittelun [8].

Koettimen sijaan voidaan myös käyttää kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia värejä. Yleisin kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuva väri on SYBR Green I. Sitoutuessaan SYBR Green I:n fluoresenssi kasvaa noin tuhatkertaiseksi, jolloin se on mitattavissa helposti. DNA:n hajotessa takaisin yksijuosteiseksi myös värimolekyylit vapautuvat ja fluoresenssi laskee. Kaksijuosteiseen DNA:han käytettävät värit voivat olla joko ei-saturoituvia tai saturoituvia. Saturoituvat värit inhiboivat qPCR-reaktiota, kun konsentraatio on suuri. Ei-saturoituvat värit taas eivät inhiboi reaktiota ja niitä voidaan käyttää tehokkaasti korkeissa pitoisuuksissa. Kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvissa väreissä on monia hyviä puolia: ne helpottavat alukkeiden suunnittelua ja useiden geenien samanaikaista analyysiä ilman useita koettimia, ne ovat koettimia halvempia sekä niiden avulla voidaan määrittää monistusreaktion spesifisyys *Melt Curve* -analyysillä. Kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvien värien suurin ongelma on kuitenkin niiden epäspesifisyys. [10.] Värit sitoutuvat kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin muodostuneet primer-dimerit eli toisiinsa sitoutuneet alukkeet [14] sekä kontaminaatiot lisäävät kokonaisfluoresenssia ja vähentävät näin menetelmän kvantitatiivisuutta [10]. *Multiplex* qPCR -reaktiossa erotuskyky on tärkeä, joten siinä suositaan erillisiä koettimia, joiden leimojen emissiofluoresenssit ovat erotettavissa toisistaan.

### 2.2.1 qPCR-menetelmän tulosten analyysi

Reaaliaikaisessa PCR -menetelmässä tulokset on nähtävissä reaktion aikana muodostuvassa kuvaajassa eksponentiaalisesti kasvavina käyrinä. Tuloksien analyysissä keskitytään kynnyksärajoon (*Threshold-value*) sekä Ct-arvoon (*Threshold Cycle Number*).

Tulokset luetaan Ct-arvoina, jotka saadaan, kun kynnyksärajo asetetaan eksponentiaalisen vaiheen puoliväliin, jossa näytteen fluoresenssi ylittää taustafluoresenssin. Ct-arvo on se sykli, joka on kynnyksärajoarvon sekä fluoresenssin kasvukäyrän leikkauskohdassa, kuten kuvassa 7 näkyy. Kohde-DNA:n monistumista eli PCR-reaktion positiivisuutta kuvaa eksponentiaalinen fluoresenssikuvaaja. Tulosten tulkinta on helpoin tehdä logaritmisesta fluoresenssikuvaajasta.



Kuva 4. Reaaliaikaisen qPCR -kuvaajan tulkinta logaritmisessa asteikossa. Tulosten tulkinta tehdään eksponentiaalisen kasvuvaiheen ja kynnysraja-arvon avulla. Kuvaajassa nähdään kahden eri monistettavan kohteen fluoresenssikuvaajat eri leimoilla (FAM/VIC). RFU (*Relative Fluorescence Units*) kuvaa fluoresenssin voimakkuutta.

Reaaliaikaisen qPCR -menetelmän tulokset ovat jaettavissa kolmeen vaiheeseen: eksponentiaaliseen, lineaariseen sekä Plateau -vaiheeseen [12]. Tulosten analyysissä keskitytään pääasiassa eksponentiaaliseen kasvuvaiheeseen, jolloin DNA:n monistuminen on tehokkainta eli fluoresenssi kasvaa syklistä toiseen (ks. Kuva 4).

Reaaliaikaisessa qPCR-reaktiossa ongelmia tuottavat kontaminaatiot, primer-dimerit sekä erilaiset inhibiittorit. Inhibiittoreilla tarkoitetaan erilaisia tekijöitä, jotka voivat estää esimerkiksi DNA:n monistumista tai polymeraasientsyymin toimintaa. Kontaminaatioita tulee välttää aseptisellä työskentelyllä ja niitä tulee monitoroida negatiivisten kontrollien avulla. Primer-dimereita on helpointa ehkäistä hyvällä aluesuunnittelulla.

## 2.2.2 Multiplex- ja monoplex-PCR

Reaaliaikaisessa *multiplex* qPCR -menetelmässä monistetaan useita kohteita samaan aikaan. Perinteisessä *monoplex*-reaktiossa monistetaan vain yksi kohde kerrallaan. *Multiplex*-reaktiossa riittää yksi Master Mix, johon pipetoidaan jokaisen tekijän spesifiset alukkeet ja koettimet. Ajoittain, esimerkiksi hyvin samanlaisten viruksien kohdalla, on

parempi käyttää useaa *monoplex*-reaktiota, jotta tulokset saadaan mahdollisimman selkeästi erilleen ja väärin tulkintojen riski pienentyy. *Multiplex*-reaktiota suositaan kuitenkin nykyään *monoplex*-reaktion sijaan useiden helpottavien tekijöiden takia:

- Lähtömateriaalin ei tarvitse riittää useisiin reaktioihin.
- Virheelliset negatiiviset tulokset vähenevät, kun jokaisesta näytteestä monistetaan kontrollialue.
- Useiden eri kohteiden monistaminen yhdellä kertaa samasta näytteestä lisää tehokkuutta.
- Useiden eri kohteiden samanaikainen monistaminen vähentää kuluja.
- Näytteenkäsittelyä on vähemmän, mikä vähentää kontaminaatoriskiä. [11, s. 9.]

*Multiplex*-reaktiossa olosuhteiden suunnittelu on kuitenkin haastavaa, sillä jokainen monistettavan tekijän täytyy monistua riittäväällä PCR-tehokkuudella. Ongelmaksi voi syntyä myös primer-dimerit, mikäli eri alukkeet ovat komplementaarisia keskenään. Lisäksi on käytettävä spesifisiä koettimia, jotka ovat komplementaarisia vain halutuille DNA-alueille. Reaktion suunnittelu on sitä haastavampaa, mitä useampia kohteita monistetaan samassa reaktiossa.

### 2.3 qPCR-menetelmän verifiointi

Verifiointi on analyttisen menetelmän laadunvarmistuksen keino. Verifiointi on objektiivinen analyysi jonkin menetelmän toimivuudesta esimerkiksi uudessa laboratorioissa tai kun jokin menetelmä käyttöön otetaan. Verifiointia laajempi validointi keskittyy pitkälti täysin uuden menetelmän kehitykseen ja tulosten luotettavuuden määrittämiseen. Verifiointissa verifioitava menetelmä on usein validoitu aikaisemmin toisessa laboratorioissa riittäväällä luotettavuudella.

Menetelmien laadunvarmistuksella tarkoitetaan erilaisten diagnostisten menetelmien ja analyysien toimivuuden, luotettavuuden sekä käyttötarkoitukseen sopivuuden kontrollointia ja tarkastusta testeihin ja tilastollisiin menetelmiin. Kaikki viralliset standardit ja menetelmät käyvät läpi laadunvarmistuksen prosessin: menetelmää kehitettäessä ja virallistettaessa se validoidaan ja - mikäli kyseinen menetelmä otetaan käyttöön jossakin toisessa virallisessa laboratoriossa - se verifioidaan ja lisäksi menetelmien laatua tarkkailaan esimerkiksi laboratorioden välisillä vertailukokeilla. Laadunvarmistuksen avulla varmistetaan, että tulokset ovat luotettavia näytteestä riippumatta testauskerrasta toiseen.

Kvantitatiivisen PCR-menetelmän verifioitiin ei ole suoranaista ohjetta, vaan se tapahtuu yleensä yleisten validointiohjeiden soveltamisen avulla. Ohjeiden avulla pystytään valitsemaan verifioitavat parametrit ja kirjallisuuden avulla pystytään punnitsemaan niiden tarpeellisuus. [16.] qPCR-menetelmää verifioitaessa riittää muun muassa menetelmän tarkkuuden, yhdenmukaisuuden, toistettavuuden, uusittavuuden, spesifisyyden ja sensitiivisyyden määrittäminen, toisin kuin validoitaessa. Myös PCR-tehokkuutta on tarkasteltava.

Tarkkuutta ja yhdenmukaisuutta tarkastellaan usein yhdessä. Verifioitavan menetelmän tarkkuus määritetään jo identifioidulla referenssimateriaalilla. Jos tunnetun referenssi-DNA-näytteen tulos antaa saman identifiointituloksen verifioitavalla menetelmällä, kuin mitä tiedetään, voidaan todeta tarkkuuden olevan riittävää. Samalla toteutuu yhdenmukaisuus, mikäli verifioitavalla menetelmällä saatu tulos vastaa referenssilaboratorion saamaa tulosta.

Toistettavuuden analysoinnilla määritetään verifioitavan menetelmän tarkkuutta ja eroavaisuutta rinnakkaisten mittaustulosten välillä. Muuttuvia tekijöitä tulee olla tällöin vain yksi, esimerkiksi yksi pipetoija, mutta näytteiden tulee pysyä mahdollisimman samanlaisina. Jos muuttuvia tekijöitä on useita, esimerkiksi useita pipetoijia, puhutaan menetelmän uusittavuudesta. Sen avulla määritetään, miten paljon erilaiset ympäristöt ja tekijät vaikuttavat tulosten heittelyyn. Toistettavuutta ja uusittavuutta voidaan yksinkertaisimmillaan määrittää verifiointissa variaatiokerroimen avulla, jonka laskeminen on esitetty kaavassa 1:

$$CV = (\text{keskihajonta} / \text{keskiarvo}) * 100 \quad (1)$$

Variaatiokerroin antaa prosentuaalisen eroavaisuuden laskettujen tulosten välillä.

