



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Roosa Kantola

Reaaliaikaisen *multiplex* RT-PCR-menetelmän käyttöönotto ja validointi *porcine reproductive and respiratory syndrome* -virukselle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

28.11.2018

| | |
|---|---|
| Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika | Roosa Kantola Reaaliaikaisen <i>multiplex</i> RT-PCR -menetelmän käyttöönotto ja validointi <i>porcine reproductive and respiratory syndrome</i> -virukselle 30 sivua + 1 liite 28.11.2018 |
| Tutkinto | Laboratorioanalyttikko (AMK) |
| Tutkinto-ohjelma | Laboratorioanalytiikka |
| Ohjaajat | Tutkija Ilona Laamanen Lehtori Tiina Soininen |
| <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli käyttöönottaa ja validoida tehokkaampi tutkimusmenetelmä <i>porcine reproductive and respiratory syndrome</i> -virukselle (PRRSV, sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymävirus) entisen perinteisen PCR-menetelmän tilalle Elintarviketurvallisuusviraton (Evira) Virologian tutkimusyksikössä. Käyttöön otettu menetelmä oli reaaliaikainen <i>multiplex</i> RT-PCR -menetelmä, jolla voidaan todeta ja erottaa PRRS-viruksen eurooppalaista (EU) ja pohjoisamerikkalaista (NA) tyyppiä edustavat viruskannat yhtäaikaista.</p> <p>Työ toteutettiin aiemmin julkaistun saksalaisen tutkimuksen pohjalta (Wernike, 2012a), jonka mukaan valittiin alukkeet, koettimet ja niiden pitoisuudet sekä PCR-ajo-ohjelma. Valitut alukkeet ja koettimet sekä PCR-ajo-ohjelma testattiin menetelmän käyttöönoton yhteydessä. Käyttöönoton jälkeen testi validoitiin.</p> <p>Menetelmän testaus suoritettiin kumpaakin PRRS-viruksen tyyppiä (EU ja NA), edustavan prototyyppikannan laimennussarjoilla (10^{-1}—10^{-8}). Validointiin käytettiin kaupallista vuoden 2018 vertailututkimusnäytepaneelia, joka sisälsi PRRS-viruspositiivisia ja -negatiivisia sian seeruminäytteitä ($n = 8$). Lisäksi validoinnissa testattiin neljää eri matriisia, jotka olivat sian elinsuspensio, seerumi, siemenneste sekä soluviljelyelatusaine. Matriiseihin tehtiin laimennussarjat PRRS-viruksen molempia tyyppisiä edustavista prototyyppikannoista ja kustakin laimennoksesta eristettiin virus-RNA. Näytteet analysoitiin käyttöönotetulla testillä.</p> <p>Tuloksista määritettiin testin spesifisyys, sensitiivisyys, tarkkuus ja selektiivisyys, jotka todettiin erinomaiseksi. Toistettavuus määritettiin yhden henkilön kolmen toistokerran tuloksista lasketun variaatiokertoimen (CV %) avulla, kun taas uusittavuutta mitattiin kolmen eri henkilön toistojen tuloksista lasketun variaatiokertoimen avulla. Näillä parametreilla menetelmä todettiin toimivaksi ja validointi onnistuneeksi.</p> <p>Työssä validoitu menetelmä lisätään Eviran Virologian tutkimusyksikön FINAS-akkreditoituihin reaaliaikaisiin <i>multiplex</i> RT-PCR -menetelmiin.</p> | |
| Avainsanat | Reaaliaikainen RT-PCR, PRRS-virus, <i>multiplex</i> -reaktio, validointi |

| | |
|---|---|
| Author Title Number of Pages Date | Roosa Kantola The Introduction and Validation of Multiplex Real-time RT-PCR Method for PRRS-virus 30 pages + 1 appendix 28 November 2018 |
| Degree | Bachelor of Laboratory Services |
| Degree Programme | Laboratory Sciences |
| Instructors | Ilona Laamanen, Research Officer Tiina Soininen, Senior Lecturer |
| <p>The aim of this study was to set up and validate an effective diagnostic method for Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) at Virology Research Unit of Finnish Food Safety Authority (Evira). The introduced method was real-time multiplex RT-PCR and the method replaces the old conventional PCR method. The new method is intended to detect and differentiate the European (EU) and the North American (NA) types of PRRSV simultaneously.</p> <p>This study was carried out according to an earlier published German study (Wernike, 2012a) where primers and probes were obtained for the European and North American types of PRRSV. The method was tested with the selected primers and probes and PCR temperature profiles. The introduced new test was then validated.</p> <p>The introduced testing method was implemented using dilution series (10^{-1}—10^{-8}) of PRRSV prototype strains representing European and North American types. For validation, commercial proficiency test panel was used including PRRSV positive and negative swine serum samples ($n = 8$). To evaluate the effect of the sample type on the test four different matrices, i.e. pig organ suspension, serum, semen and cell culture medium were tested with dilution series of both PRRSV prototypes. Virus-RNA was extracted from each dilution of each of the four matrices and tested.</p> <p>Specificity, sensitivity, accuracy and selectivity of the test were determined, and excellent results were obtained. Repeatability and reproducibility were determined by coefficient of variation (CV %). The results showed that the new method was functional, and the validation was successful.</p> <p>The validated real-time multiplex RT-PCR method will be included in FINAS-accredited methods of Virology Research Unit of Evira.</p> | |
| Keywords | Real-time RT-PCR, PRRS-virus, multiplex-reaction, validation |

Sisällys

Lyhenteet

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Teoria | 2 |
| 2.1 | PRRS-tauti | 2 |
| 2.2 | RT-PCR ja reaaliaikainen PCR | 4 |
| 2.3 | <i>Multiplex- ja monoplex</i> -reaktiot | 6 |
| 2.4 | Reaaliaikaisen PCR-menetelmän tulosten analysointi | 7 |
| 2.5 | Validointi | 8 |
| 2.5.1 | Sensitiivisyys, spesifisyys, tarkkuus ja selektiivisyys | 8 |
| 2.5.2 | Toistettavuus ja uusittavuus | 9 |
| 3 | Materiaalit ja työn suoritus | 11 |
| 3.1 | Laitteistot, materiaalit ja reagenssit | 11 |
| 3.2 | Näytteiden esikäsittely | 12 |
| 3.3 | RNA:n eristys | 14 |
| 3.4 | Menetelmän käyttöönotto | 15 |
| 3.4.1 | Alukkeiden ja koettimien liuottaminen ja laimentaminen | 15 |
| 3.4.2 | Käytöön otetun menetelmän testaaminen | 16 |
| 3.5 | Menetelmän validointi | 17 |
| 4 | Tulokset | 18 |
| 4.1 | Menetelmän käyttöönotto | 18 |
| 4.2 | Menetelmän validointi | 18 |
| 4.2.1 | Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus | 19 |
| 4.2.2 | Menetelmän selektiivisyys | 22 |
| 4.2.3 | Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus | 23 |
| 4.3 | Menetelmän arviointia tilastollisen testin avulla | 26 |
| 5 | Loppupäätelmät | 29 |
| | Lähteet | 31 |

Liite 1. ANOVA-analyysin kuvaajat

Lyhenteet

| | |
|---------|--|
| ANOVA | Analysis of Variance. Varianssianalyysi. |
| BHQ | Black Hole Quencher. Black Hole Quencher-leima. |
| cDNA | Complementary DNA. Komplementaarinen DNA, |
| Ct-arvo | Cycle Threshold. Kynnysarvo. |
| CV | Coefficient of variation. Variaatiokerroin. |
| IBR | Infectious Bovine Rhinotracheitis. Naudan tarttuva rinotrakeiitti. |
| ORF | Open reading frame. Avoin lukukehys. |
| PRRS | Porcine reproductive and respiratory syndrome. Sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymä. |
| PRRSV | Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymä -virus. |
| PCR | Polymerase chain reaction. Polymeraasiketjureaktio. |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio. |

1 Johdanto

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV, sikojen lisääntymis- ja hengitystieoireyhtymävirus) on sioilla esiintyvä virus, jonka aiheuttama PRRS-tauti on maailmanlaajuisesti esiintyvä ja taloudellisesti merkittävä sikojen virustauti. Virus leviää tartunnan saaneiden sikojen välityksellä sikalasta toiseen. On myös todettu, että ilmavirrat voivat levittää virusta. Mekaanisesti virus voi levitä muun muassa ulosteen, pölyn ja eritteiden välityksellä. PRRS-virus voidaan todeta sian verestä, elimistä tai eritteistä, ja sen vasta-aineita voidaan todeta sian seerumista. [1.]

PRRSV-tartunnan ehkäisyssä tärkeintä on estää viruksen maahantuonti eläinten tai siemennesteen mukana. Tärkeää on myös henkilösuojainten käyttö sairastuneiden eläinten käsittelyssä. Virus säilyy pitkään sikaloissa, joissa on taudille herkkiä eläimiä, kuten porsaita tai ostoeläimiä. Taudin poistaminen sikalasta on haastavaa. Taudin poistamiseksi sikalasta täytyy joko hävittää kaikki siat tai poistaa tartunnan saaneet siat. Jos vain tartunnan saaneet siat hävitetään, täytyy kaikki terveet siat tutkia viruksen ja sen vasta-aineiden varalta. [2, s. 341.]

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli käyttöönottaa reaaliaikainen *multiplex* RT-PCR (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction*) -menetelmä PRRS-virukselle ja sen jälkeen validoida tämä käyttöönotettu menetelmä. Reaaliaikainen *multiplex* RT-PCR-menetelmä nopeuttaa testin tekoa ja parantaa sen sensitiivisyyttä. Menetelmä mahdollistaa myös eri PRRS-viruskantojen erottamista toisistaan. PRRS-viruksen suuren geneettisen diversiteetin takia luotettavan menetelmän luominen on haastavaa, mutta useiden alukkeiden käyttäminen yhtäaikaaisesti parantaa menetelmän tarkkuutta ja herkkyyttä.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa Virologian tutkimusyksikössä Helsingin Viikissä. Elintarviketurvallisuusviraston laboratoriopalvelut tuottavat palveluita sekä viranomaisille että yksityisille henkilöille. Laboratorioissa tehdään erilaisia tutkimuksia niin eläimistä, kasveista, rehuista kuin elintarvikkeistakin. Eviran laboratorioissa osallistutaan kansainväliseen tutkimukseen ja yhteistyöhön eri maiden kanssa. Eviran laboratoriot toimivat myös vertailulaboratoriona muun muassa eläin- ja kasvitautitutkimusten aloilla. [3.]

Eviran laboratoriotoiminta noudattaa standardin ISO/IEC 17025 mukaista laatu- ja toimintajärjestelmää. Kansainvälisten kriteerien mukaisella arvioinnilla ja akkreditoinnilla osoitetaan ja varmistetaan laboratoriotoiminnan pätevyys sekä tulosten oikeellisuus. Akkreditoinnin on myöntänyt FINAS-akkreditointipalvelu. FINAS:in suorittamat akkreditoinnit ovat EU-asetusten sekä eurooppalaisten ja kansainvälisten tunnustamissopimusten mukaisia. [3.]

