



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Kasper Wikman

qPCR-menetelmän kehitys ihmisen enterovirusten tunnistamiseksi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

Tekijä	Kasper Wikman
Otsikko	qPCR-menetelmän kehitys ihmisen enterovirusten tunnistamiseksi
Sivumäärä	26 sivua + 3 liitettä
Aika	30.4.2021
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalyttikko (AMK)
Ohjaajat	R&D manager Kati Hokynar lehtori Tiina Soininen
<p>Enterovirukset esiintyvät maailmanlaajuisesti ja ovat yleisimpiä hengitystieinfektioita aiheuttajia. Enterovirusinfektioista johtuvat oireet ja sairaudet voivat olla erittäin vakavia, heikomman vastustuskyvyn omaavalla hengenvaarallisiakin. Hengitysteitse leviävät kannat ovat jo osoittaneet kykynsä aiheuttaa vaikeasti hallittavia keuhkokuume-epidemioita Aasiassa, Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa.</p> <p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Mobidiag Oy:lle osana tulevaa hengitystien virusten diagnostista testiä. Työn tavoite oli kehittää qPCR (kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio) -menetelmä kliinisesti merkitsevimpien ihmisen hengitystien enterovirusten tunnistamiseksi.</p> <p>Työssä testattiin 23 eri singleplex entero-, rino- ja poliovirusreaktioseosta, joista kuusi valittiin jatkotesteihin. Jatkotestauksessa yhdistettiin yksi Rhino ja yksi Entero singleplex qPCR -reaktioseos eli tehtiin duplex qPCR -reaktioseos, jota testattiin kaikilla saatavilla näytteillä. Kuudesta duplex qPCR -reaktioseoksesta valittiin kaksi jatkokehittelyyn, Rhino/Entero AM2 ja Rhino/Entero AM4.</p> <p>Tämä on alustava kehitystyö qPCR-menetelmälle. Kehitystyö jatkuu tämän työn jälkeen, ja valittu duplex qPCR -reaktioseos hyödynnetään osana laajempaa hengitystiepatogeenien tunnistuspaneelia, joka lopuksi käytetään hengitystiepatogeenien tunnistamiseen diagnostisella Novodiag®-testialustalla.</p>	
Avainsanat	qPCR, enterovirus, rinovirus, molekyyli diagnostiikka

Author	Kasper Wikman
Title	Development of a qPCR assay for the detection of human respiratory enteroviruses
Number of Pages	26 pages + 3 appendices
Date	30 April 2021
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Kati Hokynar (R&D Project Manager) Tiina Soininen, Lecturer
<p>Enterovirus is a genus of viruses, which is thought to be the cause of a majority of viral respiratory infections globally. Infections of the respiratory tract caused by enteroviruses can be extremely dangerous, and, for immunocompromised individuals, an enterovirus infection can be fatal. Respiratory enteroviruses are spread through respiratory secretions from the infected, which is the fastest route for a virus to spread. The risk of a serious global pandemic is not to be overlooked, as various strains of enteroviruses have already been the cause of localized epidemics in Asia, Europe and North-America.</p> <p>This bachelor's thesis project was completed for Mobidiag Oy as a part of Metropolia UAS degree programme in Laboratory Services. The aim of this project was to develop a qPCR assay for the detection of the most clinically relevant human respiratory enteroviruses.</p> <p>A total of 23 singleplex entero-, rhino- and poliovirus qPCR assays were tested, six of which were further tested in duplex qPCR. In the duplex qPCR tests one rhinovirus singleplex qPCR assay was combined with one enterovirus singleplex qPCR assay and tested with all available enterovirus samples. Out of six tested duplex qPCR assays two were chosen for further development: Rhino/Entero AM2 and Rhino/Entero AM4.</p> <p>This project's scope was to perform a preliminary screening of viable qPCR assays for the detection of respiratory enteroviruses, and as such is not a finished diagnostic test. The assays chosen for further development will be utilized in a larger respiratory pathogen detection panel in the Novodiag®-diagnostic test platform.</p>	
Keywords	qPCR, enterovirus, rhinovirus, molecular diagnostics

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Enterovirukset	2
2.1	Enterovirussuvun luokittelu	2
2.2	Ihmisen enterovirukset	3
2.3	Hengitysteiden enterovirukset	4
2.4	Rinovirukset	4
2.5	Esiintyvyys	5
2.6	Enterovirusten genomi	6
2.7	Novodiag®-testin toimintaperiaate	7
3	Työn tavoite	9
4	Työn suunnittelu ja toteutus	10
4.1	Reagenssien liuottaminen	11
4.2	Oligoseosten ja qPCR-seosten valmistus	12
4.3	gBlocks®-näytteet	13
4.4	Tulosten analysointi	15
5	Tulokset	17
5.1	Singleplex qPCR -tulokset	17
5.2	Duplex qPCR -tulokset	18
6	Pohdinta	24

Liitteet

Liite 1. Enterovirusten taksonomia

Liite 2. Rhino/Entero AM2:n ja AM4:n Cq-arvot

Liite 3. Rhino/Entero AM1:n, AM3:n, AM5:n ja AM6:n Cq-arvot testatuille näytteille