Spesifisyys ja sensitiivisyys kertovat myös menetelmän tarkkuudesta. Spesifisyyden voi määrittää objektiivisesti tunnettujen negatiivisten näytteiden avulla. Se määritetään tarkastelemalla verifioitavan menetelmän negatiivisten näytteiden tuloksia; onko jo negatiiviksi todetut näytteet negatiivisia myös verifioitavalla menetelmällä. Sensitiivisyyttä voi tarkastella objektiivisesti samalla lailla, mutta positiivisten näytteiden avulla. Sensitiivisyys kuvaa menetelmän herkkyyttä tunnistaa vain määritetty tai määritetyt kohteet ja sen kykyä erottaa kohteet toisistaan.

Kvantitatiivisen PCR-menetelmän PCR-tehokkuudella määritetään kehitetyn reaktion täydellisyyttä eli sitä, että reaktiossa oleva koko DNA määrä kahdentuu eksponentiaalisen vaiheen jokaisessa sykliissä. PCR-tehokkuus lasketaan tekemällä tuloksista standardisuorat sekä käyttämällä niiden kulmakerrointa, kuten yhtälössä 2 näkyy.

$$\text{Teoreettinen tehokkuus} = 10^{-1/\text{kulmakerroin}} \quad (2)$$

Yllä olevan kaavan avulla saadaan teoreettinen PCR-tehokkuuden kerroin. Prosentuaalinen tehokkuus saadaan seuraavasti:

$$\text{Teoreettinen tehokkuus (\%)} = (\text{Tehokkuuden kerroin} / 2) * 100\% \quad (3)$$

Standardisuurien mukaan määritetty PCR-tehokkuus ei ole absoluuttinen vaan suuntaantava ja sitä voidaan hyödyntää muun muassa menetelmien suorituskyvyn arvioinnissa [12].

PCR-tehokkuus on 100 % eli kaikki monistuva materiaali monistuu, mikäli tehokkuuden kerroin on 2 tai standardikuvaajan kulmakerroin on -3,32. Tätä pienemmät kulmakertoimet kuvaavat yli 100 %:n tehokkuutta ja suuremmat kulmakertoimet kuvaavat alle 100 %:n tehokkuutta. [12.] Tehokkuuden katsotaan olevan hyvällä tasolla, kun se on välillä 90-110 % [13].

### 3 Toteutus

#### 3.1 Käytetyt näytteet ja laimennossarjojen teko

Näytteinä käytettiin veteen laimennettua DUVAXYN-rokotetta (Fort Dodge, tuote: 10063048), kasvatettuja EHV-1- ja 4-kantoja eri näytematriiseissa sekä Ranskan referenssilaboratoriosta (Anses) saatuja EHV DNA- näytteitä. DUVAXYN-rokotteesta ja viruskannoista tehtiin  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$  laimennossarjat ja referenssinäytteistä  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  laimennossarjat  $-80$  °C:n pakastusta kestäviin 2 ml:n kryoputkiin. Kaikki työ toteutettiin hyvää aseptiikkaa noudattaen laminaarikaapissa.

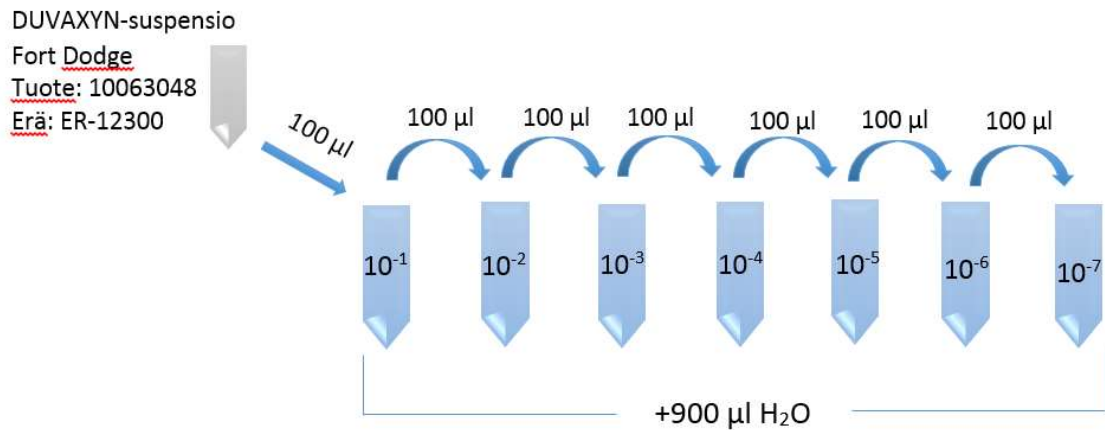
EHV-1 – viruskantaa Kentucky VR700 (kasvatettu vihermarakatin munuaissoluista, 1981, 2. pasaasi jaettu lokakuussa 2017) ja EHV-4 – viruskantaa NEWMARKET (kasvatettu orin primäärikivessoluissa, 1986, 2. pasaasi jaettu joulukuussa 2013) käytettiin kolmen eri matriisin laimennossarjoissa: sierainlimassa, elinsuspensiossa ja MEM-elatusaineessa. Sierainlimat oli kerätty kuuden hevosen sieraimista käyttämällä näytteenkeruupuikkoja. Ennen laimennossarjan tekoa, lima luotettiin veteen 2 ml:n kryoputkissa laminaarikaapissa pitämällä näytteenottopuikkojen pumpulipää yhdessä millilitrassa steriiliä vettä. Puikkoja liuotettiin noin puoli tuntia sekoitellen muutaman kerran. Näyteputkitteline pidettiin jäällä koko liuotuksen ajan näytteen säilymisen varmistamiseksi. Liuotuksen jälkeen, jokaisesta näytteestä otettiin 150 µl: n erä DNA-eristykseen ja näytteiden varmistustestejä varten. Sierainlimanäytteet varmistettiin EHV-negatiiviseksi qPCR-reaktiolla, minkä jälkeen sierainlimanäytteet yhdistettiin yhdeksi pooliksi matriisilaimennossarjoja varten.

Matriisitestauksessa käytetty elinsuspensio kerättiin Eviraan tutkittavaksi tulleista ja virus-negatiiviseksi todetuista hevosten elinsuspensionäytteistä. Näytteitä oli yhdeksän kappaletta ja jokaisesta näytteestä otettiin 2 ml suspensiota 50 ml: n steriiliin putkeen. Kaiken kaikkiaan elinsuspensiota oli siis 18 ml ja tästä poolista otettiin kaksi 140 µl: n erää DNA-eristykseen EHV-poolin negatiivisuuden varmistamiseksi qPCR-reaktiolla.



### 3.1.1 DUVAXYN-rokotesuspension laimentaminen

EHV-qPCR-olosuhteiden optimointi *monoplex*- ja *multiplex*-ajoissa tehtiin DUVAXYN-rokotteen avulla. Optimointia varten rokotteesta tehtiin  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$  laimennossarja, joka näkyy kuvassa 5:



Kuva 5. Rokotesuspensiosta valmistettiin 1:10 laimennossarja veteen.

Sarjan teossa käytettiin PCR-laatuista vettä (Sigma-Aldrich, W4502-1L, Lot# RNBF8981). Laimennossarjan teon jälkeen jokaisesta laimennoksesta otettiin talteen erilliseen eppendorf-putkeen 150 µl DNA-eristystä varten. Sarja ja sarjan erät säilytettiin -80 °C:ssa.

### 3.1.2 Viruskantojen laimennossarjat eri näytematriiseissa

Viruskantojen laimennossarjat eri näytematriiseihin tehtiin laittamalla jokaisen matriisi-laimennossarjan ensimmäiseen laimennokseen kumpaakin viruskantaa suhteessa 1:10 ja jatkaen siitä samalla lailla kuin rokotteen laimennossarjassa. Elatusaine- ja elinsuspensiosarjoissa laimennoksien tilavuus oli 1 ml, kun taas sierainlimalaimennossarjassa laimennokset olivat 300 µl.

Elinsuspensio- ja elatusainelaimennossarjoissa ensimmäiseen laimennokseen laitettiin 100 µl kumpaakin viruskantaa sekä 800 µl matriisia. Lopuissa laimennoksissa oli aina 100 µl edellistä laimennosta ja 900 µl matriisia. Sierainlimalaimennossarja tehtiin pienemmällä tilavuudella kuin muut laimennossarjat, koska matriisia oli rajoitetusti. Ensimmä-

mäiseen laimennokseen laitettiin 30 µl kumpaakin viruskanta ja 240 µl sierainlimasuspensiota. Seuraavissa laimennoksissa oli aina 30 µl edellistä laimennosta ja 270 µl sierainlimasuspensiota.

Laimennossarjat tehtiin viruskanta kerrallaan. Ensin pipetoitiin EHV-1-viruskanta jokaisen matriisin sarjan ensimmäiseen putkeen, jonka jälkeen laminaarikaappi pestiin huolellisesti ja UV-valotettiin. Tällä tavoin pyrittiin ehkäisemään kontaminaatiot ja varmistamaan virusten suhteiden tasalaatuisuus laimennossarjoissa. UV-valotuksen aikana putket pidettiin jääkaapissa jäiden päällä. UV-valotuksen jälkeen ensimmäisiin putkiin pipetoitiin EHV-4-viruskanta ja sarjat pipetoitiin samalla loppuun.