2 Teoria

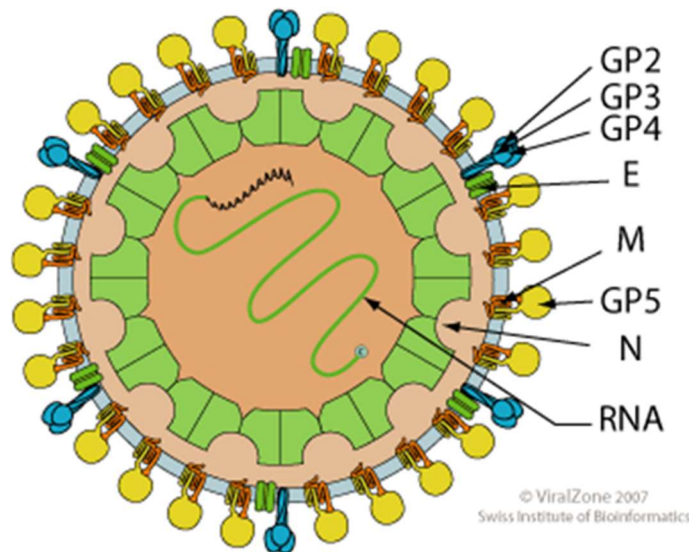
2.1 PRRS-tauti

PRRS-tauti on maailmanlaajuisesti esiintyvä ja taloudellisesti merkittävä sikojen virus-tauti. Oireina emakoilla ovat aluksi ruokahaluttomuus, vaikeutunut hengitys, lievä kuume ja satunnaisesti ihon tummumista. Alkuvaiheen jälkeen esiintyy tiinehtymättömyyttä, sikiöiden muumioitumista, luomisia, ennenaikaisia porsimisia ja heikkojen porsaiden syntymistä. Karjuilla ja lihasioilla voi esiintyä lieviä hengitystieoireita. PRRS-taudin aiheuttava virus voi tarttua sekä kesy- että villisikoihin. Suomen eläintautilainsäädännön mukaan PRRS kuuluu lakisääteisesti vastustettaviin, valvottaviin eläintauteihin ja Maailman eläintautijärjestölle (OIE) ilmoitettavien eläintautien luetteloon. Suomessa tautia ei ole koskaan todettu. [1.]

Ensimmäinen havainto PRRS-viruksesta on Yhdysvalloista vuodelta 1987, jolloin sioissa havaittiin muun muassa lisääntymishäiriöitä, keuhkotulehduksia ja kuolleisuutta. Tämän jälkeen samankaltaisia oireita todettiin sioissa vuonna 1991 Saksassa, ja vuosina 1991—1992 tauti oli levinnyt jo laajalti Manner-Eurooppaan. [2, s. 339.]

PRRS-virus kuuluu *Nidovirales*-lahkon *Arteriviridae*-heimon *Arterivirus*-sukuun. Nidovirukset ovat vaipallisia, ja niillä on yksijuosteinen, positiivisen orientaation RNA-genomi. *Arteriviridae*-heimon virukset ovat huomattavasti pienempiä kuin muut nidovirukset. Arteriviruksia esiintyy sikojen lisäksi muun muassa hevosilla (Equine Arteritis Virus) ja apinoilla (Simian Haemorrhagic Fever Virus). [2, s. 339-340.] PRRS-virus on pyöreä ja kooltaan 45—70 nm, ja sen sisältämä lineaarinen RNA-genomi on noin 15 kb (kiloemästä). Virusgenomi sisältää kymmenen avointa lukukehystä (ORF, open reading frame), jotka

voidaan kääntää proteiineiksi. Genomia ympäröi kapsidi, ja sillä on kaksikerroksinen nukleokapsidiproteiinikuori. Kapsidin ydintä ympäröi lipidikalvo, johon proteiinit ovat uppoutuneet. Lipidivaippa sisältää seitsemästä eri rakenneproteiinia (kuva 1). GP-5 ja M-proteiineja pidetään viruksen tärkeimpinä rakenneproteiineina, ja ne sisältävät lähes puolet virusproteiinin määrästä. Nämä kaksi proteiinia muodostavat viruksen vaipan pinnalla heterodimeerirakenteen ja kolme pienempää proteiinia GP-2, GP-3 ja GP-4 heterotrimeerirakenteen. [4].



Kuva 1. Kuva esittää arteriviruspartikkelia, jossa näkyvät viruksen seitsemän eri rakenneproteiinia [5].

PRRS-viruksesta on löydetty kaksi eri geneettistä päätyyppiä, eurooppalainen ja pohjoisamerikkalainen [2, s.339, 341]. Näiden tyyppien emäsjärjestyksien yhtäläisyyden on todettu olevan vain noin 55—70 prosenttia. Tämän takia on ehdotettu, että ne olisivat omia lajejaan [6]. EU-tyyppi jaetaan edelleen alatyyppeihin 1—4 ja NA-tyyppi yhdeksään eri haaraan (lineage) [7]. Eurooppalaisten ja pohjoisamerikkalaisten PRRSV-kantojen aiheuttamat kliiniset oireet ovat yleensä kuitenkin samankaltaisia. Tosin vuonna 2006 Kiinassa ja Vietnaminassa todettiin PRRSV:n NA-tyypin HP-kannan aiheuttama vakavaoireinen verenvuotokuumeena ilmenevä tautimuoto [8].

2.2 RT-PCR ja reaaliaikainen PCR

RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) on yksi PCR-reaktiotyyppi, jolla monistetaan RNA:ta. Tällä menetelmällä voidaan tutkia viruksen läsnäoloa muun muassa sian seerumissa ja elinsuspensiossa. RT-PCR-reaktiossa RNA:sta valmistetaan ensin yksijuosteinen cDNA käänteistranskriptaasilla ennen varsinaista PCR-reaktiota, ja tämän jälkeen kaksijuosteinen cDNA. Tämän jälkeen voidaan suorittaa normaali PCR-reaktio. RT-PCR-reaktio tehdään yhdessä reaktioseoksessa eli RNA:n muokkaus cDNA:ksi sekä itse PCR-reaktio tapahtuvat samassa putkessa. [9, s.154,170.]

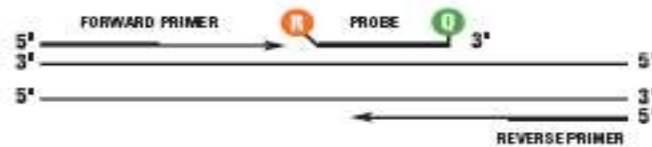
Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikaisessa PCR -menetelmässä monistettu tuote havaitaan ja mitataan reaktion edetessä eli reaaliajassa. Reaaliaikainen havaitseminen perustuu reaktiossa mukana olevan fluoresoivan molekyylin käyttöön. Tämä molekyyli sitoutuu valmiiseen PCR-tuotteeseen ja lähettää fluoresoivaa signaalia, jonka voimakkuus kertoo DNA:n määrän. [10, s.2.]

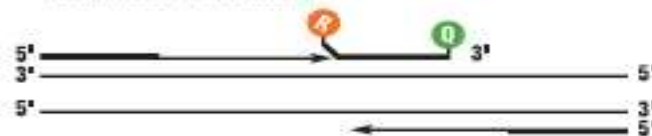
Reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa tekniikkana käytetään joko erilaisia fluoresoivia tunnistimia eli koettimia tai dsDNA:han sitoutuvaa väriä (SYBR green). Esimerkkinä voidaan käyttää muun muassa TaqMan-kemiaan perustuvia hydrolyysikoettimia. TaqMan-tunnistin sisältää kaksi erilaista leimaa: vahvasti fluoresoivan reportterin sekä fluoresoimattoman sammuttajan. Tämä tunnistin sitoutuu PCR-reaktion aikana templaattiin alukkeiden väliselle alueelle. DNA-polymeraasientsyymien rakentaessa uutta juostetta koetin pilkkoutuu 5'→3'-eksonukleiiniaktiivisuuden ansiosta. Samalla sammuttaja irtoaa reportterista, jolloin se ei pysty enää vaimentamaan reportterin fluoresoivaa signaalia. Tätä fluoresenssin lisääntymistä detektoidaan reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa [11, s. 9—12]. Reporttereina voidaan käyttää esimerkiksi 6FAM-leimaa ja sammuttajana BHQ1-leimaa (Black Hole Quencher 1). TaqMan-koettimen toiminta on havainnollistettu kuvassa 2.

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

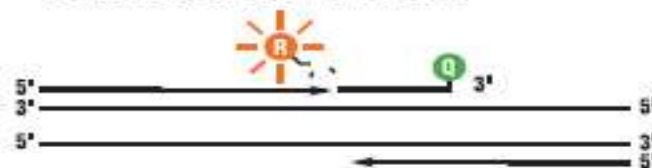
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



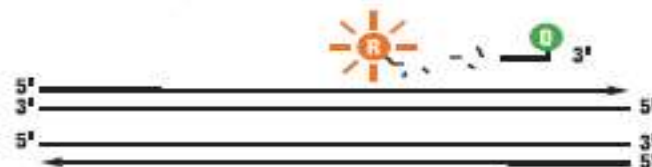
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



Kuva 2. Kuvassa esitetty TaqMan-koettimen toimintaperiaate [12].

2.3 Multiplex- ja monoplex-reaktiot

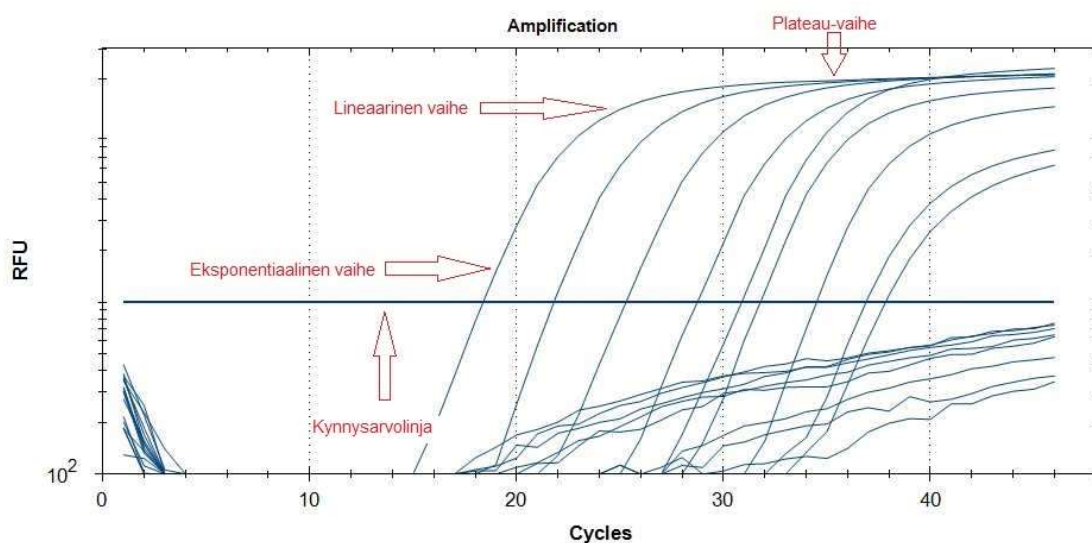
Multiplex-reaktiossa on mahdollista monistaa useaa eri viruskanta yhdessä samassa reaktiossa, kun taas *monoplex*-reaktiossa monistetaan vain yhtä tiettyä virusta. *Multiplex*-reaktiot sisältävät myös useamman kuin yhden aluke-koetin -yhdistelmän. Kuten *monoplex* -reaktioissa, *multiplex*-reaktiossakin riittää yksi Master Mix testin suorittamiseen. *Monoplex*-reaktioita käytetään yhä haastavien virusten tutkimisessa, mutta *multiplex*-reaktiot yleistyvät niiden tehokkuutensa ja hyvien ominaisuuksien (lista alla) ansiosta.