Lyhenteet

AM	Assay mix, oligonukleotideista koostuva reaktioseos
Cq-arvo	Quantification cycle, syklijäraja-arvo. RFU-arvolle asetettu raja-arvo.
CV	Coxsackievirus
EV	Enterovirukset
gBlocks®	IDT:n tuottama synteettinen DNA-fragmentti
IDT	Intergrated DNA Technologies, yhdysvaltalainen bioteknologiayritys
in-silico	Biologinen tutkimus, testi, jota on tehty tietokoneella simuloitusti tai tietokantoja hyödyntäen
in-vitro	Molekyylibiologisia tai mikrobiologisia testejä, ”koeputkessa”
PCR	Polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio.
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio.
RT	Reverse transcriptase, käänteistranskriptaasi
RV	Rinovirukset, enterovirusiin kuuluva alalaji
+ssRNA	Yksijuosteinen positiivisesti varautunut RNA-molekyyli

1 Johdanto

Potilaan asianmukainen hoito voidaan aloittaa vasta, kun diagnoosi on asetettu eli taudinaiheuttaja määritetty. Diagnoosin täsmällisyys on erityisen tärkeää, sillä kaikki tulevat lääketieteelliset toimenpiteet perustuvat asetettuun diagnoosiin. Virusinfektioiden nopea ja tarkka diagnosointi on nykyään suurelta osin mahdollista bioteknologia-alan, erityisesti molekyyli diagnostiikan, nopean kehityksen ansioista.

Patogeenin, esimerkiksi bakteerin, viruksen tai parasiitin nukleiinihappoa tunnistavat testit, kuten kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon (qPCR) perustuvat testit, ovat olleet rutiinikäytössä diagnostisissa laboratorioissa jo vuosikymmeniä. Virusviljelmät olivat pitkään ainoa käytössä oleva menetelmä virusten tunnistamiseen. Nykyään diagnostiikka tehdään viljelmiin verrattuna tehokkaammilla, turvallisemmilla, edullisemmilla ja luotettavammilla molekyyli diagnostisilla testeillä. PCR-menetelmään perustuvien testien suurimpia etuja on niiden nopeus, herkkyys ja tarkkuus.

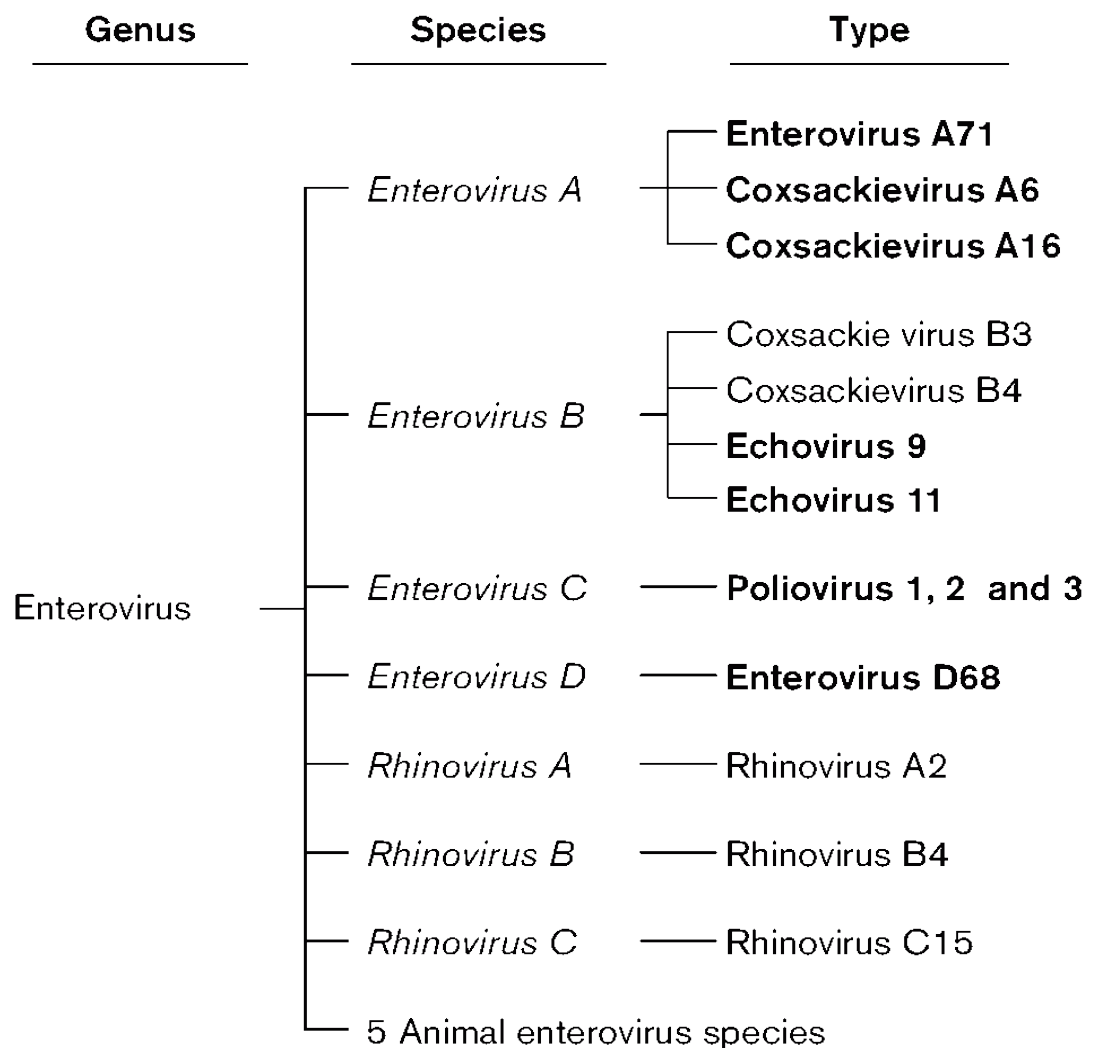
Ihmisen enterovirusten tunnistamiseen tarkoitettujen diagnostisten menetelmien jatkuva kehitystyö on tärkeää, sillä enterovirukset aiheuttavat joidenkin arvioiden mukaan jopa yli puolet kaikista ylähengitystieinfektioista. Enterovirussukuun kuuluvat rinoviruslajit ovat yleisimpiä lievien hengitystien infektioiden aiheuttajia. Oireina esiintyvät tyypillisesti nuha, kuume, yskä ja kurkkukipu. Vakavampia oireita ja myös jälkikomplikaatioita aiheuttavien enteroviruskantojen (EV-D68 ja EV-A71) epidemioita on esiintynyt ainakin Yhdysvalloissa, Kiinassa ja Alankomaissa.