EHV-1- ja EHV-4-viruskannoista tehtiin myös omat laimennossarjat elinsuspensioon, jotta saatiin määritettyä, miten *multiplex* qPCR -reaktio toimii vain toisen viruksen läsnä ollessa. Myös nämä laimennossarjat olivat  $10^{-7}$  laimennokseen asti, tilavuutena 300 µl/laimennos. Sarja tehtiin pipetoimalla ensin EHV-1- ja EHV-4-sarjojen kaikkiin putkiin 270 µl elinsuspensiota. Ensimmäiseen putkeen pipetoitiin elinsuspension lisäksi 30 µl yhtä virusta ja sekoituksen jälkeen ensimmäisestä putkesta siirrettiin 30 µl seuraavaan putkeen. Laimennossarjat tehtiin erillään ja niiden tekemisen välissä laminaarikaappia UV-valotettiin noin 15 min.

### 3.1.3 Ranskan referenssinäytteiden laimentaminen

Näytematriisi- ja rokotelaimennossarjojen lisäksi laimennettiin myös referenssinäytteet. Referensseinä olivat EU-referenssilaboratoriosta (Anses) Ranskasta saadut EHV-1- ja -4-viruksien DNA:t, jotka laimennettiin samaan PCR-laatuiseen veteen kuin rokotesuspensiokin. Laimennossarjat olivat laimennoksesta  $10^{-1}$  laimennokseen  $10^{-3}$ , tilavuutena 300 µl/laimennos. Referenssinäytteiden laimennossarjat pipetoitiin samalla lailla kuin erilliset elinsuspensiolaimennossarjat: ensin kummankin sarjan kaikkiin putkiin pipetoitiin 270 µl vettä, jonka jälkeen pipetoitiin viruksien DNA:t jälleen kahdessa erässä. Ensin pipetoitiin EHV-1-viruksen DNA, jolloin EHV-4-sarjan putket olivat jääkaapissa jäällä pois tieltä. Kun EHV-1-sarja oli valmis, se siirrettiin  $-80$  °C:seen ja laminaarikaappi pestiin sekä UV-valotettiin ennen EHV-4-sarjan aloittamista. Noin 15 minuutin UV-valotuksen jälkeen tehtiin EHV-4-laimennossarja.

Jokainen laimennos sekoitettiin edestakaisin pipetoimalla noin 30 kertaa.

### 3.2 DNA-eristys

DNA-eristys suoritettiin QIAcube-eristysrobotilla QIAamp Viral RNA Mini -kittiä (Cat No: 1048147) käyttämällä ja valmistajan ohjeen mukaan. Käytetty eristysmenetelmä perustuu eristykseen silikakalvolla. Eristyksessä käytettiin RNA:n eristysohjelmaa, koska Evira on testannut sen toimivuuden myös DNA:n eristyksessä vuonna 2017. RNA-eristyskittiä käytetään myös monen muun DNA-viruksen diagnosoinnissa Eviran virologian tutkimusyksikössä. Tämä helpottaa laboratoriotyötä, kun DNA:ta ja RNA:ta ei tarvitse eristää näytteistä erillisillä kiteillä.

Jokaisessa eristyksessä oli steriili vesi negatiivisena kontrollina. Näytettä pipetoitiin eristykseen 140 µl ja lopullista eristettyä RNA:ta saatiin 50 µl. Näytteet olivat jäillä koko ajan entsyymiaktiivisuuden minimoimiseksi ja siirrettiin pakastimeen mahdollisimman nopeasti eristyksen jälkeen.

Jokainen laimennettu suspensionäyte eristettiin erikseen. Myös elinsuspensio- ja sierainlimapoleista otettiin näytteet negatiivisuuden tarkistusta varten. Ensimmäisenä eristettiin liuotetut sierainlimanäytteet sekä elinsuspensio-poolin näytteet. Sierainlimapoolinäytteitä oli kuusi; jokaisesta erillisestä liuotetusta sierainlimanäytteestä tehtiin oma eristyksensä. Elinsuspensio-pooliin käytettyjen näytteiden tiedettiin olevan EHV-negatiivisia, joten vasta poolin sekoituksen jälkeen otettiin kaksi rinnakkaista näytettä eristykseen. Pääasiassa jokainen laimennossarja ja näyte eristettiin erillisillä kerroilla ilman muita näytteitä kontaminaatioiden minimoimiseksi, mutta elinsuspensio-poolinäytteet eristettiin Eviran diagnostisten näytteiden kanssa. Diagnostiset näytteet olivat sioista ja naudoista peräisin olevia elinsuspensioita, joissa ei koettu olevan hevosen herpesviruksen kontaminaatiovaaraa.

Kaikki muut näytteet eristettiin vain kerran, paitsi matriisilaimennossarjat ja rokotussuspensiolaimennossarja. MEM-laimennossarjoista DNA eristettiin neljä kertaa ja elinsuspensio- sekä sierainlimalaimennossarjoista kolme kertaa. Ensimmäinen MEM- ja sierainlimasarjan eristys epäonnistui negatiivisen kontrollin kontaminoituessa. Eristystä ei täten hyväksytty, jonka takia MEM-laimennossarjasta eristettiin yhden kerran suunniteltua enemmän. Sierainlimalaimennossarjasta hyväksyttiin vain kaksi eristystä tulosten analysointiin, koska kolmanteen toistoon ei jäänyt matriisia. Rokotesuspensiolaimennossarjasta eristettiin kaksi sarjaa.

### 3.3 qPCR-monistukset

DNA-eristysten jälkeen aloitettiin qPCR-mittaukset. Käyttöön otettavan qPCR-menetelmän ajo-olosuhteiden toimivuus testattiin rokotesuspensiolaimennossarjalla. Ajo-olosuhteiden optimointi aloitettiin EHV-1 ja EHV-4 *monoplex* qPCR-ajoilla sekä erillisellä *multiplex* qPCR -ajolla. *Monoplex* qPCR-menetelmässä testattiin kumpikin virus erikseen omilla Master Mixeillä, *multiplex*-ajossa testattiin molempien viruksien toimivuus samalla Master Mixillä. Molemmat *monoplex*-ajot ajettiin samassa PCR-ajossa, mutta *multiplex*-reaktio ajettiin erikseen omassa ajossaan. Erillisten ajojen jälkeen testattiin vielä *monoplex*- ja *multiplex*-reaktiot samassa ajossa. Ajo-olosuhteiden tarkastuksen ja optimoinnin jälkeen testattiin kaikki muut näytteet.

Molemmilla viruksilla oli omat koettimensa. EHV-1-viruksen koettimessa oli leimana 6FAM-leima sekä NFQ-leima ja EHV-4-viruksen koettimessa oli VIC-leima ja NFQ-leima. Kummallakin oli myös omat alukkeensa. Alukkeiden ja koetinten sekvenssit näkyvät taulukossa 1.

Taulukko 1. Käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvenssit taulukoituna.

ALUKKEET JA KOETTIMET	SEKVENSSIT	VALMISTAJA
EHV-1 eteenpäin koodaava aluke F1:	5' CAT GTC AAC GCA CTC CCA 3'	Metabion International AG
EHV-1 taaksepäin koodaava aluke R1:	5' GGG TCG GGC GTT TCT GT 3'	Metabion International AG
EHV-1 koetin:	5' 6FAM- CCCTACGCTGCTCC-MGB-NFQ 3'	Thermo Fisher Scientific
EHV-4 eteenpäin koodaava aluke F1:	5' GGG CTA TTG GAT TAC AGC GAG AT 3'	Metabion International AG
EHV-4 taaksepäin koodaava aluke R1:	5' TAG AAT CGG AGG GCG TGA AG 3'	Metabion International AG
EHV-4 koetin:	5' VIC-CAGCGCCGTAACCAG-MGB-NFQ 3'	Thermo Fisher Scientific

Master Mix -reagenssina käytettiin QuantiNova Probe PCR -kitin (QIAGEN, tuote 208254) 2x Probe Master Mix -reagenssia (QIAGEN, tuote 1076700). *Monoplex*-reaktion reaktiivilavuudet näkyvät taulukossa 2 ja *multiplex*-reaktion tilavuudet taulukossa 3.

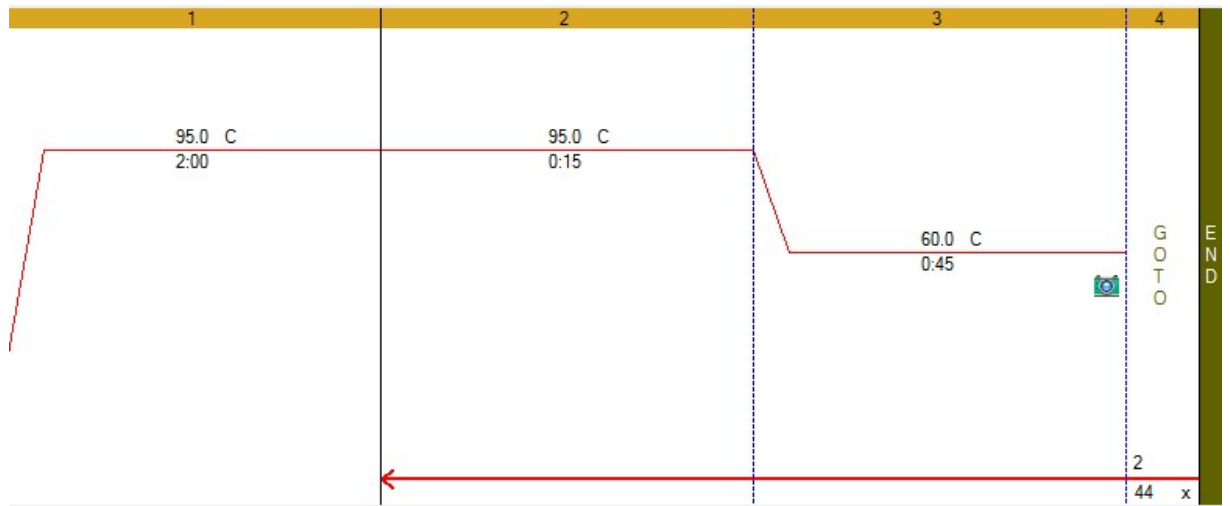
Taulukko 2. *Monoplex*-reaktion Master Mixin reagenssit ja niiden tilavuudet.