- Lähtömateriaalin ei tarvitse riittää parhaassa tapauksessa kuin yhteen reaktioon.
- *Multiplex*-reaktioiden käyttö vähentää vääriä negatiivisia tuloksia, kun jokaisesta näytteestä monistetaan kontrollialue.
- Usean kohteen monistaminen yhdessä reaktiossa lisää tehokkuutta ja vähentää kustannuksia.
- Kontaminaatoriski pienenee, kun näytteenkäsittely minimoidaan. [13, s.9.]

Multiplex-reaktioiden optimointi on tärkeää, sillä reaktiot saattavat olla osaltaan haastavia. Mitä enemmän reaktiossa on monistettavia kohteita, sitä haastavammaksi se tekee reaktion. Optimoinnin seurauksena jokaisen *multiplex*-reaktiossa tapahtuvan yksittäisreaktion tulee olla riittävän tehokas, jotta menetelmää on kannattava käyttää. Jos reaktiossa on alukkeita, jotka ovat komplementaarisia keskenään, voi reaktiossa syntyä primer-dimer-yhdistelmiä. Primer-dimer-yhdistelmät havaitaan epämääräisenä monistumisena, jolloin monistumiskäyrässä ei havaita kunnollista eksponentiaalista aluetta.

2.4 Reaaliaikaisen PCR-menetelmän tulosten analysointi

Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä tuloksia tulkitaan PCR-ajon aikana muodostuvasta kuvaajasta. Kuvaajalle muodostuvat käyrät (kuva 3) voidaan jakaa kolmeen eri vaiheeseen: eksponentiaaliseen, lineaariseen ja plateau eli tasaantumisvaiheeseen. Eksponentiaalinen vaihe on kuitenkin tärkein tulosten tulkinnan kannalta, sillä tässä vaiheessa DNA:n monistuminen on tehokkainta.



Kuva 3. Kuvassa on esitetty monistuskäyrän eri vaiheet kuvaajalla sekä kynnysarvolinja (*Threshold*). Kuvaajassa näkyy fluoresenssikäyrät PRRS-viruksen Lelystad kannan laimennussarjasta.

PCR-ajon tulokset saadaan Ct-arvoina (*Threshold cycle number*). Ct-arvo on syklin kohta, jossa monistuskäyrä leikkaa kynnysarvolinjan (*Threshold-line*). Ct-arvo määrittää suhteellisesti monistuneen DNA:n pitoisuuden PCR-reaktiossa. On kuitenkin todettu muidenkin tekijöiden vaikuttavan Ct-arvon suuruuteen, muun muassa Master Mixin komponentit ja reaktion tehokkuus saavat Ct-arvon muuttumaan. [13.]

Kynnysarvo-linja (*Threshold*) asetetaan monistuskäyrän eksponentiaaliselle alueelle. Yleensä PCR-laitteen tietokoneohjelmisto asettaa kynnysarvolinjan automaattisesti suosituisaan kohtaan. Kynnysarvolinjan voi myös asettaa kuvaajalle manuaalisesti, jos samaa kynnysarvolinjaa halutaan käyttää usealla näytteellä.

2.5 Validointi

Validointi on varmentamista, jolla arvioidaan laitteen tai menetelmän soveltuvuutta tiettyyn käyttötarkoitukseen. Validoitaville parametreille tuotetaan vertailuarvoja, joilla validoitavaa kohdetta arvioidaan. Validoinnille asetettavat vaatimukset vaihtelevat menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan, ja ne määritetään aina tapauskohtaisesti. Kaikki viralliset menetelmät käyvät läpi validointiprosessin ennen niiden käyttöönottoa. [14.] Eivirassa käytetyt diagnostiset menetelmät ovat validoitu standardin ISO/IEC 17025 laatu- ja toimintajärjestelmän ohjeiden mukaan.

Validointi vaatii validointisuunnitelman luomista. Suunnitelmassa määritetään validoitavan menetelmän käyttötarkoitus, matriisit sekä käyttölaajuus. Suunnitelmasta olisi hyvä löytyä myös toimenpideohje positiivisten tulosten varalta. [14.] Mittaukset suoritetaan huolellisesti ja saaduista tuloksista lasketaan arvot määritettäville parametreille. Saatuja tuloksia verrataan luotettavaan referenssimenetelmään, jos sellainen on käytössä.

2.5.1 Sensitiivisyys, spesifisyys, tarkkuus ja selektiivisyys

Menetelmän sensitiivisyys eli herkkyys kertoo menetelmän kyvystä erottaa näytteestä pienetkin pitoisuudet tutkittavasta kohteesta. Spesifisyys kertoo taas menetelmän kyvystä erottaa määritettävä kohde matriisista. Menetelmän tarkkuus määritetään esimerkiksi vertailemalla kahta referenssimenetelmää ja niiden antamia tuloksia. Tarkkuuden voidaan todeta olevan riittävä, jos validoitavalla menetelmällä saadaan yhtäläiset tulokset referenssimenetelmän kanssa.

Arvot sensitiivisyydelle, spesifisyydelle ja tarkkuudelle lasketaan taulukon 1 ja kaavojen 1,2, ja 3 mukaan.

Taulukko 1. Laskentataulukko sensitiivisyydelle, spesifisyydelle ja tarkkuudelle.

| Validoitavan menetelmän tulos/ odotettu tulos | + | - |
|---|---|---|
| + | a | b |
| - | c | d |

a = niiden näytteiden lukumäärä, jotka ovat positiivisia molemmilla menetelmillä

b = niiden näytteiden lukumäärä, jotka ovat positiivisia validoitavalla menetelmällä, mutta negatiivisia referenssimenetelmällä

c = niiden näytteiden lukumäärä, jotka ovat negatiivisia validoitavalla menetelmällä, mutta positiivisia referenssimenetelmällä

d = niiden näytteiden lukumäärä, jotka ovat negatiivisia molemmilla menetelmillä

$$\text{Sensitiivisyys} = a/(a + c) \quad (1)$$

$$\text{Spesifisyys} = d/(d + b) \quad (2)$$

$$\text{Tarkkuus} = a + d/(a + b + c + d) \quad (3)$$

Menetelmän selektiivisyydellä tarkoitetaan sitä, kuinka hyvin menetelmällä voidaan määrittää tutkittava komponentti monikomponenttisestä näytteestä, niin etteivät näytteen sisältämät muut komponentit häiritse analyysiä.

2.5.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Menetelmän toistettavuudella arvioidaan eroavaisuutta rinnakkaisten mittaustulosten välillä. Toistettavuus määritetään eri pitoisista näytteistä useilla rinnakkaismittauksilla. Mittauksen tekijä, reagenssit ja laitteet täytyvät pysyä samana, jotta menetelmän toistettavuutta voidaan arvioida.

Uusittavuudella arvioidaan työskentely-ympäristön ja eri tekijöiden vaikutuksia menetelmän luotettavuuteen. Uusittavuus määritetään esimerkiksi kolmen eri tekijän rinnakkaismittausten tuloksista.

Toistettavuuden ja uusittavuuden arviointi tapahtuu variaatiokerroimen avulla. Variaatiokerroin kertoo tulosten eroavaisuuden prosenttilukuna. Menetelmää voidaan pitää luotettavana, jos variaatiokerroin on alle 5 prosenttia. Mitä suurempi kerroin, sitä enemmän tulokset eroavat toisistaan. Variaatiokerroin lasketaan kaavan 4 mukaan.

$$CV(\text{variaatiokerroin}) = \left(\frac{\text{keskihajo}}{\text{keskiarvo}} \right) \times 100 \% \quad (4)$$

Menetelmän uusittavuutta voidaan arvioida myös tilastollisen testin avulla. Testinä käytetään ANOVA:a (*Analysis of Variance*). Tilastollisella testillä testataan tulosten tilastollista merkitsevyyttä. Ennen testin tekemistä luodaan nollahypoteesi ja vaihtoehtoinen hypoteesi. Tilastollisen testin suoritus perustuu testisuureeseen, joka mittaa nollahypoteesin ja havaintojen yhteensopivuutta. Testin p-arvo on pienin merkitsevyystaso, jolla nollahypoteesi voidaan hylätä. Jos nollahypoteesi hylätään, niin tulosten välillä on tilastollisesti merkitsevä ero.

3 Materiaalit ja työn suoritus

3.1 Laitteistot, materiaalit ja reagenssit

Työssä käytetyt laitteet, materiaalit ja reagenssit löytyvät taulukoista 2 ja 3.

Taulukko 2. Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit.

| | Valmistaja | Tuotenumero | Käyttötarkoitus |
|-----------------------------------|------------|-------------|--------------------|
| RNA:n eristys | | | |
| QIAamp Viral RNA Mini Kit (250) | Qiagen | 157024239 | RNA käsinpuhdistus |
| Realtime RT-PCR Master Mix | | | |
| OneStep RT-PCR Kit | Qiagen | | Master Mix |
| Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 5x | Qiagen | 157024919 | Master Mix |
| dNTP-Mix | Qiagen | 157040001 | Master Mix |
| OneStep Enzyme Mix | Qiagen | 157056751 | Master Mix |
| Rnase Inhibitor | AB | 566718 | Master Mix |
| PCR-ajo | | | |
| Bio-Rad CFX96 Touch | Bio-Rad | - | PCR-ajon suoritus |
| Eppendorf Centrifuge 5810 | Bio-Rad | - | Sentrifugointi |

Taulukko 3. Työssä käytetyt alukkeet ja koettimet sekä niiden sekvenssit.