Tämä opinnäytetyö on tehty Mobidiag Oy:lle osana Metropolia Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelmaa. Työn tavoitteena oli kehittää alustava qPCR-menetelmä hengitystien enterovirusten tunnistamiseksi Novodiag®-tuotealustalle, osaksi Mobidiag Oy:n laajempaa diagnostista testiä hengitystien viruksille.

2 Enterovirukset

2.1 Enterovirussuvun luokittelu

Enterovirukset ovat *Picornaviridae*-virusheimoön kuuluvia yksijuosteisia RNA-virusia. Enterovirussuku on jaettu 15 eri lajiin (kuva 1). Lista kaikista sekvensoiduista enteroviruskannoista löytyy liitteestä 1. [1.]



Kuva 1. Enterovirussuvun lajit. (5 lajeista ei-infektoivia ihmisille). Lihavoituna vakavia infektioita aiheuttavat kannat. [2.]

International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) -komitea päättää ja ilmoittaa muutoksista virusten luokittelussa. ICTV:n raportit sisältävät muun muassa kuvauksia virusten ominaisuuksista, genomeista, esiintyvyydestä ja levinneisyydestä. Enterovirusten luokitteluun ICTV hyödyntää useita eri kriteerejä, enteroviruksilla on esimerkiksi oltava keskenään samankaltainen geenijärjestys. [1.]

Tässä työssä on keskitytty in vitro -diagnostiikan (IVD) näkökulmasta kliinisesti merkitsevimpiin ihmisille hengitystieinfektiota aiheuttaviin enteroviruskantoihin.

2.2 Ihmisen enterovirukset

Ihmisen enterovirukset on jaettu seitsemään lajiin, joista neljä kuuluvat aitoihin enteroviruksiin, EV-A, EV-B, EV-C ja EV-D, ja kolme rinoviruksiin, RV-A, RV-B, RV-C. Suurin osa hengitystieinfektiota aiheuttavista aidoista enteroviruksista kuuluvat ryhmiin EV-A ja EV-C. Enterovirukset ja rinovirukset on eroteltu toisistaan pääsääntöisesti patogeenisuutensa, mutta myös geneettisten tekijöittensä, perusteella. [1.]

Ihmisillä enterovirusinfektiot havaitaan yleisimmin lapsilla. Aikuisilla lievän enterovirusinfektion oireet ovat tyypillisesti kuume, yskä, ihottumat, nuha ja lihaskipu. Vakavat komplikaatiot havaitaan useimmiten vastasyntyneillä ja heikomman vastustuskyvyn omaavilla. Vastasyntyneillä enterovirusinfektio voi pahimmillaan, tosin erittäin harvoin, johtaa jopa sepsikseen. Vakaviimpiin oireisiin kuuluvat muun muassa silmätulehdus, sydäntulehdus ja aivotulehdus. [3.]

Vakaviin hengityselinten infektioiden kuuluvat muun muassa keuhkokuume, keuhkoputkentulehdus sekä dysfagia (nielemisvaikeus). Hengitysteitä infektioivat enterovirukset ovat osoittaneet kykenevänsä aiheuttamaan vakavia infektiota muun muassa aivokalvoissa ja keskushermostossa. [4.]

Tunnetuin enteroviruskanta lienee poliovirus, joka nykyään luokitellaan enteroviruslajiin C. Poliovirus on, onnistuneen rokotusohjelman avulla, muutamaa aluetta lukuun ottamatta, hävitetty maailmasta. Afganistan ja Pakistan ovat ainoat maat, joissa poliovirus esiintyy endeemisenä viruksena. [5.]

2.3 Hengitysteiden enterovirukset

Enteroviruslajeihin A, B ja C:hen kuuluvat coxsackievirukset jaettiin ennen uusintaluokittelua kahteen lajiin, CV-A ja CV-B. Tuoreimman luokituksen mukaan coxsackievirukset jaetaan kolmeen eri enteroviruslajiin; EV-A, EV-B ja EV-C [1]. CV-A21 on esimerkiksi aiheuttanut vakavia epidemioita muun muassa Kiinassa. Coxsackieviruskanta onkin yleisin ei-rinovirusiin kuuluva hengitystieinfektiota aiheuttava enterovirus. [6.]