EHV-1 PCR-REAKTIO		EHV-4 PCR-REAKTIO	
PCR master mix	12,5 µl	PCR master mix	12,5 µl
ROX reference dye	1 µl	ROX reference dye	1 µl
aluke EHV1-F1 (10 pmol/µl)	1 µl	aluke EHV1-F1 (10 pmol/µl)	1 µl
aluke EHV1-R1 (10 pmol/µl)	1 µl	aluke EHV1-R1 (10 pmol/µl)	1 µl
koetin EHV1-MGB (10 pmol/µl)	0,25 µl	koetin EHV1-MGB (10 pmol/µl)	0,25 µl
H2O	4,25 µl	H2O	4,25 µl
Yhteensä	20 µl	Yhteensä	20 µl

Taulukko 3. *Multiplex*-reaktioon käytetyt reagenssit ja niiden tilavuudet.

EHV-1 JA -4 PCR-REAKTIO	
PCR master mix	12,5 µl
ROX reference dye	0,75 µl
aluke EHV1-F1 (10 pmol/µl)	1 µl
aluke EHV1-R1 (10 pmol/µl)	1 µl
probe EHV1-MGB(10 pmol/µl)	0,25 µl
aluke EHV4-F1 (10 pmol/µl)	2 µl
aluke EHV4-R1 (10 pmol/µl)	2 µl
Koetin EHV4-MGB (10 pmol/µl)	0,5 µl
Yhteensä	20 µl

Näyteputket pidettiin jäällä koko työskentelyn ajan ja PCR-levy (Bio-Rad, tuote: MLL9651) pidettiin kylmäblokillä. Reagenssit sekoitettiin huolellisesti suspensioimalla noin 15 kertaa. Master Mixiä laitettiin 20 µl PCR-levyn käytettäviin kuoppiin ja templaattia lisättiin 5 µl. PCR-levylle pipetoitiin aina ensin negatiiviset kontrollit ja lopuksi näytteet negatiivisten kontrollien kontaminaation ehkäisemiseksi. Positiivisena kontrollina käytettiin rokotesuspensiolaimennoksia väliltä  $10^{-2}$  –  $10^{-4}$ . Jokainen näyte pipetoitiin kahteen rinnakkaiseen reaktioon vierekkäisiin kuoppiin ja ne pipetoitiin samalla kertaa näyteputken ollessa auki. Pipetointien jälkeen näytelevy suljettiin huolellisesti kansiteipillä (Bio-Rad, tuote: MSB1001), sentrifugoitiin pikaisesti ja vietiin mitattavaksi mahdollisimman nopeasti. Mittauksessa käytettiin Bio-Radin CFX96 *Touch*-sarjan qPCR-laitetta. Käytetty qPCR-ohjelma on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. EHV-viruksien *multiplex* qPCR -ajo-ohjelma.

Elinsuspensio- ja elatusainematriisilaimennossarjojen avulla tehtiin toistosarjat. Toistoja tehtiin kaiken kaikkiaan viisi/laimennossarja, joista kolme oli saman henkilön ja kaksi eri henkilöiden tekemiä. Toistojen toteutus tehtiin samalla lailla yllä olevia reaktiutilavuuksia ja ajo-ohjelmia käyttäen.

## 4 Tulokset

Tuloksien käsittelyssä käsiteltiin erikseen EHV-1-qPCR-reaktioiden tulosten Ct-arvoja ja EHV-4-qPCR-reaktioiden Ct-arvoja. Tulosten käsittely aloitettiin määrittämällä kummallekin virustyyppiin tuloksille oma kynnyksäraja-arvonsa, jonka avulla tuloksista saatiin vertailukelpoiset. Kynnyksäraja-arvo asetettiin positiivisten tulosten logaritmisien kuvaajan eksponentiaalisen kasvun puoliväliin. EHV-1 6FAM-leimalle määritettiin kynnyksärajavoksi 680 RFU ja EHV-4 VIC-leimalle 640 RFU. Positiivisiksi tuloksiksi todettiin käyrät, jotka seurasivat eksponentiaalisen kasvun mallia.

### 4.1 Menetelmän optimoinnin tulokset

Menetelmän optimoinnissa käytettiin rokotesuspensiosta tehtyjä laimennossarjoja ja niistä testattuja *multiplex*- ja *monoplex*-reaktioita. Optimoinnissa tarkasteltiin laimennosten Ct-arvojen välisiä erotuksia vähentämällä  $10^{-2}$ -laimennoksen rinnakkaisten keskiarvosta  $10^{-1}$ -laimennoksen rinnakkaisten keskiarvo, laimennoksen  $10^{-3}$  keskiarvosta laimennoksen  $10^{-2}$  keskiarvo jne. *Multiplex*- ja *monoplex*-reaktioiden ollessa erillisissä

ajoissa laimennosten väliset erot olivat välillä 2,68 – 3,99 Ct-arvoa (ks. Taulukko 4). Noin kolmen Ct-arvon erotus oli hyväksyttävä 1:10 laimennossarjan peräkkäisille laimennoksille ja erotukset olivatkin sitä luokkaa laimennoksiin  $10^{-5}$  ja  $10^{-6}$  asti. *Multiplex*-ajon laimennoksien  $10^{-5}$  ja  $10^{-6}$  erotus oli 5,65 Ct-arvoa, mikä tulkittiin PCR-tehokkuuden heikkenemiseksi templaattimäärän vähentyessä.

Taulukko 4. Rokotesuspensiosta tehdyn laimennossarjan Ct-arvot taulukoituna, kun *multiplex*- ja *monoplex*-reaktiot ajettiin eri qPCR-mittauskerroilla.

**DUVAXYN-rokotesuspensiolaimennossarjojen monoplex- ja multiplex-reaktiot eri PCR-ajoissa**

Näyte	Monoplex/ Multiplex	EHV-1 (FAM) [Threshold=680]				EHV-4 (VIC) [Threshold=640]			
		1	2	Keski- arvo	Keskiarvojen erotus	1	2	Keski- arvo	Keskiarvojen erotus
DUVAXYN $10^{-1}$	Monoplex	20,30	20,26	20,28		18,88	18,62	18,75	
DUVAXYN $10^{-2}$	Monoplex	23,07	23,10	23,09	2,81	21,40	21,45	21,43	2,68
DUVAXYN $10^{-3}$	Monoplex	26,32	26,33	26,33	3,24	24,66	24,46	24,56	3,14
DUVAXYN $10^{-4}$	Monoplex	29,51	29,61	29,56	3,24	27,96	27,95	27,96	3,40
DUVAXYN $10^{-5}$	Monoplex	33,31	33,21	33,26	3,70	31,28	31,44	31,36	3,41
DUVAXYN $10^{-6}$	Monoplex	38,40	0,00	-	-	33,97	36,54	35,26	3,90
DUVAXYN $10^{-7}$	Monoplex	38,35	0,00	-	-	0,00	0,00	-	-
DUVAXYN $10^{-1}$	Multiplex	22,31	22,08	22,20		20,49	20,29	20,39	
DUVAXYN $10^{-2}$	Multiplex	24,88	24,95	24,92	2,72	23,16	23,15	23,16	2,77
DUVAXYN $10^{-3}$	Multiplex	28,09	28,08	28,09	3,17	26,20	26,18	26,19	3,04
DUVAXYN $10^{-4}$	Multiplex	31,30	31,54	31,42	3,34	29,40	29,62	29,51	3,32
DUVAXYN $10^{-5}$	Multiplex	35,25	35,56	35,41	3,99	33,36	33,48	33,42	3,91
DUVAXYN $10^{-6}$	Multiplex	43,75	38,36	41,06	5,65	36,05	35,99	36,02	2,60
DUVAXYN $10^{-7}$	Multiplex	0,00	40,70	-	-	0,00	0,00	-	-

Verrattavuuden parantamiseksi *multiplex*- ja *monoplex*-reaktiot testattiin myös samassa ajossa ja laimennosten väliset erot laskettiin, kuten edellä kuvattiin. Tulokset olivat välillä 2,53 – 3,73 laimennoksiin  $10^{-6}$  asti, jonka jälkeen PCR-tehokkuus alkoi heikentyä laimennoksissa  $10^{-7}$  (ks. Taulukko 5).

Taulukko 5. Rokotesuspensiosta tehdyn laimennossarjan Ct-arvot taulukoituna, kun *multiplex*- ja *monoplex*-reaktiot ajettiin samalla qPCR-mittauskerralla.