| | Valmistaja | Tuotenumero | Sekvenssi |
|-------------------------------------|-------------------|---------------|---|
| Alukkeet ja niiden laimennos | | | |
| RNAase-Free Water | Qiagen | 1012888 | - |
| PRRS-EU F | Metabion Oligomer | 180301X029H03 | 5'-GCACCACCTCACCCRRAC-3' |
| PRRS-EU R | Metabion Oligomer | 180301X029H04 | 5'-CAGTTCCTGCRCCYTGAT-3' |
| PRRS-EU Koetin (FAM) | Metabion Oligomer | 180228X042G07 | 5'-6-FAM-CCTCTGYTGAATCGATCCAGAC-BHQ1-3' |
| PRRS-EU2 F | Metabion Oligomer | 180301X029H05 | 5'-CAGATGCAGAYTGTGTTGCCT-3' |
| PRRS-EU2 R | Metabion Oligomer | 180301X029H06 | 5'-TGGAGDCCTGCAGCACTTTC-3' |
| PRRS-EU2 Koetin (FAM) | Metabion Oligomer | 180228X042G08 | 5'-6-FAM-ATACATTCTGGCCCCTGCCAYCACGT-BHQ1-3' |
| PRRS-NA F | Metabion Oligomer | 180301X029H07 | 5'-ATRATGRGCTGGCATTTC-3' |
| PRRS-NA R | Metabion Oligomer | 180228B056G03 | 5'-ACACGGTCGCCCTAATTG-3' |
| PRRS-NA Koetin (HEX) | Metabion Oligomer | 180404X008F10 | 5'-HEX-TGTGGTGAATGGCACTGATTGACA-BHQ2-3' |

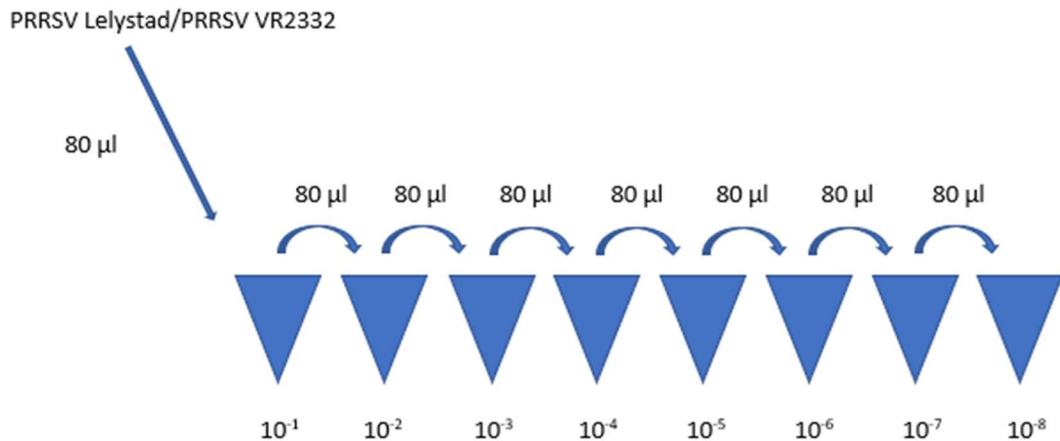
3.2 Näytteiden esikäsittely

Tässä työssä näytteinä käytettiin PRRS-viruksesta tehtyjä viruslaimennussarjoja (PRRSV Lelystad ja PRRS VR2332). Näillä nukleaasivapaaseen veteen tehdyillä laimennussarjoilla (10^{-1} — 10^{-8}) testattiin menetelmän toimivuus käyttöönoton yhteydessä. Validointinäytteinä käytettiin vuoden 2018 PRRSV-vertailututkimusnäytteitä (taulukko 4) sekä neljään eri matriisiin tehtyjä viruslaimennussarjoja. Viruslaimennussarjat tehtiin PRRSV Lelystad- ja PRRSV VR2332-kannoista sian seerumiin, elinsuspensioon, siemennesteeseen sekä solujen elatusaineeseen. Jokaiseen matriisiin tehtiin molemmista viruskannoista laimennussarja 10^{-1} — 10^{-8} . Matriisit jaettiin yhdeksään erään. Kahdeksaa erää käytettiin laimennussarjan tekoon ja yhtä käytettiin negatiivisena kontrollina RNA:n eristyksessä sekä PCR-ajoissa. Vertailututkimusnäytteet liuotettiin nukleaasivapaaseen veteen.

Taulukko 4. Hollantilaisen kaupallisen GD B.V. Animal Health Service Ltd. Deventerin lähettämät vertailututkimusnäytteet.

| Sample number | Origin |
|---------------|---|
| #1 | PRRSV field sample EU positive |
| #2 | PRRSV negative serum from SPF farm |
| #3 | Porcilis PRRSV life vaccine, EU strain, 10-4 dilution in negative porcine serum |
| #4 | PRRSV field sample EU-strain |
| #5 | Ingelvac PRRSV MLV, US strain 10-5 dilution in PRRSV negative porcine serum |
| #6 | PRRSV field sample EU-strain |
| #7 | Ingelvac PRRSV MLV, US strain 10-4 dilution in negative porcine serum |
| #8 | PRRSV field sample US-strain |

Laimennussarjat valmistettiin kuvassa 4 näkyvällä tavalla, jossa esimerkkinä elinsuspensiosta tehty laimennussarja. Laimennussarjan 10^{-1} -laimennokseen lisättiin tietty määrä elävää virusta, joka suspensoitiin matriisiin. Tästä laimennoksesta otettiin pois sama tilavuus matriisiin suspensoitua virusta kuin virusta oli siihen lisätty, ja suspensoitiin se seuraavaan laimennosputkeen. Näin jatkettiin 10^{-8} -laimennokseen asti. Kolme muuta laimennussarjaa tehtiin samalla lailla kuin elinsuspension laimennussarja, muuttamalla vain lisättävän viruksen tilavuutta. Sian seerumiin lisättiin 50 µl, siemennesteeseen 40 µl ja elatusaineeseen 100 µl virusta. Tehdyt laimennussarjat jaettiin kolmeen 160 µl:n erään, joista kaikista tehtiin RNA:n eristys.



Jokainen putki sisältää 720 µl sian elinsuspensiota.

Kuva 4. Esimerkki tehdystä laimennussarjasta.

3.3 RNA:n eristys

RNA:n eristys sekä vertailututkimusnäytteistä että validointimatriiseista tehtiin QIAamp Viral RNA Mini -kitillä (Qiagen, 157024239), kitin ohjeen mukaan. Eristykset sekä vertailututkimusnäytteistä että validointimatriiseista suoritettiin turvalaboratoriossa viruksen kontaminaatioherkkyyden vuoksi.

Eristykset tehtiin kymmenen putken sarjoissa, niin että kerralla eristettiin yhteen matriisiin tehty laimennussarja. Tällä menettelyllä vältettiin liiallisesta näytemäärästä mahdollisesti aiheutuvia sekaannuksia. Eristyksessä oli aina myös mukana laimennussarjan lisäksi negatiivinen sekä positiivinen kontrolli, joilla varmistettiin eristyksen onnistumista. Vertailututkimusnäytteiden eristyksessä oli mukana ainoastaan negatiivinen kontrolli, joka tässä tapauksessa oli nukleaasivapaa vesi. Validointimatriisien eristyksessä negatiivisena kontrollina toimi aina eristettävä näytematriisi ja positiivisena kontrollina IBR-virus (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*). RNA:n eristys tehtiin 140 µl:sta näytettä, jolloin eristetyn RNA:n lopputilavuudeksi saatiin 30 µl.

3.4 Menetelmän käyttöönotto

Menetelmän käyttöönotto aloitettiin testaamalla menetelmää alkuperäisjulkaisun ohjeen mukaan [7]. Alkuperäisjulkaisussa PRRS-viruksen RNA:n monistamiseen oli käytetty kolmea eri alukeparia sekä koetinta. Näistä kolmesta alukeparista kahdella alukeparilla monistettiin PRRS (EU) -virusta ja yhdellä alukeparilla PRRS (NA) -virusta. EU2-alukepari ja -koetin lisättiin testiin, sillä EU-tyypin on todettu muuntelevan geneettisesti vielä enemmän kuin NA-tyypin. EU-alukkeet ja -koetin on kohdennettu PRRSV:n genomien nukleokapsidiproteiinia (N) koodaavaan ORF7-alueeseen, EU2-alukkeet ja -koetin glykosyloimatonta membraaniproteiinia koodaavaan ORF6-alueeseen ja NA-alukkeet ja -koetin ORF7- ja ei-koodaavaan 3'-pään alueeseen (3'UTR). [7.] Käyttöönotto sisälsi Master Mixin sekä lämpötilaprofiilin testaamisen alukkeiden ja koettimien testaamisen lisäksi.

3.4.1 Alukkeiden ja koettimien liuottaminen ja laimentaminen

Laimennokset alukkeista ja koettimista tehtiin alkuperäisjulkaisun ohjeen mukaan [7]. Työn tarkoituksena oli saada kaikki kolme aluke-koetinyhdistelmää toimimaan samassa reaktioputkessa. Ensiksi oli kuitenkin testattava alukkeiden ja koettimien toimivuus omina yksittäisinä seoksinaan. Laimennokset tehtiin niin, että EU-alukkeet ja -koetin olivat yhdessä seoksessa, EU2-alukkeet ja -koetin yhdessä sekä NA-alukkeet ja -koetin yhdessä (taulukko 5).

Taulukko 5. Taulukossa on esitetty EU-, EU2- ja NA-aluke-koetin -seokset.

| | Aluke F (pmol/μl) | Aluke R (pmol/μl) | Koetin (pmol/μl) |
|------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| EU | 20 | 20 | 6,25 |
| EU2 | 20 | 20 | 6,25 |
| NA | 20 | 20 | 6,25 |

3.4.2 Käyttöön otetun menetelmän testaaminen

Käyttöön otettu menetelmä testattiin ennen validointia PRRS-viruksesta tehdyillä laimennussarjoilla (PRRSV Lelystad ja PRRSV VR2332). Testissä oli mukana myös negatiivinen kontrolli, jonka avulla varmistettiin testin onnistuminen ilman kontaminaatiota.

Laimennussarjan kaikista laimennoksista eristetyistä RNA:sta tehtiin reaaliaikainen *multiplex* RT-PCR -ajo käyttäen Bio-Radin CFX96 Touch -laitetta (Bio-Rad). Testiin käytettiin OneStep RT-PCR -kittiä, jonka Master Mix on taulukon 6 mukainen. Taulukossa 7 on esitetty reaaliaikaisen *multiplex* RT-PCR:n lämpötilaprofiili.

Taulukko 6. OneStep RT-PCR -kitin PCR-reaktioseos.

| PCR-reaktio seos | |
|--|--------------|
| Sigma-aqua | 9,8 µl |
| OneStep RT-PCR Buffer 5x | 5,0 µl |
| dNTP Mix (10 mM) | 1,0 µl |
| OneSTEP RT-PCR Enzyme Mix | 1,0 µl |
| RNAse inhibiittori (20 U/µl) | 0,2 µl |
| PRRS EU aluke-koetin mix (F ja R 20 µM, koetin 6,25 µM) | 1,0 µl |
| PRRS EU2 aluke-koetin mix (F ja R 20 µM, koetin 6,25 µM) | 1,0 µl |
| PRRS NA aluke-koetin mix (F ja R 20 µM, koetin 6,25 µM) | 1,0 µl |
| Yhteensä | 20 µl |

Taulukko 7. Reaaliaikaisen *multiplex* RT-PCR -ajon lämpötilaprofiili.

| Lämpötilaprofiili | Lämpötila ja aika |
|---|-------------------|
| Vaihe 1: Käänteistranskriptio | 50 °C 30 min |
| Vaihe 2: Entsyymien aktivoituminen (hot start) | 95 °C 15 min |
| Vaihe 3: Denaturaatio | 94 °C 1 min |
| Vaihe 4: Yhdistetty alukkeiden liittymisvaihe sekä ekstensiovaihe | 60 °C 1 min |
| Vaihe 5: Fluoresenssin mittaaminen | |
| Vaihe 6: Paluu vaiheeseen 3, 45 kertaa | |

3.5 Menetelmän validointi

Menetelmän validointi aloitettiin, kun menetelmä oli todettu toimivaksi. Tässä työssä validoitavat parametrit olivat spesifisyys, sensitiivisyys, tarkkuus ja selektiivisyys sekä toistettavuus ja uusittavuus. Validointinäytteet ajettiin matriisi kerrallaan, jolloin jokaisessa PCR-ajossa oli laimennussarjat molemmista viruskannoista tietyssä matriisissa.