Echovirukset (E) kuuluvat enteroviruslajiin B. Aikuisilla echovirukset aiheuttavat pääsääntöisesti lieviä hengitystien oireita, kuten kurkkukipua, yskää ja nuhaa [1]. Echovirus-11 tunnetaan sen kyvystä siirtyä äidistä lapseen in utero, jolloin se voi aiheuttaa hengenvaarallisia infektiota erityisesti lapsen maksassa. [7.]

Enterovirus-D68 on EV-D:hen kuuluva jo pitkään endeemisenä esiintynyt enteroviruskanta Yhdysvalloissa, Euroopassa ja Kiinassa. D68-viruskanta on aiheuttanut paikallisia epidemioita, joista on seurannut akuuttia sairaalahoitoa vaativien infektioiden ilmaantuvuuden lisääntyminen. Kyseinen hengitysteiden enteroviruskanta on myös osoittanut kykenevänsä pysymään horrostilassa ihmiskehon kudoksissa, aiheuttaen myöhemmin vakavia infektiota muissa kudoksissa [3]. Hengitysteitä infektoivat ihmisen enteroviruskannat muistuttavat ominaisuuksiltaan rinovirusia enemmän kuin muut ihmisen enterovirukset [8].

Hengitystien enterovirusten optimilämpötila replikoitumiseen on noin 33–34°C ja viruksen epästabiilisuus kasvaa happamissa ympäristöissä (alle pH 5). Nämä ovat yleisiä rinovirusiin liittyviä ominaisuuksia. [9.]

2.4 Rinovirukset

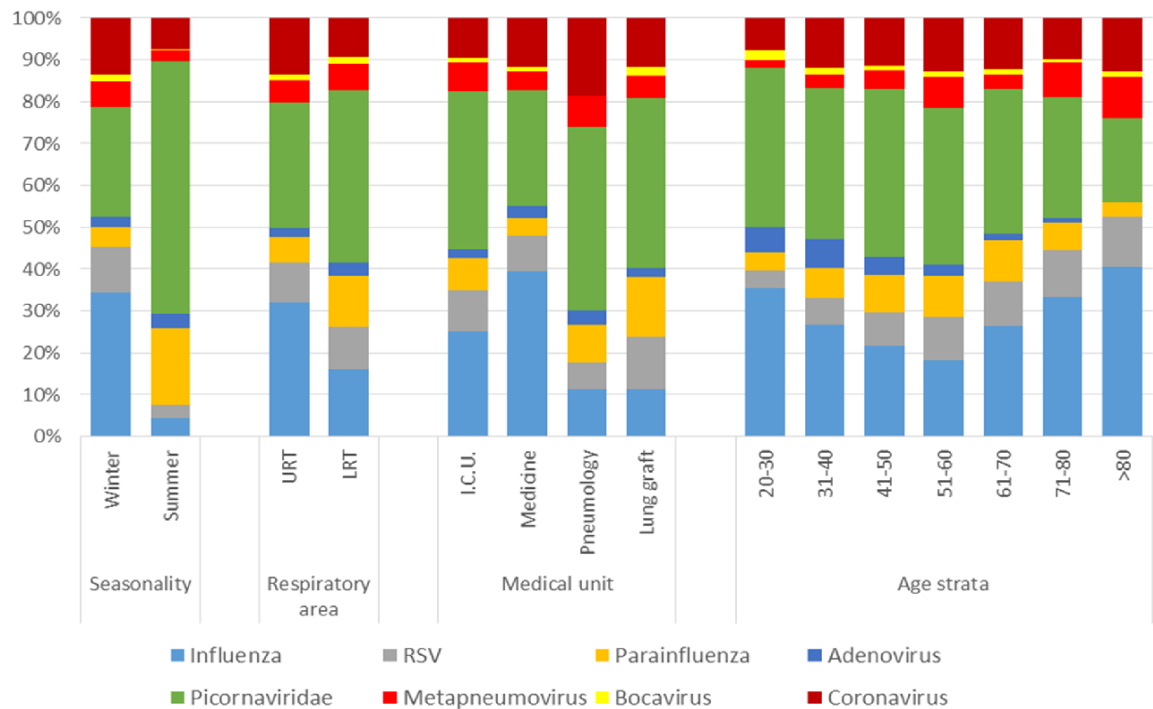
Rinoviruksen kyky infektoida erityyppisiä soluja on rajatumpi kuin muiden ihmisen enterovirusten. Rinovirukset sitoutuvat ylähengitysteiden soluihin, aiheuttaen usein lievää nuhakuumetta ja kurkku- sekä nenäonteloinfektioita. Rinovirusta on löydetty myös ulostenäytteistä. [2.] Rinovirukset ovat geneettisesti erittäin läheistä sukua muiden

ihmisen enterovirusten kanssa, mutta rinovirusten fenotyypiset ominaisuudet eroavat kuitenkin niistä huomattavasti [3].