**DUVAXYN-rokotesuspensiolaimennossarjojen monoplex- ja multiplex-reaktiot samassa PCR-ajossa**

Näyte	Monoplex/ Multiplex	EHV-1 (FAM) [Threshold=680]				EHV-4 (VIC) [Threshold=640]			
		1	2	Keski- arvo	Keskiarvojen erotus	1	2	Keski- arvo	Keskiarvojen erotus
DUVAXYN 10 <sup>-1</sup>	Monoplex	21,83	21,66	21,75		21,15	20,78	20,97	
DUVAXYN 10 <sup>-2</sup>	Monoplex	24,42	24,41	24,42	2,67	23,56	23,57	23,57	2,60
DUVAXYN 10 <sup>-3</sup>	Monoplex	27,73	27,75	27,74	3,33	26,75	26,74	26,75	3,18
DUVAXYN 10 <sup>-4</sup>	Monoplex	31,18	31,14	31,16	3,42	30,15	30,10	30,13	3,38
DUVAXYN 10 <sup>-5</sup>	Monoplex	34,67	34,77	34,72	3,56	33,81	33,61	33,71	3,59
DUVAXYN 10 <sup>-6</sup>	Monoplex	37,55	36,94	37,25	2,53	37,51	36,64	37,08	3,37
DUVAXYN 10 <sup>-7</sup>	Monoplex	0,00	0,00	-	-	39,52	0,00	-	-
DUVAXYN 10 <sup>-1</sup>	Multiplex	20,93	20,71	20,82		20,94	20,70	20,82	
DUVAXYN 10 <sup>-2</sup>	Multiplex	23,40	23,36	23,38	2,56	23,44	23,35	23,40	2,58
DUVAXYN 10 <sup>-3</sup>	Multiplex	26,63	26,67	26,65	3,27	26,54	26,59	26,57	3,17
DUVAXYN 10 <sup>-4</sup>	Multiplex	30,05	29,89	29,97	3,32	29,91	29,80	29,86	3,29
DUVAXYN 10 <sup>-5</sup>	Multiplex	33,70	33,36	33,53	3,56	33,47	33,69	33,58	3,73
DUVAXYN 10 <sup>-6</sup>	Multiplex	38,85	37,48	38,17	4,64	36,28	37,52	36,90	3,32
DUVAXYN 10 <sup>-7</sup>	Multiplex	39,13	0,00	-	-	0,00	39,96	-	-

Optimoinnin tulosten perusteella todettiin, että käytettyjen alukkeiden, koettimien sekä muiden reagenssien ja ajo-ohjelman avulla pystyttiin monistamaan haluttuja viruksia sekä *mono-* että *multiplex*-reaktioissa hyvällä lineaarisuudella ja luotettavuudella laimennokseen 10<sup>-6</sup> asti. Laimennoksien erot olivat jokaisessa välissä lähellä 3 Ct-arvoa ja laimennoksien rinnakkaiset vastasivat myös hyvin toisiaan. Verifioinnissa siirryttiin käyttämään *multiplex*-reaktiota.

#### 4.2 Menetelmän tarkkuus ja yhdenmukaisuus

Käyttöön otettavan menetelmän tarkkuus ja yhdenmukaisuus määritettiin Ranskan referenssilaboratorion lähettämien näytteiden perusteella. Tarkkuus ja yhdenmukaisuus ovat hyviä, kun kahden eri menetelmän, eli tässä tapauksessa referenssilaboratorion käyttämän menetelmän ja tässä verifioinnissa käytetyn menetelmän, tulokset ovat täysin samanlaiset. Referenssinäytteistä suoritettujen testien tulosten perusteella todettiin, että EHV-1 positiivinen laimennossarja antoi positiivisen tuloksen 6FAM-leimalla ja EHV-4 positiivinen laimennossarja antoi vastaavasti positiivisen tuloksen VIC-leimalla (ks. taulukko 6), kuten myös menetelmän optimoinnissa (vrt. taulukkoihin 4 ja 5) ja muissa testeissä.



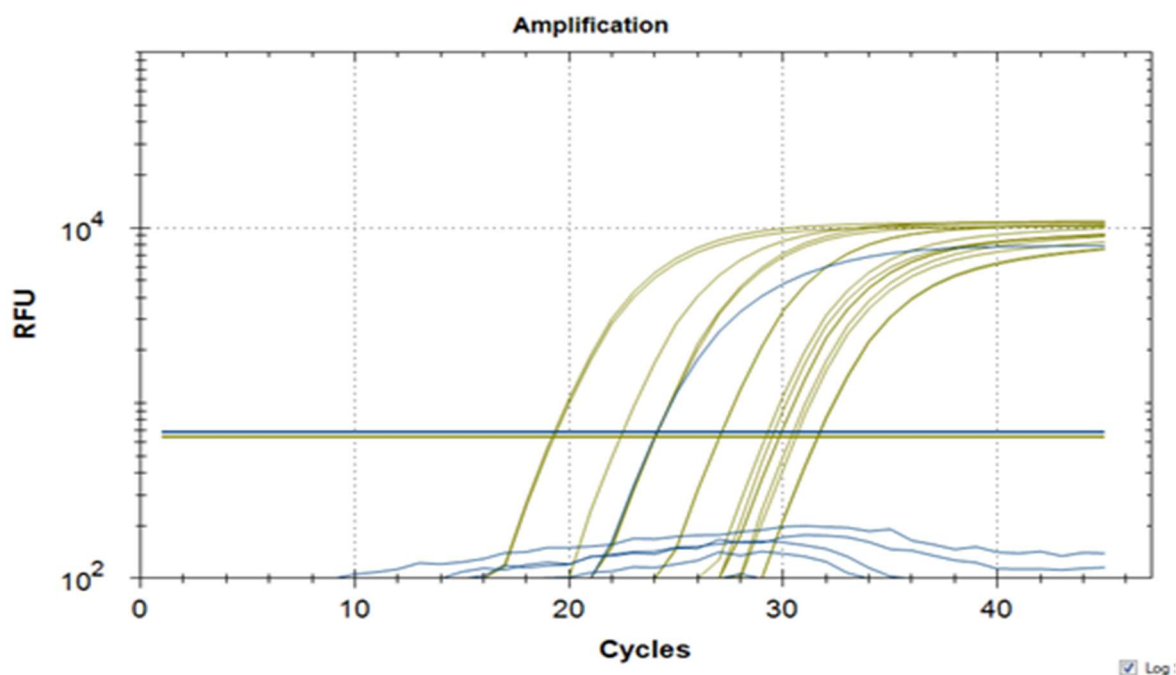
Taulukko 6. Työssä käytettyjen referenssi-DNA-laimennossarjojen Ct-arvot ja rinnakkaisten tulosten variaatiokertoimet taulukoituna kummankin viruksen leiman mukaan.

EHV-1 (FAM) [Threshold=680]				EHV-4 (VIC) [Threshold=640]			
Näyte	1	2	CV(%)	Näyte	1	2	CV(%)
ANSES EHV-1 -DNA 10 <sup>-1</sup>	23,33	23,21	0,36	ANSES EHV-1 -DNA 10 <sup>-1</sup>	0	0	0,00
ANSES EHV-1 -DNA 10 <sup>-2</sup>	26,44	26,38	0,16	ANSES EHV-1 -DNA 10 <sup>-2</sup>	0	0	0,00
ANSES EHV-1 -DNA 10 <sup>-3</sup>	30,01	29,86	0,35	ANSES EHV-1 -DNA 10 <sup>-3</sup>	0	0	0,00
ANSES EHV-4 -DNA 10 <sup>-1</sup>	0	0	0,00	ANSES EHV-4 -DNA 10 <sup>-1</sup>	21,8	21,7	0,33
ANSES EHV-4 -DNA 10 <sup>-2</sup>	0	0	0,00	ANSES EHV-4 -DNA 10 <sup>-2</sup>	25	24,99	0,03
ANSES EHV-4 -DNA 10 <sup>-3</sup>	0	0	0,00	ANSES EHV-4 -DNA 10 <sup>-3</sup>	28,53	28,56	0,07

Referenssinäytteiden tuloksia vertailtiin muiden testien tulosten Ct-arvoihin. Erot olivat samojen laimennosten välillä referenssinäytteissä korkeammat, mikä selittyy puhtaamman alkumateriaalin - PCR-laatusen veden ja jo eristetyn DNA:n - avulla. Referenssinäytteitä mitattaessa näytteissä oli vähemmän häiritseviä tekijöitä, kuten proteiineja. Näytteitä ei myöskään tarvinnut sekoituksen jälkeen enää DNA-eristää, mikä vähentää virhesignaalia monistumisessa. Lopputuloksena todettiin, että menetelmän tarkkuus ja yhdenmukaisuus olivat referenssien mukaan riittävät.

#### 4.3 Menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys

Menetelmän spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä tarkasteltiin mittaamalla vain toista virustyyppiä sisältäviä näytteitä *multiplex*-reaktiolla. Spesifisyyttä tutkittiin viruksien välillä tarkastelemalla negatiivisia mittaustuloksia; antoiko EHV-1 negatiivinen, mutta EHV-4 positiivinen näyte EHV-1 negatiivisen tuloksen ja toisin päin. Sensitiivisyyttä tarkasteltiin puolestaan tunnettujen positiivisten näytteiden avulla tutkimalla, oliko tiedetty positiivinen tulos myös mittauksissa selkeä positiivinen. Spesifisyyden ja sensitiivisyyden määrittämisessä tarkasteltiin referenssinäytteiden antamia tuloksia (ks. Liite 1) sekä kahta erillistä elinsuspensioon tehtyä laimennossarjaa: toisessa laimennossarjassa oli vain EHV-1-virusta (ks. Liite 1) ja toisessa vain EHV-4-virusta (ks. Kuva 7). Mittauksissa oli mukana aina sekä negatiivinen että positiivinen kontrolli molemmille virustyypeille. Esimerkkinä elinsuspensioon tehdyn EHV-4-viruksen laimennossarjan fluoresenssikuvaaja:



Kuva 7. EHV-4-viruksesta elinsuspensioon tehdyn laimennossarjan  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$  fluoresenssikuvaaja. Positiivinen kontrolli näkyy sinisenä käyränä. Siniset matalat käyrät indikoivat EHV-1-viruksen koettimen tarttuneen johonkin, esimerkiksi primer-dimereihin, aiheuttaen näin heikkoa fluoresenssia.

Mittaukset toimivat odotetusti. Tavoitteena oli saada positiivisia tuloksia vain halutulle virustyyppille, vaikka reaktio tehtiinkin *multiplex*-Master Mixiin. Selkeät eksponentiaalisesti kasvavat fluoresenssikuvaajat tulkittiin positiivisiksi tuloksiksi.