PCR-reaktioiden teko aloitettiin Master Mixin valmistuksella. Master Mixit valmistettiin laminaarikaapissa omassa puhtaassa tilassaan. Kaikki reagenssit pidettiin jäällä, ja PCR-levy kylmäblokissa koko reaktioseoksen valmistuksen ajan. Jokaiseen tarvittavaan kuoppaan pipetoitiin 20 µl valmista Master Mixiä, ja ajossa negatiivisena kontrollina käytetty nukleaaasivapaa vesi pipetoitiin tässä vaiheessa omaan kuoppaansa.

PCR-reaktioseoksen valmistuksen jälkeen siirryttiin seuraavaan tilaan, jossa näytteet pipetoitiin PCR-levylle. Näytettä sisältävä eppendorf-putki avattiin varovasti liekitetyllä eppendorf-putkenavaajalla ja näytettä sekoitettiin pipetin avulla 10 kertaa. Tämän jälkeen näytettä pipetoitiin kuoppaan 5 µl ja sekoitettiin se hyvin Master Mixiin. Levy suljettiin huolellisesti kansiteipillä ja sentrifugoitiin muutaman sekunnin ajan, jonka jälkeen mittaus voitiin suorittaa. Kaikki laimennossarjat tehtiin tämän kaavan mukaan.

Testin spesifisyys, sensitiivisyys ja tarkkuus tutkittiin vertailututkimusnäytteillä. Validoinnissa menetelmän selektiivisyyttä tutkittiin muilla sioilla esiintyvillä RNA-viruksilla, sekä samankaltaisia oireita (lisääntymis- ja hengitystieoireet) aiheuttavilla viruksilla. Tällä varmistettiin, etteivät käytetyt alukkeet tartu muihin viruksiin ja monista näistä DNA:ta, jolloin menetelmä voisi antaa vääriä positiivisia tuloksia. Alkuperäisjulkaisun mukaan testi toteaa spesifisesti PRRSV:n [7]. Julkaisussa oli mukana 13 PRRSV-kantaa. Kannoista yhdeksän oli EU-tyyppiä, ja ne olivat peräisin Saksasta, Liettuasta ja Valko-Venäjältä ja kattoivat kaikki neljä viruksen nykyistä alatyyppeä. NA-tyypin neljä edustajaa olivat peräisin USA:sta, Kiinasta ja Saksasta.

Validointiin kuului myös toistojen tekeminen yhdestä valitusta matriisista. Toistoilla määritettiin testin toistettavuus ja uusittavuus. Toistot suoritettiin elatusaineeseen tehdyistä laimennussarjoista. Toistoja tehtiin kaiken kaikkiaan viisi niin, että yksi henkilö suoritti

testin kolme kertaa samasta laimennussarjasta ja kaksi muuta henkilöä suorittivat testin omasta laimennussarjastaan yhden kerran.

4 Tulokset

4.1 Menetelmän käyttöönotto

Menetelmän käyttöönottoon sisältyi Master Mix -reaktioseoksen sekä PCR-lämpötilaprofiilin testaaminen ja niiden toteaminen toimiviksi käytetyllä reaaliaikaisella *multiplex* RT-PCR:llä. Kun edellä mainitut asiat olivat todettu toimiviksi, voitiin validointi aloittaa.

4.2 Menetelmän validointi

Validointi aloitettiin mittaamalla kaikki neljään matriisiin (sian seerumi, elinsuspensio, siemenneste ja elatusaine) tehdyt laimennussarjat 10^{-1} — 10^{-8} käyttöönotetulla menetelmällä. Näillä mittauksilla testattiin kaikkien matriisien toimivuus. Mittaustulokset löytyvät taulukosta 8. Tulosten perusteella valittiin myös jatkossa tämän menetelmän PCR-ajoissa käytettävien positiivisten kontrollien pitoisuudet. Positiivisiksi kontrolleiksi valikoitui PRRS Lelystad viruskannan laimennokset 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ja 10^{-6} ja PRRS VR2332 viruskannasta laimennokset 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ja 10^{-5} . Näitä samoja laimennoksia käytettiin myös, kun tutkittiin menetelmän toistettavuutta ja uusittavuutta.

Taulukko 8. Validointimatriiseista tehtyjen mittausten tulokset Ct-arvoina.

| PRRSV Lelystad (FAM) | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Seerumi | 21,10 | 25,86 | 26,55 | 30,01 | 33,30 | 37,03 | 38,89 | |
| Siemenneste | 17,82 | 21,72 | 24,46 | 28,09 | 30,45 | 34,16 | 37,15 | 28,33 |
| Elinsuspensio | 18,49 | 21,36 | 24,62 | 28,63 | 31,10 | 35,36 | 36,58 | |
| Elatusaine | 17,36 | 20,25 | 24,54 | 28,25 | 30,72 | 35,68 | 35,62 | |
| | | | | | | | | |
| PRRSV VR2332 (HEX) | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ |
| Seerumi | 21,29 | 25,48 | 27,88 | 31,30 | 35,29 | 37,54 | | |
| Siemenneste | 20,71 | 23,67 | 27,41 | 31,00 | 35,21 | 39,21 | | |
| Elinsuspensio | 25,17 | 25,43 | 27,97 | 31,24 | 34,92 | | | |
| Elatusaine | 20,41 | 23,24 | 27,07 | 30,99 | 33,24 | | | |

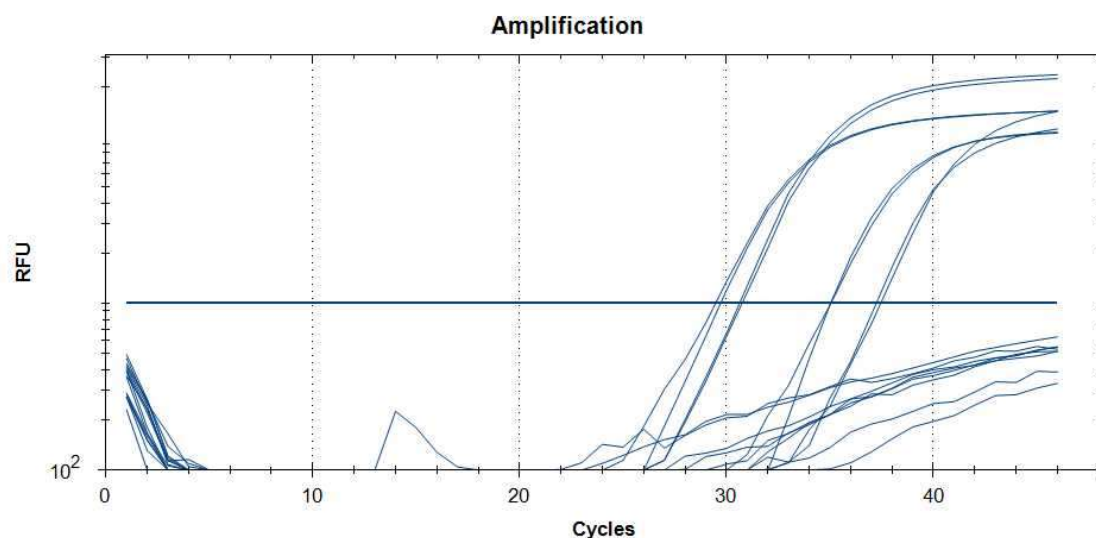
4.2.1 Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus

Sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus määritettiin reaaliaikaisella *multiplex* RT-PCR:llä vuoden 2018 vertailututkimusnäytteiden avulla, jotka sisälsivät sekä PRRSV-positiivisia sekä PRRSV-negatiivisia näytteitä. Referenssimenetelmänä toimi vanha perinteinen PCR-menetelmä. Taulukossa 9 esitetään sekä validoitavalla menetelmällä että referenssimenetelmällä saadut positiiviset sekä negatiiviset tulokset omissa sarakkeissaan. Näytteitä oli kahdeksan, ja ne todettiin kaikki oikein joko positiiviseksi tai negatiiviseksi. Tulokset laskettiin kaavoilla 1-3, jotka löytyvät kohdasta 2.5.1.

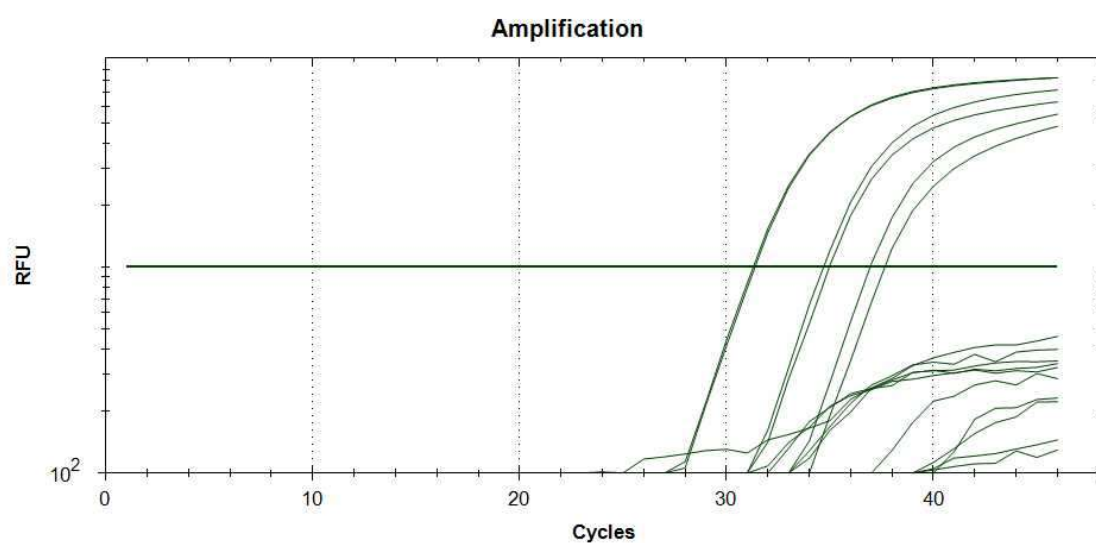
Taulukko 9. Sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus määritettiin kahdella eri menetelmällä vuoden 2018 PRRSV-vertailututkimusnäytteiden avulla.

| Vuosi 2018 | Referenssimenetelmän tulos/saatu tulos | |
|---|--|---|
| | + | - |
| Validoitavan menetelmän tulos/ odotettu tulos | | |
| + | 7 | 0 |
| - | 0 | 1 |
| | | |
| SENSITIIVISYYS (%) | 100 | |
| SPESIFISYYS (%) | 100 | |
| TARKKUUS (%) | 100 | |

Kuvissa 5 ja 6 on esitetty kuvaajat vertailututkimusnäytteistä. Ensimmäisessä kuvassa on FAM-leimalla monistuneet PRRS EU- ja EU2-kannan virukset ja niiden fluoresenssikäyrät. Toisessa kuvassa on HEX-leimalla monistuneet PRRS NA-kannan virukset, ja niistä muodostuneet fluoresenssikäyrät.