Rinovirusten laaja levinneisyys ja yli 150 eri kannan tuoma monimuotoisuus mahdollistaa sen, että yksi rinoviruskanta aiheuttaa infektion, toisen rinoviruskannan siinä epäonnistuessa. Suuri määrä rinoviruskantoja ja rinovirusten erittäin nopea mutatoituminen tekevät rokotushankkeet melkein mahdottomiksi. Rinovirukset leviävät pääsääntöisesti hengitysteitse eritettyjen viruspartikkeleiden välityksellä, mahdollistaen rinovirusten aiheuttamat massatartunnat esimerkiksi yleisötahtumissa. [10.]

2.5 Esiintyvyys

Viiden pariisilaisen sairaalan yhteistyössä tehdyssä tutkimuksessa kartoitettiin hengitystieinfektiopotilaiden näytteistä viruslajien osuuksia infektioista (kuva 3).

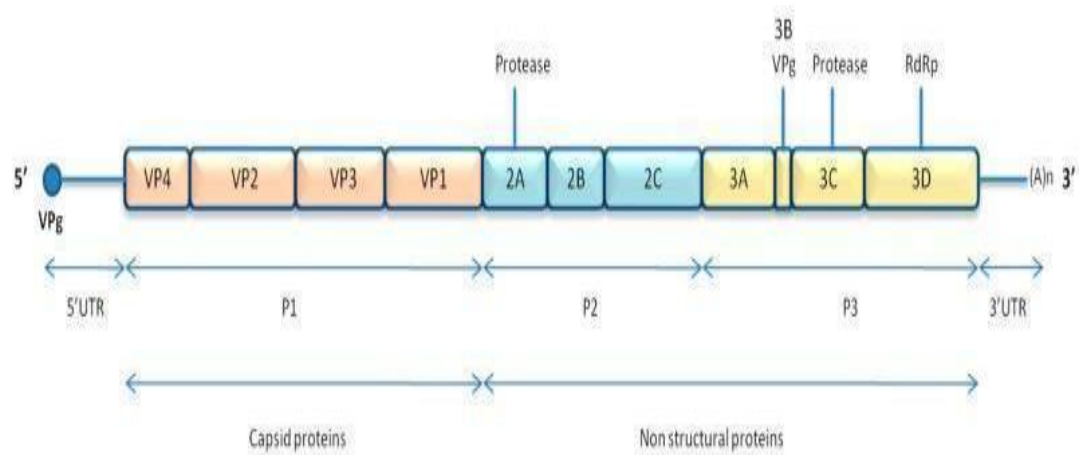


Kuva 3. Influenssa-, RS-, parainfluenssa-, adeno-, boca-, korona-*, metapneumo- ja picornavirusten (entero-, ja rinovirus), esiintyvyys noin 5000 hengitystieinfektiopotilaan otoksesta [10]. (*Tutkimus tehty ennen koronavirus covid-19 -pandemiaa, joten SARS-CoV-2 -infektiot eivät sisälly dataan).

Enterovirusten todettiin aiheuttavan 34,4 %, kesällä jopa yli 60 %, kaikista hengitystievirusinfektioista. Enterovirusten aiheuttamat ajoittain erittäin vakavat hengitystien infektiot näkyvät enterovirusten osuudessa keuhkotautiosastokäynneissä. [10.]

2.6 Enterovirusten genomi

Enterovirusten nukleiinihapon ominaisuudet, sen muodostamat rakenteet ja aikaisemmin mainittu geenien järjestely (kuva 2) ovat hyvin samankaltaisia kaikilla enteroviruksilla [2].



Kuva 2. Enterovirusten tyypillinen geenijärjestys. [2.]

Enterovirusten nukleiinihappo koostuu positiivisesta varautuneesta yksijuosteisesta RNA:sta (+ssRNA). Enterovirusten genomi jakautuu kymmeneen alaosiin. RNA-juosteen päissä ovat niin sanotut 5'-UTR ja 3'-UTR (untranslated region, suom. ei-koodaava alue) -genomialueet. 5'-UTR-alueen (noin 500 emästä) jälkeen alkaa genomien proteiineja koodaava, noin 5000 emäksestä koostuva ORF-alue (open reading frame, avoin lukukehys). [11.]

5'-UTR-alueella sijaitsee merkittäviä viraalisen RNA:n translaation osallistuvia sekvenssejä. Enterovirussuvussa hyvin konservoitunut 5'UTR-alue mahdollistaa

enterovirusten erottamisen muista virussuvuista. Sama alue on myös riittävän heterologinen kantojen välillä, jotta kantaspesifisiä määrittämiä voidaan tehdä. [11.]

5'-UTR-alueella sijaitsee myös IRES-alue (Internal ribosome entry site), jonka toiminta liittyy infektoidun isäntäsolun ribosomien värväämiseen oman nukleinihapon translaatioon, käyttäytyen kuin ihmisen mRNA. Ribosomien sitoutumista IRES-alueeseen edesauttaa vielä tuntematon määrä isäntäsolun proteiineja. Näiden tiedetään sijaitsevan solun sytoplasmassa ja osallistuvan infektiivisen RNA:n translaatioon, ennen kuin virus itse on ehtinyt tuottaa ainuttakaan proteiinia. [11.]