Molemmassa elinsuspensiomatriisimittauksessa saatiin myös heikkoa epäspesifistä fluoresenssia sille virukselle, jota laimennossarja ei sisältänyt. Nämä heikot monistumiset voivat johtua muun muassa kontaminaatiosta tai alukkeiden primer-dimereista. Näytteiden fluoresenssikuvaajat eivät kuitenkaan noudattaneet eksponentiaalista kasvukäyrää, joten ne tulkittiin negatiivisiksi.

Menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys varmistettiin myös kyseisten laimennossarjojen tulosten Ct-arvoista (ks. Taulukot 6 ja 7). Positiiviset kontrollit antoivat odotetut tulokset molemmille virustyypeille niin elinsuspensiolaimennossarjoissa kuin myös referenssinäytteiden laimennossarjoissa.

Taulukko 7. EHV-1- ja EHV-4-viruksien laimennossarjoista saadut tulokset vastasivat fluoressikuvaajia ja arvot vastasivat aikaisempia tuloksia. VR700 tarkoittaa EHV-1-viruskannasta tehtyä laimennossarjaa ja Newmarket tarkoittaa EHV-4-viruskannasta tehtyä laimennossarjaa.

	EHV-1 (FAM) [Threshold=680]		EHV-4 (VIC) [Threshold=640]	
	Rinnakkaiset näytteet (Ct)			
<b>Näyte</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
VR700 10 <sup>-1</sup>	18,13	17,98	0,00	0,00
VR700 10 <sup>-2</sup>	20,23	20,17	0,00	0,00
VR700 10 <sup>-3</sup>	24,49	24,48	0,00	0,00
VR700 10 <sup>-4</sup>	26,31	26,31	0,00	0,00
VR700 10 <sup>-5</sup>	28,27	28,27	0,00	0,00
VR700 10 <sup>-6</sup>	28,87	29,01	0,00	0,00
VR700 10 <sup>-7</sup>	29,34	29,23	0,00	0,00
<b>Positiivinen kontrolli</b>	28,05		27,97	
<b>Näyte</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
NEWMARKET 10 <sup>-1</sup>	0,00	0,00	19,24	19,15
NEWMARKET 10 <sup>-2</sup>	0,00	0,00	24,03	23,99
NEWMARKET 10 <sup>-3</sup>	0,00	0,00	27,02	27,01
NEWMARKET 10 <sup>-4</sup>	0,00	0,00	29,76	29,75
NEWMARKET 10 <sup>-5</sup>	0,00	0,00	31,51	31,55
NEWMARKET 10 <sup>-6</sup>	0,00	0,00	30,29	30,5
NEWMARKET 10 <sup>-7</sup>	0,00	0,00	29,39	29,14
<b>Positiivinen kontrolli</b>	26,09		26,14	

Laimennoksien Ct-arvot vastasivat fluoressikuvaajien tuloksia. Vain eksponentiaalisesti kasvaneet näytteet antoivat selkeän Ct-arvon.

EHV-1 ja -4 *multiplex* qPCR -menetelmän alkuperäisessä julkaisussa menetelmän spesifisyyttä testattiin myös virustyypeillä 2, 3 ja 5. Tulokset olivat julkaisun mukaan negatiivisia kaikille muille EHV-tyypeille kuin EHV-1 ja -4. [1.]

Käytetyn menetelmän todettiin olevan spesifinen kummallekin tutkitulle virukselle ja myös tarpeeksi sensitiivinen tunnistamaan vain toisen virustyyppin näytteistä.

#### 4.4 Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan yhden tekijän useiden toistojen tulosten eroavaisuutta ja uusittavuudella eroavaisuutta tutkitaan useiden eri henkilöiden välillä. Kumpaakin parametriä voidaan tutkia variaatiokertoimen avulla, joka kertoo prosentteina tulosten välisen eron. Tässä opinnäytetyössä toistettavuus ja uusittavuus tutkittiin matriisilaimennossarjoista saatujen Ct-arvojen avulla.

Toistettavuus määritettiin yhden tekijän tulosten välisten variaatiokertoimien avulla (ks. Taulukko 8). EHV-1-viruksen mittauksissa tulokset vaihtelivat välillä 0,08 – 2,45 %, joista alhaisin tulos oli elatusaineen laimennos  $10^{-1}$  ja korkein sierainlimamatriisin laimennos  $10^{-7}$ . EHV-4-viruksen tulokset vaihtelivat elatusaineen  $10^{-5}$  laimennoksen 0,12 %:sta sierainlimamatriisin  $10^{-4}$  laimennoksen 3,50 %:n. EHV-4-viruksen variaatiokertoimet olivat hieman korkeampia kuin EHV-1-viruksen tuloksissa. Variaatiokertoimien ero voi johtua pienistä eroista laimennossarjojen valmistuksessa sekä qPCR-menetelmien tehokkuuksien eroista monistaa EHV-1-virusta ja EHV-4-virusta.

Taulukko 8. Yhden tekijän tulokset kaikista matriisilaimennossarjoista. Elatusaineen ja elinsuspension toistettavuus saatiin kolmesta toistosta, sierainlimanäytteistä tehtiin kaksi toistoa. Toistojen tulokset esitetään kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvona.

Näyte	EHV-1 (FAM) [Threshold=680]				EHV-4 (VIC) [Threshold=640]			
	Yksi sama tekijä (Ct)							
	Toisto 1 tulosten ka	Toisto 2 tulosten ka	Toisto 3 tulosten ka	Tekijän sisäinen CV(%)	Toisto 1 tulosten ka	Toisto 2 tulosten ka	Toisto 3 tulosten ka	Tekijän sisäinen CV(%)
MEM 10 <sup>-1</sup>	17,86	17,86	17,83	0,08	21,20	21,09	21,07	0,32
MEM 10 <sup>-2</sup>	20,76	20,97	20,84	0,52	24,07	24,09	23,82	0,63
MEM 10 <sup>-3</sup>	23,91	24,04	24,33	0,90	27,45	27,18	27,11	0,65
MEM 10 <sup>-4</sup>	27,31	27,42	27,33	0,20	29,99	29,35	29,63	1,08
MEM 10 <sup>-5</sup>	29,36	28,99	29,55	0,97	32,14	32,13	32,20	0,12
MEM 10 <sup>-6</sup>	30,57	30,62	30,08	0,98	33,06	33,23	33,41	0,53
MEM 10 <sup>-7</sup>	30,86	30,45	31,00	0,92	33,95	34,15	34,15	0,33
Elinsuspensio 10 <sup>-1</sup>	17,13	17,36	17,36	0,77	20,42	21,13	20,64	1,74
Elinsuspensio 10 <sup>-2</sup>	19,43	20,20	20,17	2,17	23,07	23,85	23,61	1,70
Elinsuspensio 10 <sup>-3</sup>	23,29	23,40	23,67	0,84	27,02	27,22	26,55	1,27
Elinsuspensio 10 <sup>-4</sup>	26,85	26,96	26,27	1,38	29,86	30,34	29,96	0,83
Elinsuspensio 10 <sup>-5</sup>	29,74	29,30	29,80	0,92	32,33	32,74	32,57	0,63
Elinsuspensio 10 <sup>-6</sup>	31,70	32,24	31,82	0,90	34,43	34,83	33,86	1,43
Elinsuspensio 10 <sup>-7</sup>	32,64	31,88	32,17	1,19	34,98	37,05	35,02	3,33
Sierainlima 10 <sup>-1</sup>	17,61	17,39		0,89	20,33	19,64		2,42
Sierainlima 10 <sup>-2</sup>	20,39	20,61		0,76	22,45	22,40		0,14
Sierainlima 10 <sup>-3</sup>	23,97	23,64		0,98	25,85	25,77		0,22
Sierainlima 10 <sup>-4</sup>	26,34	26,53		0,49	26,67	28,03		3,50
Sierainlima 10 <sup>-5</sup>	29,94	30,10		0,37	31,32	31,24		0,17
Sierainlima 10 <sup>-6</sup>	33,00	33,07		0,15	33,80	34,17		0,77
Sierainlima 10 <sup>-7</sup>	36,80	35,54		2,45	37,56	38,08		0,97

Toistettavuuden lisäksi laskettiin uusittavuus. Uusittavuudessa tulkittiin kolmen eri tekijän välistä variaatiokerrointa, kun käytetyt matriisilaimennokset olivat 10<sup>-2</sup> – 10<sup>-6</sup> (ks. Taulukko 9). EHV-1-viruksen tuloksissa pienin variaatiokerroin oli elatusaineen laimennoksen 10<sup>-3</sup> tulos 0,71 % ja suurin saman matriisin laimennoksen 10<sup>-4</sup> tulos 2,07 %. Pääasiassa kaikki tulokset vaihtelivat välillä 1 – 1,5 % eli erot olivat todella alhaiset. EHV-4-viruksen mittauksissa tulokset olivat välillä 0,65 – 4,19 %, joista alhaisin tulos oli elatus-

aineen laimennos  $10^{-6}$  ja korkein elinsuspension laimennos  $10^{-5}$ . Elinsuspensiolaimennoksen  $10^{-5}$  variaatiokerroin oli huomattavasti korkeampi. Kuitenkin myös EHV-4-viruksen tuloksissa variaatiokertoimet olivat noin 2 %, mikä oli myös hyväksyttävä tulos.