Kuva 5. Kuvaajassa näkyy vertailututkimuspaneelin sisältämät Lelystad-kannan PRRSV-positiiviset näytteet. Testissä oli mukana myös negatiivinen kontrolli. Kuvaajassa nähdään kaikista näytteistä kaksi rinnakkaismittausta. Tässä PCR-reaktiossa reporterina toimii FAM-leima. Positiivisten näytteiden antama vaste näkyy eksponentiaalisena käyränä kuvaajalla.

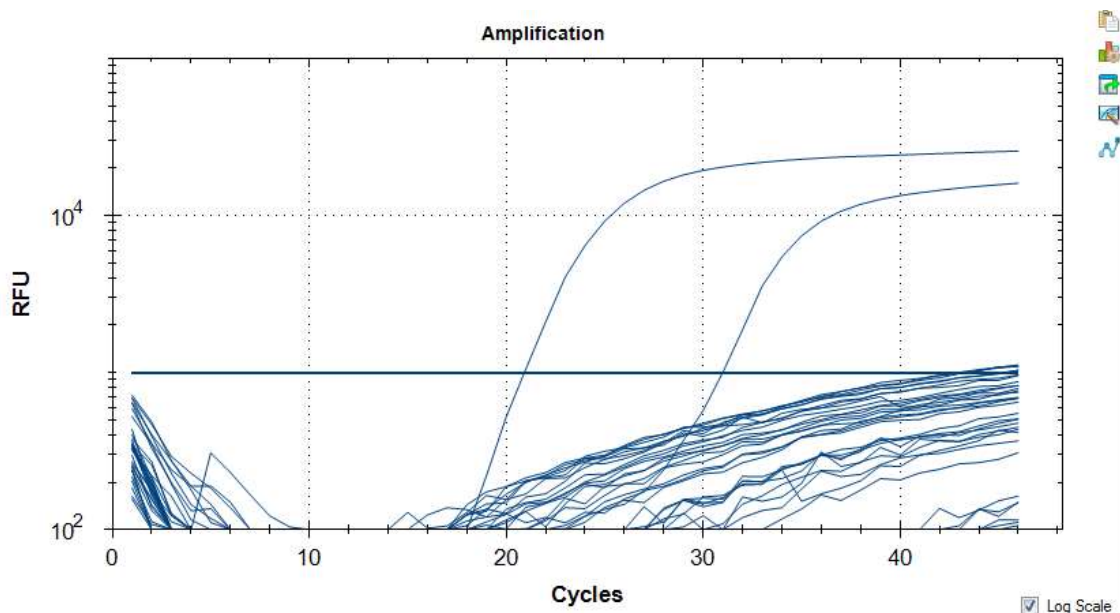


Kuva 6. Kuvaajassa näkyy vertailututkimuspaneelin sisältämät VR2332-kannan PRRSV-positiiviset näytteet. Kuvaajassa nähdään kaikista näytteistä kaksi rinnakkaismittausta. Testissä oli mukana myös negatiivinen kontrolli. Tässä reporterina toimii HEX-leima. Positiivisten näytteiden antama vaste näkyy eksponentiaalisena käyränä kuvaajalla.

4.2.2 Menetelmän selektiivisyys

Menetelmän selektiivisyyttä tutkittiin testaamalla reaaliaikaisella *multiplex* RT-PCR:llä muista sioilla esiintyvistä RNA-viruksista klassinen sikaruttovirus (CSFV, classical swine fever virus), sian influenssa A -virus (SIV, swine influenza virus, A/H1N1/09) ja sian teschovirus (PTV, porcine teschovirus) sekä hengitystie- ja/tai lisääntymisoireita aiheuttavista viruksista afrikkalainen sikaruttovirus (ASFV, African swine fever virus), sian herpesvirus 1 (SuHV-1, Suid herpesvirus 1, syn), Aujeszky tauti -virus (ADV, Aujeszky disease virus), sian parvovirus (PPV, porcine parvovirus) ja sian circovirus tyyppi 2 (PCV-2, porcine circovirus type 2). Lisäksi testissä oli mukana klassisen sikaruttoviruksen kanssa *Flaviviridae*-heimon *Pestivirus*-sukuun kuuluva naudan virusripulivirus tyyppi 1 (BVDV-1, bovine viral diarrhoea virus type 1), joka esiintyy yleisesti kontaminanttina soluviljelyelatusaineissa käytettävissä kaupallisissa naudan seerumivalmisteissa.

Kaikki virukset testattiin samassa RT-PCR-ajossa, ja mukana oli myös PRRS Lelystad- ja PRRS VR2332-viruskannoista laimennetut positiiviset kontrollit (PRRSV Lelystad 10^{-3} ja 10^{-5} ja PRRSV VR2332 10^{-2} ja 10^{-4}). Testi antoi negatiivisen tuloksen kaikista näistä viruksista eikä ristireaktioita käytettyihin sian ja naudan solulinjoihin myöskään todettu (kuva 7). Tulosten perusteella menetelmän selektiivisyys on hyvä, testi monistaa ainoastaan PRRSV-genomia.



Kuva 7. Kuvassa esitetty reaaliaikaisen *multiplex* RT-PCR -reaktion kuvaaja. Tällä testillä määritettiin menetelmän selektiivisyys. Eksponentiaalista monistumista ei tapahtunut kuin positiivisten kontrollien kohdalla. Matalat kynnyksarvolinjan alle jäävät käyrät ovat epäspesifistä monistumista kuten *primer-dimer*-yhdistelmiä.

4.2.3 Menetelmän toistettavuus ja uusittavuus

Menetelmän toistettavuudella tarkoitetaan toistojen välistä eroavaisuutta, kun toistot ovat suorittaneet yksi henkilö. Uusittavuudella taas tarkoitetaan eri tekijöiden toistojen välistä eroavaisuutta. Toistettavuutta ja uusittavuutta tutkittiin matriisilaimennussarjoista saatujen tulosten (Ct-arvot) avulla. Saaduista tuloksista laskettiin sekä tekijän sisäinen variaatiokerroin (CV) että tekijöiden välinen variaatiokerroin. Esimerkkikuvaajat laimennussarjoista on esitetty kuvissa 8 ja 9.

Toistettavuutta arvioitiin yhden matriisin avulla, niin että yksi henkilö teki laimennussarjasta kolme rinnakkaista PCR-ajoa. Näistä rinnakkaisista PCR-ajoista laskettiin tekijän sisäinen variaatiokerroin. Variaatiokerroin oli PRRS Lelystad-viruskannalla 1,18 — 3,02 % (taulukko 10) ja PRRS VR2332-viruskannalla 1,65 — 3,31 % (taulukko 11). Kaksi muuta henkilöä tekivät yhden PCR-ajot, ja näistä ajoista saaduista tuloksista sekä ensimmäisen tekijän kolmesta rinnakkaisesta tuloksesta laskettiin tekijöiden välinen variaatiokerroin, jonka avulla arvioitiin menetelmän uusittavuutta. Tekijöiden välinen

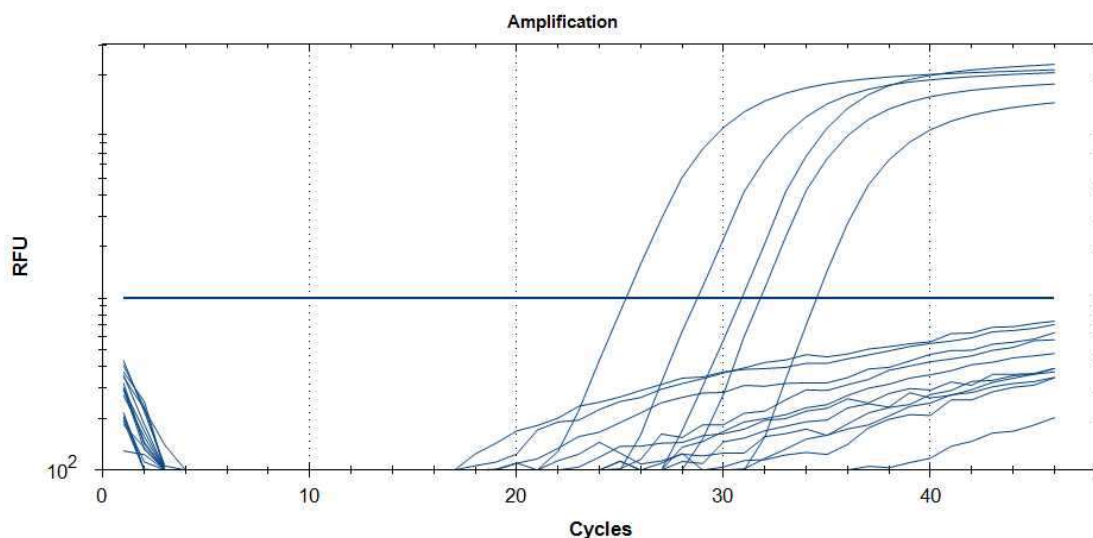
variaatiokerroin oli PRRS Lelystad-viruskannalla 1,86 — 4,72 % (taulukko 10) ja PRRS VR2332-viruskannalla 1,60 — 3,05 % (taulukko 11).

Taulukko 10. PRRSV Lelystad-kannan laimennossarjasta tehdyn PCR-ajon tulokset ja tuloksista lasketut variaatiokertoimet.