2.7 Novodiag®-testin toimintaperiaate

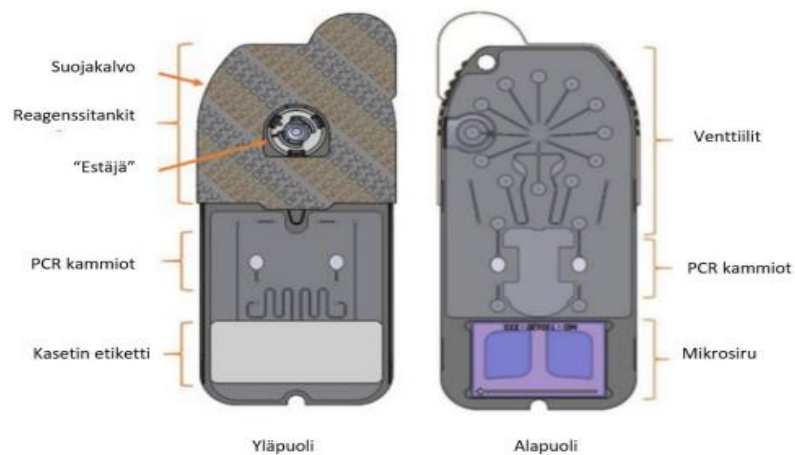
RT-qPCR—menetelmää (Reverse Transcriptase -qPCR, suom. käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio) suositellaan edelleen käytettäväksi enterovirusinfektion diagnosointiin, muun muassa menetelmän hyvän sensitiivisyyden ja nopeuden takia. Enteroviruskantojen jatkuva sekvensointi ja seuranta on välttämätöntä, jotta kyettäisiin tehokkaasti tunnistamaan hengitysteitä infektoivien enterovirusten aiheuttamat epidemiat. [13.]

Novodiag-testialusta koostuu Novodiag-laitteesta (kuva 4) ja Novodiag-kasetista (kuva 5). Kasetin sisällä yhdistyy kaksi molekyylibiologista menetelmää; RT-qPCR ja mikrosiruhybridisaatio.

Nukleinihapon eristys, RT-qPCR ja hybridisaatio tapahtuvat kasetin sisällä Novodiag-laitteen tekemien ohjelmoitujen toimintojen avulla. Koko prosessi on automatisoitu ja tulos saadaan noin tunnissa, testistä riippuen.



Kuva 4. Neljä Novodiag-laitetta päällekkäin [14].



Kuva 5. Novodiag-kasetti. qPCR-reaktio tapahtuu kahdessa PCR-kammiossa, joista monistettu nukleiinihappo siirtyy mikrosirulle. [14.]

Novodiag-hengitystievirustesteissä käytetään näytemateriaalina nielupyyhkäisynäytettä. Nielusta tai nenästä näytteenottotikulla (kuva 6) otettu näyte asetetaan kuljetus- ja säilytysnesteeseen, ja näyte on sellaisenaan valmis analysoitavaksi Novodiag-testillä.



Kuva 6. UTM® Viral Transport (Copan Diagnostics Inc.) putki virusnäytteiden säilyttämiseen ja kuljettamiseen. Vieressä Nylon®-päällystetty näytteenottotikku. [15.]

Laboratoriohenkilökunta tarvitsee erittäin vähän kokemusta testin suorittamiseen. Helppokäyttöisyys näkyy myös tulosten analysoimisessa. Automatisoitu tulosten analysointi algoritmien avulla mahdollistaa positiivisen tai negatiivisen tuloksen saamisen heti kun testi on suoritettu.

Novodiag-testialusta on suunniteltu pääosin pienempiin laboratorioihin, joissa ei ole resursseja analysoida isoja näytemääriä päivässä. Novodiag-laitteen pieni koko tekee siitä tarvittaessa helposti siirrettävän, mikä helpottaa nopean ja tarkan diagnostiikan katastrofialueilla tai harva-asutetuilla alueilla.