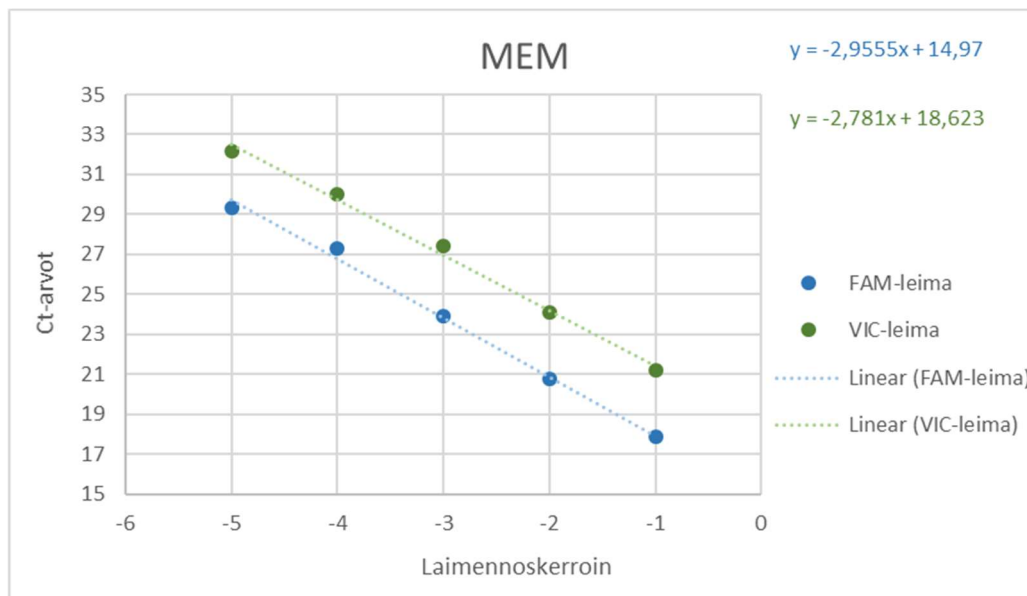
Taulukko 9. Menetelmän uusittavuus laskettiin kolmen eri tekijän kesken. Näytteinä oli elatusaineeseen ja elinsuspensioon tehdyt laimennossarjat  $10^{-2}$ – $10^{-6}$ . Käsitellyt tulokset olivat yhden toiston kahden rinnakkaisen tuloksen keskiarvot.

<b>EHV-1 (FAM) [Threshold=680]</b>								
<b>Näyte</b>	<b>Tekijä 1 (Ct)</b>			<b>Tekijä 2 (Ct)</b>		<b>Tekijä 3 (Ct)</b>		<b>Tekijöiden välinen CV(%)</b>
	<b>Toisto 1, ka</b>	<b>Toisto 2, ka</b>	<b>Toisto 3, ka</b>	<b>Toisto 1, ka</b>	<b>Toisto 2, ka</b>	<b>Toisto 1, ka</b>	<b>Toisto 2, ka</b>	
<b>MEM <math>10^{-2}</math></b>	20,76	20,97	20,84	20,57	20,43	20,57	20,72	0,88
<b>MEM <math>10^{-3}</math></b>	23,91	24,04	24,33	23,94	23,82	24,16	24,04	0,71
<b>MEM <math>10^{-4}</math></b>	27,31	27,42	27,33	26,31	26,07	26,59	26,46	2,07
<b>MEM <math>10^{-5}</math></b>	29,36	28,99	29,55	29,28	29,21	29,09	28,80	0,85
<b>MEM <math>10^{-6}</math></b>	30,57	30,62	30,08	30,74	30,54	30,71	30,31	0,78
<b>Elinsuspensio <math>10^{-2}</math></b>	19,43	20,20	20,17	20,33	20,22	20,15	20,06	1,48
<b>Elinsuspensio <math>10^{-3}</math></b>	23,29	23,40	23,67	23,25	23,31	24,25	23,98	1,66
<b>Elinsuspensio <math>10^{-4}</math></b>	26,85	26,96	26,27	27,00	26,90	27,50	27,34	1,46
<b>Elinsuspensio <math>10^{-5}</math></b>	29,74	29,30	29,80	30,14	29,82	29,99	29,80	0,87
<b>Elinsuspensio <math>10^{-6}</math></b>	31,70	32,24	31,82	33,06	32,20	31,84	31,92	1,45
<b>EHV-4 (VIC) [Threshold=640]</b>								
<b>Näyte</b>	<b>Tekijä 1 (Ct)</b>			<b>Tekijä 2 (Ct)</b>		<b>Tekijä 3 (Ct)</b>		<b>Tekijöiden välinen CV(%)</b>
	<b>Toisto 1, ka</b>	<b>Toisto 2, ka</b>	<b>Toisto 3, ka</b>	<b>Toisto 1, ka</b>	<b>Toisto 2, ka</b>	<b>Toisto 1, ka</b>	<b>Toisto 2, ka</b>	
<b>MEM <math>10^{-2}</math></b>	24,07	24,09	23,82	23,69	23,56	23,77	24,00	0,84
<b>MEM <math>10^{-3}</math></b>	27,45	27,18	27,11	25,62	25,49	27,34	27,23	3,14
<b>MEM <math>10^{-4}</math></b>	29,99	29,35	29,63	29,41	29,22	29,37	29,42	0,86
<b>MEM <math>10^{-5}</math></b>	32,14	32,13	32,20	32,04	31,54	32,10	32,23	0,73
<b>MEM <math>10^{-6}</math></b>	33,06	33,23	33,41	33,14	33,07	32,84	32,79	0,65
<b>Elinsuspensio <math>10^{-2}</math></b>	23,07	23,85	23,61	23,23	23,23	23,57	23,51	1,16
<b>Elinsuspensio <math>10^{-3}</math></b>	27,02	27,22	26,55	26,35	26,39	27,48	27,14	1,66
<b>Elinsuspensio <math>10^{-4}</math></b>	29,86	30,34	29,96	29,11	29,06	28,40	28,28	2,70
<b>Elinsuspensio <math>10^{-5}</math></b>	32,33	32,74	32,57	30,08	29,58	32,47	32,54	4,19
<b>Elinsuspensio <math>10^{-6}</math></b>	34,43	34,83	33,86	34,97	34,43	33,27	34,25	1,69

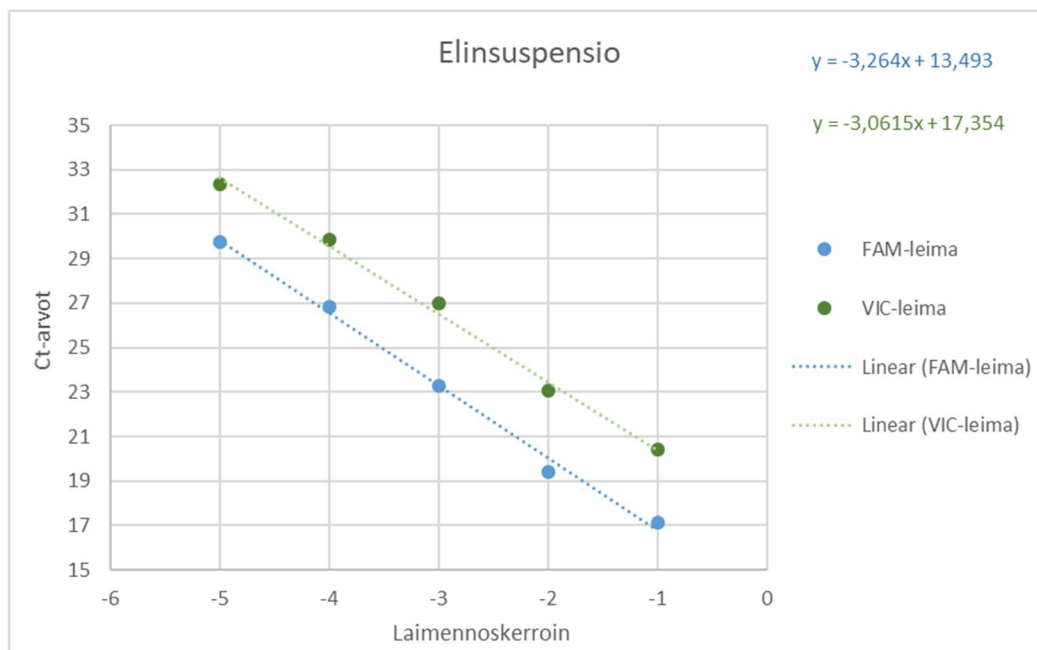
#### 4.5 Menetelmän PCR-tehokkuus

Käyttöön otettavan menetelmän PCR-tehokkuus määritettiin matriisilaimennossarjojen ensimmäisistä mittaustoistoista. Sarjoista tehtiin standardisuorat ja suorien kulmakertoimien avulla määritettiin PCR-tehokkuus käyttämällä PCR-tehokkuuden laskinta [15].