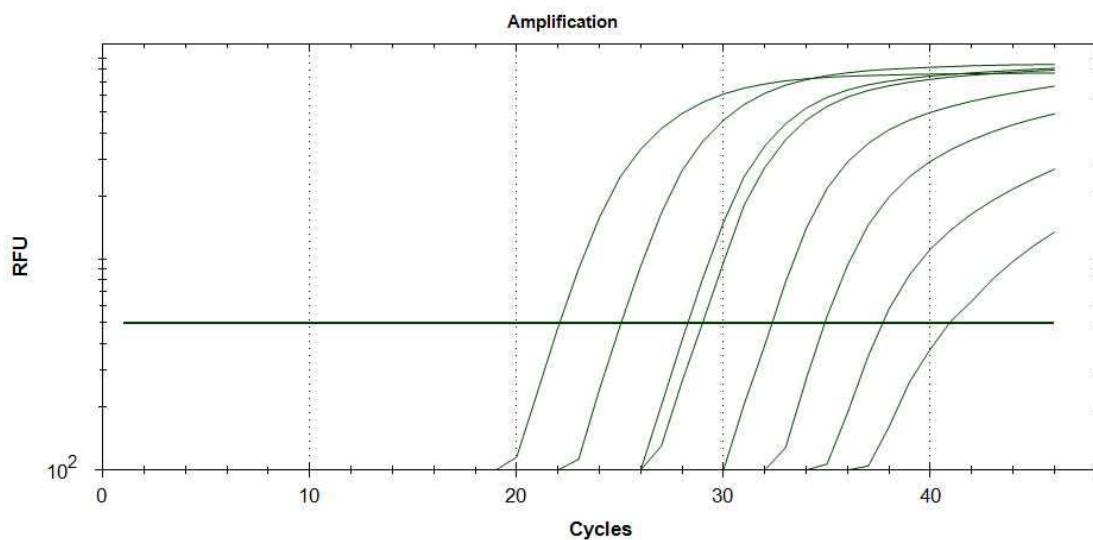
| PPRSV Lelystad Elatusaine (FAM) | Ct-arvo | | | Tekijän si- säinen CV (%) | Ct-arvo | | Tekijöiden välinen CV (%) |
|------------------------------------|----------|-------|-------|---------------------------------|----------|----------|---------------------------------|
| | Tekijä 1 | | | | Tekijä 2 | Tekijä 3 | |
| 10 ⁻³ | 24,54 | 24,90 | 25,16 | 1,25 | 23,69 | 24,16 | 2,39 |
| 10 ⁻⁴ | 28,25 | 28,54 | 29,02 | 1,36 | 26,64 | 27,55 | 3,31 |
| 10 ⁻⁵ | 30,72 | 31,20 | 31,44 | 1,18 | 29,95 | 30,69 | 1,86 |
| 10 ⁻⁶ | 35,68 | 34,91 | 37,05 | 3,02 | 33,03 | 33,45 | 4,72 |

Taulukko 11. PRRSV VR2332-kannan laimennossarjasta tehdyn PCR-ajon tulokset ja tuloksista lasketut variaatiokertoimet.

| PPRSV VR2332 Elatusaine (HEX) | Ct-arvo | | | Tekijän si- säinen CV (%) | Ct-arvo | | Tekijöiden välinen CV (%) |
|----------------------------------|----------|-------|-------|---------------------------------|----------|----------|---------------------------------|
| | Tekijä 1 | | | | Tekijä 2 | Tekijä 3 | |
| 10 ⁻² | 23,24 | 23,46 | 24,11 | 1,92 | 24,04 | 24,04 | 1,68 |
| 10 ⁻³ | 27,07 | 27,23 | 28,05 | 1,91 | 27,25 | 27,89 | 1,60 |
| 10 ⁻⁴ | 30,99 | 31,03 | 31,90 | 1,65 | 29,79 | 31,24 | 2,47 |
| 10 ⁻⁵ | 33,24 | 32,44 | 34,63 | 3,31 | 34,99 | 33,85 | 3,05 |



Kuva 8. Kuvassa on yhden tekijän tekemä laimennussarja PRRSV Lelystad-kannasta (10^{-1} – 10^{-8}) solujen elatusaineeseen. Kuvasta voidaan todeta, että Lelystad-viruskannalla monistumista tapahtuu laimennokseen 10^{-5} asti.



Kuva 9. Kuvassa on yhden tekijän tekemä laimennussarja PRRSV VR2332 kannasta (10^{-1} – 10^{-8}) solujen elatusaineeseen. Kuvasta voidaan todeta, että VR2332-viruskannalla monistumista tapahtuu laimennokseen 10^{-8} asti, joka on kuitenkin epätavallista.

4.3 Menetelmän arviointia tilastollisen testin avulla

Menetelmän uusittavuutta arvioitiin myös tilastollisen testin avulla. Tilastollisena testinä käytettiin ANOVA:aa (Analysis of Variance), jonka avulla vertailtiin toistojen tuloksista laskettujen varianssien eroja, ja katsottiin eroavatko tulokset tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. ANOVA:ssa hypoteeseina käytetään nollahypoteesia ja vaihtoehtoista hypoteesia. Oletamus hypoteeseille on, että nollahypoteesi on totta. Tässä tapauksessa se tarkoittaisi sitä, että tekijöiden väliset keskiarvot ovat yhtä suuret. Nollahypoteesi jää voimaan, jos laskettu p-arvo on suurempi kuin 0,05. Jos nollahypoteesi hylätään, vaihtoehtoinen hypoteesi tulee voimaan, joka tarkoittaa tässä tilanteessa sitä, että tekijöiden saamien tulosten välillä on tilastollisesti merkitsevä ero.

Testi tehtiin kahteen kertaan niin, että ensimmäiseksi testattiin elatusaineeseen tehty laimennussarja PRRSV Lelystad-kannasta. Tämän jälkeen uusittiin testi niin, että saatiin myös tulokset PRRSV VR2332-kannan elatusaineeseen tehdystä laimennussarjasta. Toistoja ei tehty koko laimennussarjasta vaan vain valituista pitoisuuksista (PRRSV Lelystad 10^{-3} – 10^{-6} ja PRRSV VR2332 10^{-2} – 10^{-5}).

Taulukoissa 12 ja 13 on esitetty analysoitavat tulokset. Tulokset analysoitiin Excelin tietojen analysointi -ohjelmalla, jonka jälkeen valmiista tulosteista (kuva 10 ja 11) pääteltiin p-arvon avulla, hylätäänkö nollahypoteesi vai ei.

Taulukko 12. Tässä taulukossa on esitetty ANOVA:lla analysoitavat tulokset (PRRSV Lelystad).

| PRRSV Lelystad | | | |
|----------------|----------|----------|----------|
| | Tekijä 1 | Tekijä 2 | Tekijä 3 |
| Pitoisuus | T1 | T2 | T3 |
| 10^{-3} | 24,87 | 23,69 | 24,16 |
| 10^{-4} | 28,60 | 26,64 | 27,55 |
| 10^{-5} | 31,12 | 29,95 | 30,69 |
| 10^{-6} | 35,88 | 33,03 | 33,45 |
| | | | |

| Anova: kaksisuuntainen ilman toistoa | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------|------------------|------------------|---------------|---------------------|
| | | | | | | |
| <i>YHTEENVETO</i> | <i>Lukumäärä</i> | <i>Summa</i> | <i>Keskiarvo</i> | <i>Varianssi</i> | | |
| 10-3 | 3 | 72,71656 | 24,23885 | 0,350737 | | |
| 10-4 | 3 | 82,7933 | 27,59777 | 0,965351 | | |
| 10-5 | 3 | 91,76319 | 30,58773 | 0,351938 | | |
| 10-6 | 3 | 102,3574 | 34,11912 | 2,362646 | | |
| | | | | | | |
| T1 | 4 | 120,4704 | 30,1176 | 21,35083 | | |
| T2 | 4 | 113,31 | 28,3275 | 16,36669 | | |
| T3 | 4 | 115,85 | 28,9625 | 16,06036 | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| ANOVA | | | | | | |
| <i>Vaihtelun lähde</i> | <i>NS</i> | <i>va</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>P-arvo</i> | <i>F-kriittinen</i> |
| Rivit | 159,8615753 | 3 | 53,28719 | 217,1918 | 1,66E-06 | 4,75706266 |
| Sarakkeet | 6,589266411 | 2 | 3,294633 | 13,4285 | 0,006089 | 5,14325285 |
| Virhe | 1,472077663 | 6 | 0,245346 | | | |
| | | | | | | |
| Yhteensä | 167,9229194 | 11 | | | | |

Kuva 10. Kuvassa esitetty ANOVA:lla saatu data, jonka mukaan arvioidaan, onko tulosten välillä tilastollisesti merkitsevää eroa.

Tulokseksi tästä testissä saatiin p-arvoksi 0,0061, joka on pienempi kuin 0,05. Tällöin voidaan todeta, että nollahypoteesi hylätään. Tämä tarkoittaa sitä, että saaduilla Ct-arvoilla on tilastollisesti merkitsevä ero. Tämän tuloksen perusteella ei kuitenkaan voida hylätä menetelmää, sillä Eviran ohjeiden mukaan Ct-arvojen vaihtelu tekijöiden välillä on hyväksyttävää jopa ± 2 yksikköä.

Taulukko 13. Tässä taulukossa on esitetty ANOVA:lla analysoitavat tulokset (PRRSV VR2332).

| PRRSV VR2332 | | | |
|------------------|----------|----------|----------|
| | Tekijä 1 | Tekijä 2 | Tekijä 3 |
| Pitoisuus | T1 | T2 | T3 |
| 10 ⁻² | 23,60 | 24,04 | 24,04 |
| 10 ⁻³ | 27,45 | 27,25 | 27,89 |
| 10 ⁻⁴ | 31,31 | 29,79 | 31,24 |
| 10 ⁻⁵ | 33,43 | 34,99 | 33,85 |
| | | | |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------|------------------|------------------|---------------|---------------------|
| Anova: kaksisuuntainen ilman toistoa | | | | | | |
| | | | | | | |
| <i>YHTEENVETO</i> | <i>Lukumäärä</i> | <i>Summa</i> | <i>Keskiarvo</i> | <i>Varianssi</i> | | |
| 10-2 | 3 | 71,68459 | 23,89486 | 0,063195 | | |
| 10-3 | 3 | 82,59027 | 27,53009 | 0,107178 | | |
| 10-4 | 3 | 92,33774 | 30,77925 | 0,735104 | | |
| 10-5 | 3 | 102,2743 | 34,09145 | 0,648744 | | |
| | | | | | | |
| T1 | 4 | 115,7969 | 28,94923 | 18,83028 | | |
| T2 | 4 | 116,07 | 29,0175 | 21,38903 | | |
| T3 | 4 | 117,02 | 29,255 | 18,0379 | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| ANOVA | | | | | | |
| <i>Vaihtelun lähde</i> | <i>NS</i> | <i>va</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>P-arvo</i> | <i>F-kriittinen</i> |
| Rivit | 171,8692541 | 3 | 57,28975 | 118,4339 | 9,96E-06 | 4,757063 |
| Sarakkeet | 0,206079036 | 2 | 0,10304 | 0,213012 | 0,814005 | 5,143253 |
| Virhe | 2,902364727 | 6 | 0,483727 | | | |
| | | | | | | |
| Yhteensä | 174,9776978 | 11 | | | | |
| | | | | | | |

Kuva 11. Kuvassa esitetty ANOVA:lla saatu data, jonka mukaan arvioidaan, onko tulosten välillä tilastollisesti merkitsevää eroa

Datan käsittelyn jälkeen voidaan todeta, että testillä saatu p-arvo 0,814 on suurempi kuin 0,05. Tämä tarkoittaa sitä, että nollahypoteesia ei hylätä, jolloin tulosten välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Havainnollistamisen avuksi tuloksista on luotu kuvaajat, jotka löytyvät liitteestä 1.