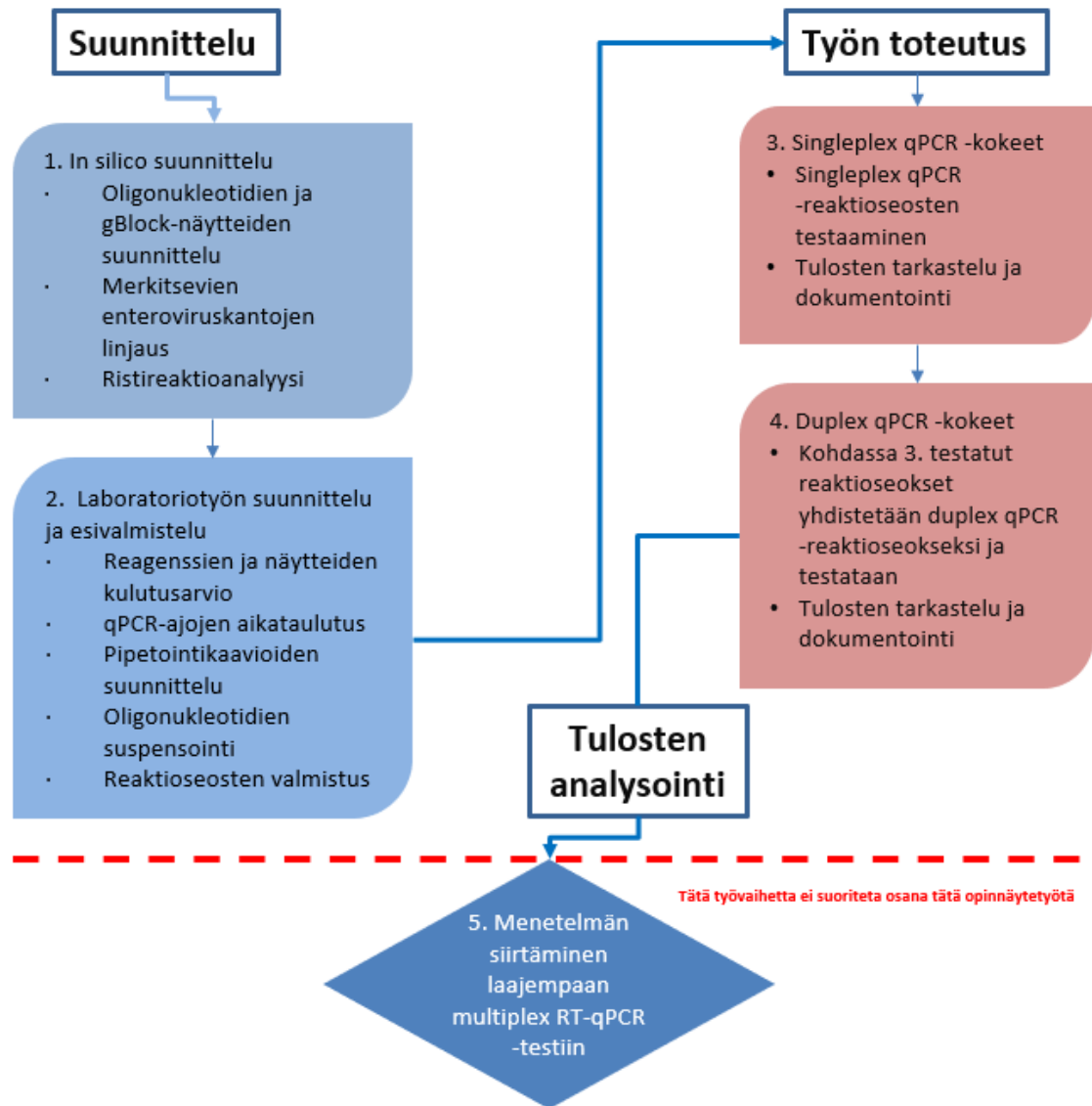
3 Työn tavoite

Työssä testataan yhteensä 23 reaktioseosta (assay mix, AM), jotka koostuvat enterovirusten tunnistamiseksi suunnitelluista alukkeista ja koettimista. Monistuksen tunnistus tehdään hydrolyysikoettimilla. Työtä tehdään kahdessa vaiheessa (singleplex ja duplex qPCR -testit). Työn lopputulokseksi toivotaan yksi tai mielellään useampi toimiva duplex qPCR -reaktioseos, ihmisten hengitystie-enterovirusten tunnistamiseksi.

Työn tuloksista voidaan valita kaksi duplex qPCR -reaktioseosta edelleen testattavaksi vaativimmilla näytteillä ja olosuhteilla sekä ennen kaikkea haastavissa multiplex qPCR -reaktioseoksissa. Varsinainen menetelmä enterovirusten tunnistamiseksi tulee olemaan osa Mobidiagin Novodiag-testialustan laajempaa hengitystiepatogeenien multiplex RT-qPCR -testipaneelia.

4 Työn suunnittelu ja toteutus

Työtä aloitettiin niin sanotulla in silico -analyysillä eli oligosuunnittelulla. Varsinainen laboratoriotyöskentely voitiin aloittaa, kun in silico -työ oli valmis ja suunnitellut oligonukleotidit olivat saapuneet. qPCR-reaktioita tehtiin kaikin kaikkiaan singleplex qPCR -osuudessa 1 048 ja duplex qPCR -osuudessa 1 024 kappaletta. Yhteensä työssä ajettiin noin 20 kappaletta 96 kuopan qPCR-levyä. Kuvassa 7 on esitetty työn kulku.



Kuva 7. Kaavio projektin vaiheista.

4.1 Reagenssien liuottaminen

Oligojen suspensointi suoritettiin laminaarikaapissa kontaminaatoriskin vähentämiseksi. Lyofilisoidut oligonukleotidit liuotettiin TE-puskuriin (Mobidiag Oy), alukkeet 500 µM:ksi ja koettimet 100 µM:ksi. Liuotus tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

4.2 Oligoseosten ja qPCR-seosten valmistus

Työssä testattiin 95 oligoa; 79 aluketta ja 16 PrimeTime®-hydrolyysikoetinta 23:ssä eri oligoseosyhdistelmässä (liite 1). Reaktioseokset nimettiin virusalalajien mukaan eli Entero AM, Rhino AM ja Polio AM. Poliovirus reaktioseoksia oli vain 3, siltä varalta, ettei mikään entero- tai rino-reaktioseoksista tunnista poliovirusta. Taulukossa 1 on esitetty esimerkkinä yhden reaktioseoksen oligoja.

Taulukko 1. 4X-vahvuisen reaktioseoksen pipetointikaava.