PCR-tehokkuus laskettiin erikseen kummallekin EHV-virukselle jokaisessa matriisissa (ks. Kuvat 8, 9 ja 10). Toistoista tehdyt standardisuorat olivat seuraavat:

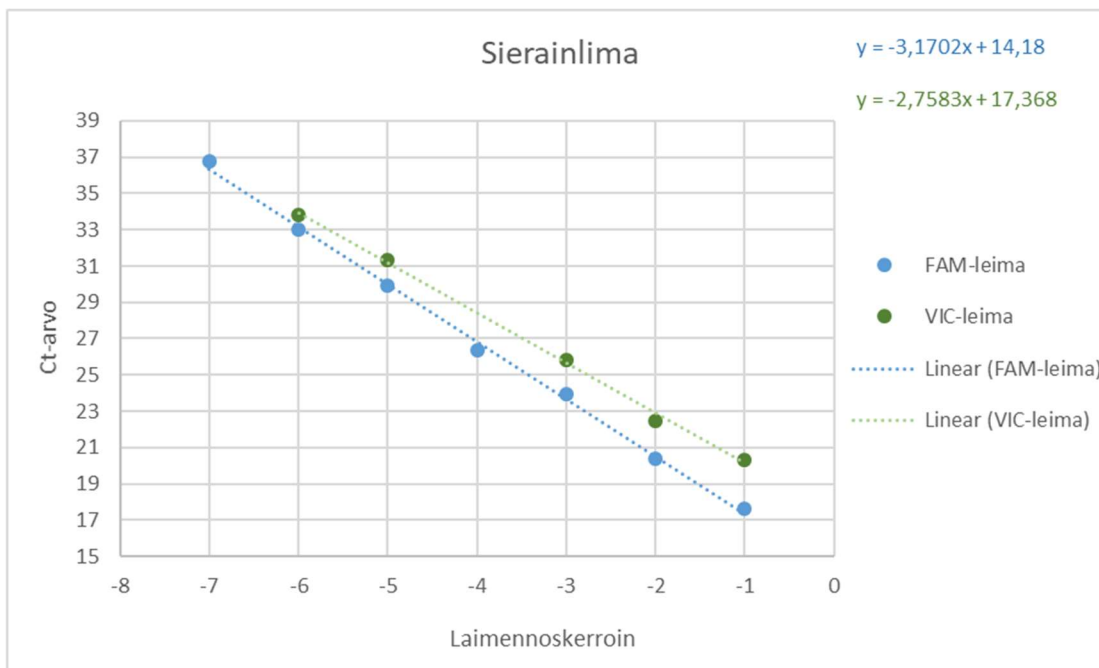


Kuva 8. MEM-matriisin EHV-1 ja -4 standardisuorat sekä suorien kaavat. Standardisuora tehtiin toisen MEM-laimennossarjan toiston tuloksista. Sininen suora (FAM-leima) kuvastaa EHV-1-virustyyppin mittaustuloksia ja vihreä suora (VIC-leima) EHV-4-virustyyppin mittaustuloksia.



Kuva 9. Elinsuspensiomatriisin EHV-1 ja -4 standardisuorat sekä suorien kaavat. Standardisuorat tehtiin ensimmäisen elinsuspensiolaimennossarjan toiston tuloksista. Sininen suora kuvastaa EHV-1-virustyyppin mittaustuloksia ja vihreä suora EHV-4-virustyyppin mittaustuloksia.





Kuva 10. Sierainlimamatriisin EHV-1 ja -4 standardisuorat sekä suorien kaavat. Standardisuora tehtiin toisesta sierainlimalaimennossarjan toiston tuloksista. Sininen suora kuvastaa EHV-1-virustyyppin mittaustuloksia ja vihreä suora EHV-4-virustyyppin mittaustuloksia.

Standardisuoria tehdessä huomattiin tulosten poikkeavuus laimennoksissa  $10^{-6}$  ja  $10^{-7}$ . Tuloksien poikkeavuudet voivat johtua pipetointivirheistä tai menetelmien tehokkuuden laskusta DNA-templaattien määrien ollessa pieniä. Standardisuorien optimoimiseksi nämä laimennokset puuttuvat muista kuvaajista kuin sierainlimamatriisin kuvaajasta.

EHV-1-viruksen PCR-tehokkuus oli elatusainematriisissa 117,69 %, elinsuspensiomatriisissa 126,65 % ja sierainlimamatriisissa 106,76 %. EHV-4 PCR-tehokkuus elatusainematriisissa oli 128,94 %, elinsuspensiomatriisissa 112,23 % sekä sierainlimamatriisissa 130,31 %.

## 5 Pohdinta ja lopputulos

Tässä opinnäytetyössä verifioidun *multiplex* qPCR-menetelmän käyttöönoton todettiin onnistuneen EHV-1- ja EHV-4-viruksille. Tulosten perusteella todettiin, että menetelmä soveltuu kummankin virustyyppin määrittämiseen yhdessä ja erikseen elatusaine-, elinsuspensio- sekä sierainlimanäytteistä. Menetelmän tarkkuus oli referenssinäytteiden tuloksien perusteella hyvä, ja menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys olivat riittäviä todentamaan molemmat virustyyppit.

Toistettavuus sekä uusittavuus olivat myös hyväksyttäviä. Toistettavuudessa ja uusittavuudessa pientä, mutta ei merkittävää, vaihtelua aiheuttavat erilaiset testin suorittajasta riippumattomat sekä riippuvat tekijät, kuten välineiden vaihteleva tarkkuus, testin suorittajan pipetointivirheet tai näytteen sisältämät inhibiittorit. Verifioinnin perusteella voidaan todeta, ettei menetelmän toimivuus ole riippuvainen testin suorittajasta tai suoristuskerrasta.

Verifioinnin perusteella menetelmän diagnostista käyttöä varten määritettiin, että menetelmällä saatu tulos on positiivinen silloin, kun Ct-arvo on alle 35 ja PCR-tuotteen monistumista kuvaava fluoresenssikäyrä kasvaa eksponentiaalisesti. Tulos on negatiivinen, kun eksponentiaalista monistumista ei ole havaittavissa. Tulos on epäilyttävä silloin, kun Ct-arvo on yli 35 ja eksponentiaalista monistumista havaitaan. Testissä tulee aina olla mukana sekä negatiivinen että positiivinen kontrolli, ja niistä on saatava odotetut tulokset ennen kuin testi voidaan hyväksyä. Epäilyttävät ja positiiviset testitulokset varmistetaan aina joko uusimalla testillä, testaamalla näytteet jollain toisella menetelmällä tai sekvensoimalla saatu PCR-tuote.

PCR-tehokkuuden korkeat prosentit vaatisivat jatkotutkimuksia. Yleensä yli sadan prosentin tehokkuus johtuu mittausvirheistä, mutta myös näytteiden inhibiittorit ja kontaminaatiot aiheuttavat tehokkuuden arvon nousua [15]. Kyseisten matriisien yli sadan prosentin PCR-tehokkuus johtuu todennäköisimmin biologisten näytteiden luontaisista inhibiittoreista.

Menetelmän todettiin olevan valmis käyttöönotettavaksi EHV-1 ja EHV-4-diagnostiikassa Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä. Menetelmää voidaan käyttää muun muassa osoitettaessa tautivapautta, selvitetessä taudinsyytä sekä toteutettaessa tautiseurantaa. Verifioitu menetelmä korvaa aikaisemmin virologian yksikössä käytetyn perinteisen PCR -menetelmän, ja menetelmä tullaan liittämään Eviran FINAS-akkreditoituihin qPCR-menetelmiin. Menetelmän laatua tarkkaillaan jatkuvasti kontrollinäytteiden avulla sekä osallistumalla mahdollisuuksien mukaan referenssilaboratorion järjestämiin vertailumittauksiin.

## Lähteet

- 1 Diallo, Ibrahim S. ym. (2007). *Veterinary Microbiology* 123, sivut 93-103: Multiplex Real-Time PCR for the Detection and Differentiation of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) And Equid Herpesvirus 4 (EHV-4)
- 2 Elintarviketurvallisuusvirasto Evira: Hevosien herpesvirus EHV-1 ja EHV-4 infektiot (2017). Verkkoaineisto. Luettu 1.4.2018.
- 3 ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics: Varicellovirus (2017). Verkkoaineisto. Luettu 1.4.2018.
- 4 ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics: Fusion of Virus Membrane With Host Cell Membrane (2011). Verkkoaineisto. Luettu 1.4.2018.
- 5 Spiesschaert Bart ym. (2015). MDPI AG, Basel, Switzerland: Comparative Analysis of Glycoprotein B (gB) of Equine Herpesvirus Type 1 and Type 4 (EHV-1 and EHV-4) in Cellular Tropism and Cell-to-Cell Transmission
- 6 ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics: Varicellovirus (2017). Verkkoaineisto. Luettu 1.4.2018.
- 7 Thermo Fisher Scientific: Product Bulletin: TaqMan Multiplex Real-Time PCR (2016). Luettu 31.5.2018.
- 8 Kutyavin, Igor V. ym. (2000) Oxford University Press *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, No. 2, sivut 655-661: 3' -Minor Groove Binder-DNA Probes Increase Sequence Specificity at PCR Extension Temperatures
- 9 Thermo Fisher Scientific: TaqMan MGB Probes. Verkkoaineisto. Luettu 1.6.2018.
- 10 Bio-Rad: Introduction to PCR Primer & Probe Chemistries (2018). Verkkoaineisto. Luettu 1.6.2018.
- 11 Bio-Rad (2006): Bio-Rad Applications Guide: Real-Time PCR Applications Guide
- 12 Thermo Fisher Scientific: Efficiency of Real-Time PCR. Verkkoaineisto. Luettu 4.6.2018.
- 13 Biosistemika - Cepin, Urska: Understanding qPCR Efficiency and Why It Can Exceed 100% (2017). Verkkoaineisto. Luettu 4.6.2018.
- 14 Youtube, MrSimpleScience: What Is a Primer Dimer – Simple Animated – HD – PCR Problems (2014). Videomateriaali. Katsottu 4.6.2018.

- 15 Thermo Fisher Scientific: qPCR Efficiency Calculator. Verkkoaineisto. Luettu 4.6.2018.
- 16 Broeders S. ym. (2014). Trends in Food Science & Technology, osa 37, numero 2, sivut 115-126: Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods

## Fluoresenssikuvaaja

Liitteenä kappaleeseen "4.3 Menetelmän spesifisyys ja sensitiivisyys" liittyvät fluoresenssikuvaajat. Ylempänä veteen laimennettujen referenssinäytteiden laimennossarjan  $10^{-1} - 10^{-3}$  kuvaaja, jossa siniset käyrät kuvaavat EHV-1-viruksen positiivisia tuloksia ja vihreät käyrät kuvaavat EHV-4-viruksen positiivisia tuloksia. Alempana elinsuspensioon tehty EHV-1-laimennossarja  $10^{-1} - 10^{-7}$ , jossa siniset käyrät kuvaavat EHV-1 positiivisia tuloksia ja vihreä käyrä kuvaa positiivisen kontrollin sisältämää EHV-4-virusta indikoiden onnistunutta mittausta.