5 Loppupäätelmät

Tässä opinnäytetyössä suoritettiin reaaliaikaisen *multiplex* RT-PCR -menetelmän käyttöönotto ja validointi PRRS-virukselle. Käyttöön otettu menetelmä soveltuu PRRS-viruksen tutkimiseen yhtäaikaaisesti kolmella eri aluke-koetinyhdistelmällä. Menetelmällä voidaan siis tutkia sekä PRRSV:n eurooppalaista (EU) että pohjoisamerikkalaista (NA) tyyppiä edustavia viruksia, tietämättä etukäteen kumpi tyyppi viruksesta on kyseessä. Saatujen tulosten perusteella menetelmä soveltuu PRRSV:n toteamiseen sian seerumista, elinsuspensiosta, siemennesteestä sekä viruksen soluviljelyyn käytettävästä elatusaineesta.

Menetelmän validointi suoritettiin onnistuneesti. Spesifisyys, sensitiivisyys ja tarkkuus määritettiin vuoden 2018 PRRSV-vertailututkimusnäytteiden avulla ja ne todettiin erinomaisiksi. Menetelmän selektiivisyyttä mitattiin muilla laboratoriossa tutkittavilla näytteen tai matriisin kannalta merkityksellisillä viruksilla. Selektiivisyys osoittautui hyväksi, sillä menetelmä ei monista muita viruksia kuin PRRS-virusta. Toistettavuus ja uusittavuus olivat hyväksyttäviä. Tuloksissa vaihtelua aiheutti muun muassa testin eri suorittajat, sekä erinäiset työskentely-ympäristöstä ja välineistä aiheutuvat vaihtelut. Edellä mainitut asiat ei kuitenkaan vaikuta merkittävästi testitulokseen, joten menetelmä voidaan validoinnilla todeta toimivaksi.

Menetelmällä saatu tulos on positiivinen silloin, kun fluoresenssikäyrän kasvu on eksponentiaalista ja saatu Ct-arvo on alle 40. Tulos todetaan negatiiviseksi, silloin kun eksponentiaalista kasvua ei havaita. Tulosta pidetään epäilyttävänä, kun Ct-arvo on yli 40 ja käyrä kasvaa eksponentiaalisesti. Kaikki epäilyttävät ja positiiviset tulokset tarkistetaan perinteisellä PCR-menetelmällä, joka mahdollistaa viruksen genotyyppityksen sekvensoinnilla. Myös tulokset, joissa Ct-arvo on 35-40 ja käyrä kasvaa kuvaajalla eksponentiaalisesti, on syytä tarkistaa, sillä Ct-arvo on riippuvainen myös matriisista. Jokaisessa testissä on mukana myös sekä positiivinen että negatiivinen kontrolli. Kontrollit määrittävät testin toimivuuden ja testi voidaan hyväksyä vain, kun kontrollit antavat oletetun tuloksen.

Tämä menetelmä otetaan käyttöön ensisijaisena menetelmänä PRRS-viruksen osoittamiseen Eviran Virologian tutkimusyksikössä ja se liitetään osaksi FINAS-akkreditoituja

PCR-menetelmiä. Menetelmällä tullaan tutkimaan PRRSV-seurantanäytteitä sekä tekemään taudinsyynselvityksiä ja tautivapaustutkimuksia. Menetelmän luotettavuutta ja laatua seurataan hollantilaisen GD Animal Health -organisaation järjestämällä vertailututkimuksilla, sillä PRRS-taudille ei ole EU-tasoista referenssilaboratoriota.

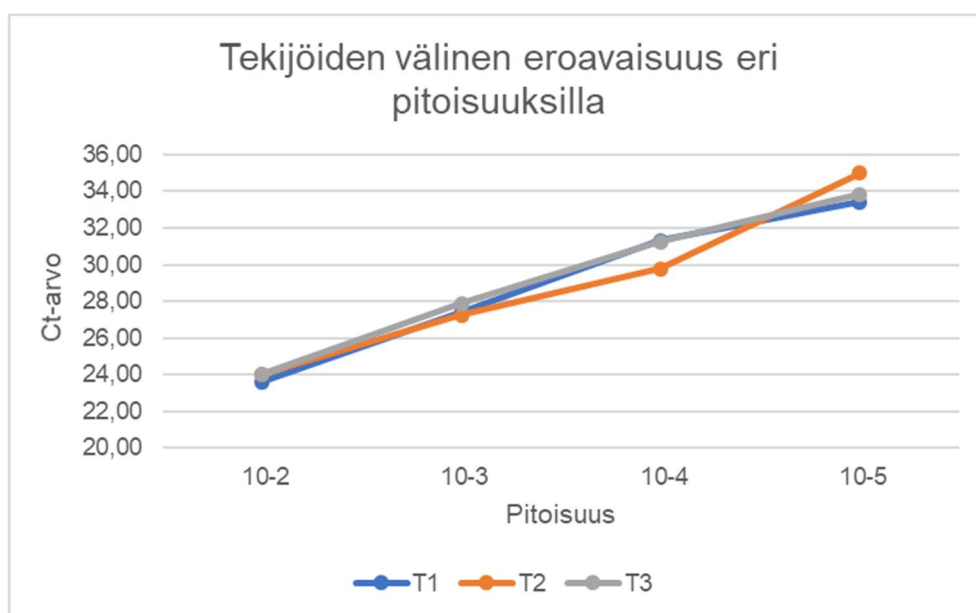
Lähteet

- 1 Porcine reproductive and respiratory syndrome. 2017. Verkkoaineisto. Elintarviketurvallisuusvirasto. <<https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/siat/prrs-tauti/>>
- 2 Nokireki,Tiina. 2010. PRRS-kirjallisuuskatsaus. Suomen Eläinlääkärilehti.
- 3 Laboratoriopalvelut. 2018. Verkkoaineisto. Elintarviketurvallisuusvirasto. <<https://www.evira.fi/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/laboratoriopalvelut/>>. Luettu 29.4.2018.
- 4 The virus. 2018. Verkkoaineisto. Global PRRS Solutions. <<https://www.prrs.com/en/prrs/virus/>>. Luettu 27.9.2018.
- 5 Simartevirus. Verkkoaineisto. Viralzone. <https://viralzone.expasy.org/284?outline=all_by_species>. Luettu 9.9.2018.
- 6 Kuhn JH. Lauck M. Bailey AL. Shchetinin AM. Vishnevskaya TV. Bào Y. Ng TF. LeBreton M. Schneider BS. Gillis A. Tamoufe U. Difo Jle D. Takuo JM. Kondov NO. Coffey LL. Wolfe ND. Delwart E. Clawson AN. Postnikova. Bollinger L. Lackemeyer MG. Radoshitzky SR. Palacios G. Wada J. Shevtsova ZV. Jahrling PB. Lapin BA. Deriabin PG. Dunowska M. Alkhovsky SV. Rogers J. Friedrich TC. O'Connor DH. Goldberg TL. Reorganization and expansion of the nidoviral family *Arteriviridae*. Arch Virol. 2016 Mar.161(3):755-68.
- 7 Wernike K. Bonilauri P. Dauber, M. Errington J. LeBlanc N. Revilla-Fernández S. Hjulsager C. Isaksson M. Sadejek T. Beer M. Hoffmann B. 2012a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. J. Vet. Diagn. Invest. 24, 855-866.
- 8 Tian K. Yu X. Zhao T. Feng Y. Cao Z. Wang C. Hu Y. Chen X. Hu D. Tian X. Liu D. Zhang S. Deng X. Ding Y. Yang L. Zhang Y. Xiao H. Qiao M. Wang B. Hou L. Wang X. Yang X. Kang L. Sun M. Jin P. Wang S. Kitamura Y. Yan J. Gao GF. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLoS One. 2007 Jun 13;2(6):e526.
- 9 Suominen I. Pärssinen R. Haajanen K. Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Turun Ammattikorkeakoulu.
- 10 Bio Rad. 2006. Real-Time PCR Application Guide.
- 11 Evira. 2012. PCR ja realtime PCR- luentomateriaali.

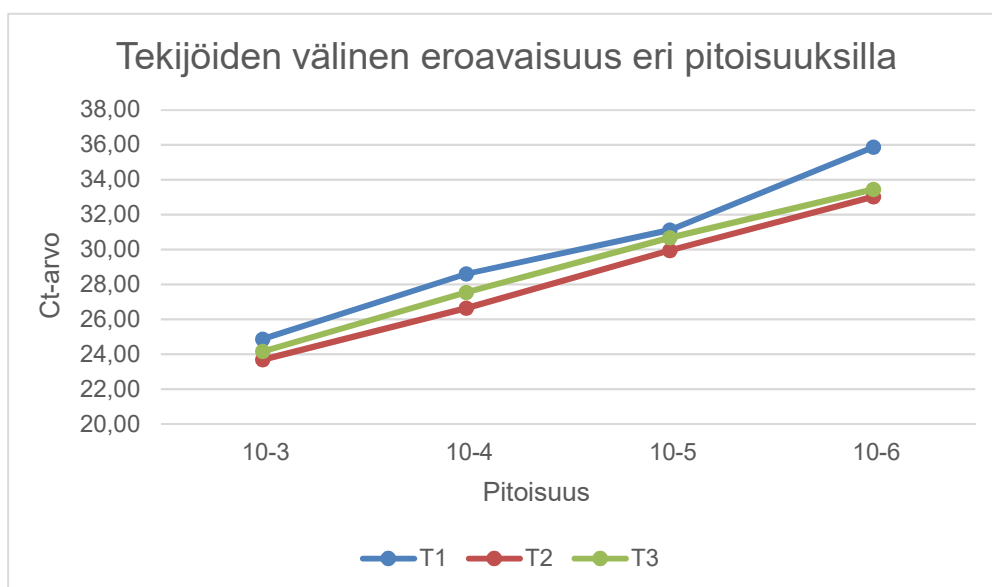
- 12 TaqMan® vs. SYBR® Green Chemistries. 2009. Verkkoaineisto.
<<https://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx> > Luettu 2.10.2018.
- 13 Hallanvuori Saija. 2012. Reaaliaikainen PCR-tekniikka (peruskurssi)- luentomateriaali. Elintarviketurvallisuusvirasto.
- 14 Hägg Margareta. 2016. Verkkoaineisto. Validoinnin suunnittelun opas. VTT Technology. < <https://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 5.10.2018.

ANOVA-analyysin kuvaajat

Toisessa kuvaajassa esitetään Ct-arvot pitoisuuden funktiona (kuva 12) PRRS Lelystad kannan tuloksista, kun taas toinen kuva esittää Ct-arvot pitoisuuden funktiona PRRS VR2332 kannan tuloksista (kuva 13).



Kuva 12. Kuvassa esitetty Ct-arvojen erot tekijöiden välillä eri pitoisuuksilla (PRRSV Lelystad-kanta).



Kuva 13. Kuvassa esitetty Ct-arvojen erot tekijöiden välillä eri pitoisuuksilla (PRRSV VR2332-kanta).