Oligon nimi	Oligon tyyppi	µm (kantaliuos)	µM (reaktiossa)	µM (reaktioseoksessa)	µl (oligoa TE-puskuriin)
F3.1_Rhino	Fwd primer	100	0,4	1,6	3,20
F3.2_Rhino	Fwd primer	100	0,4	1,6	3,20
F3.3_Rhino	Fwd primer	100	0,4	1,6	3,20
P1.1_Rhino	Taqman probe	100	0,2	0,8	1,60
P1.2_Rhino	Taqman probe	100	0,2	0,8	1,60
R1.1_Rhino	Rev primer	100	0,4	1,6	3,20
TE-puskuria (µL)					184,0
Loppuvolyymi (µL)					200

Kaikkiin qPCR-reaktioihin lisättiin Mobidiagin itsetuotettu 2X Master Mix, 4X-vahvuista, joko entero-, rino- tai polioreaktioseosta, 2 µl synteettistä DNA-fragmenttinäytettä (2500 kopiota mikrolitrassa, sarjalaimennos) ja milliQ®-ultrapuhdasta vettä siten, että reaktion lopputilavuus oli 20 µl. Taulukossa 2 on esitetty yhden reaktion reagenssit ja niiden volyymit.

Taulukko 2. qPCR-reaktiossa käytetyt reagenssit ja niiden volyymit.

Reagenssi	Valmistaja	1 reaktio (µL)
2X Master Mix	Mobidiag	10
4X Reaktioseos	IDT (oligot)	5
mQ-H2O	Mobidiag	3
gBlocks-näyte	IDT	2
	Kok.	20

4.3 gBlocks®-näytteet

Työhön suunniteltiin 38 gBlocks Gene Fragments -näytettä (Integrated DNA Technologies) (taulukko 3). gBlocks on synteettisesti tuotettu, 150–3000 emäsparia pitkä DNA-fragmentti, jonka sekvenssi vastaa kohdepatogeenin tiettyä geeniä.

Työssä käytetyt geenifragmentit suunniteltiin jäljittämään erityisesti hengitystieinfektioita aiheuttavien enteroviruskantojen geenejä, kansainvälisiä genomitietokantoja hyödyntämällä. gBlocks-geenifragmenttinäytteet toimitettiin kylmäkuivattuina koeputkissa.

gBlocks-putkessa on ilmoitettu DNA-geenifragmentin määrää (ng), pituus (bp, basepare, emäspari), tarkka sekvenssi, moolimassa ja sulamispiste. Kylmäkuivatuista DNA-fragmenteista valmistettiin kantaliuokset TE-puskuriin siten, että kaikkien näytteiden pitoisuus oli 1 ng/µL. Jokaista näytettä laimennettiin edelleen, kunnes päästiin haluttuihin kopiopitoisuuksiin eli 2500 kopiota mikrolitrassa. gBlocks-näytteen lopullinen pitoisuus laskettiin putkessa ilmoitettua moolimassaa ja Avogadron vakiota hyödyntäen. Geenifragmentin pitoisuus laskettiin alla olevan kaavan mukaan [16].

$$\text{määrä (ng)} * 6.022 * 10^{23} \text{ pituus (emäsparit)} * 1 * 109 * 650. \quad (1)$$

Patologisesta ja kliinisestä näkökulmasta vaarallisimpia ja eniten esiintyviä hengitystien enterovirusia käytettiin näytteinä testin kehityksessä (taulukko 3).

Taulukko 3. Näytteiden nimet ja niiden vastaavat viruskannat.

Näytteen nimi	Enteroviruslaji tai -kanta
Rino_1	Ihmisen rinovirus 73
Rino_2	Ihmisen rinovirus 93
Rino_3	Ihmisen rinovirus 42
Rino_4	Ihmisen rinovirus 99
Rino_5	Ihmisen rinovirus 76
Rino_6	Ihmisen rinovirus A101-v1
Rino_7	Ihmisen rinovirus C4
Rino_8	Ihmisen rinovirus C2
Rino_9	Ihmisen rinovirus 77
Rino_10	Ihmisen rinovirus 33
Rino_11	Ihmisen rinovirus 67
Rino_12	Ihmisen rinovirus 23
Rino_13	Ihmisen rinovirus A1
Rino_14	Ihmisen rinovirus 78
Entero_1	Ihmisen echovirus 2
Entero_2	Coxsackievirus A9
Entero_3	Ihmisen enterovirus D68, kanta Fermon
Entero_4	Enterovirus D68, isolaatti 2016R6058
Entero_5	Ihmisen enterovirus C104, kanta Pavia2597712
Entero_6	Ihmisen enterovirus C117, kanta LIT22
Entero_7	Echovirus E20
Entero_8	Ihmisen enterovirus B, kanta CBV31105999
Entero_9	Ihmisen enterovirus 96
Entero_10	Ihmisen coxsackievirus A10
Entero_11	Ihmisen coxsackievirus A1
Entero_12	Ihmisen enterovirus C
Entero_13	Ihmisen coxsackievirus A8
Entero_14	Echovirus 30
Entero_15	Ihmisen coxsackievirus A24
Entero_16	Ihmisen coxsackievirus A9
Entero_17	Ihmisen enterovirus 100
Entero_18	Ihmisen echovirus 31
Entero_19	Ihmisen coxsackievirus A13
Polio_1	Ihmisen poliovirus 3
Polio_2	Ihmisen poliovirus 1
Polio_3	Ihmisen poliovirus 2 isolaatti AC4M1
Polio_4	Ihmisen poliovirus 2 isolaatti PCM9
Polio_5	Ihmisen poliovirus 1

4.4 Tulosten analysointi

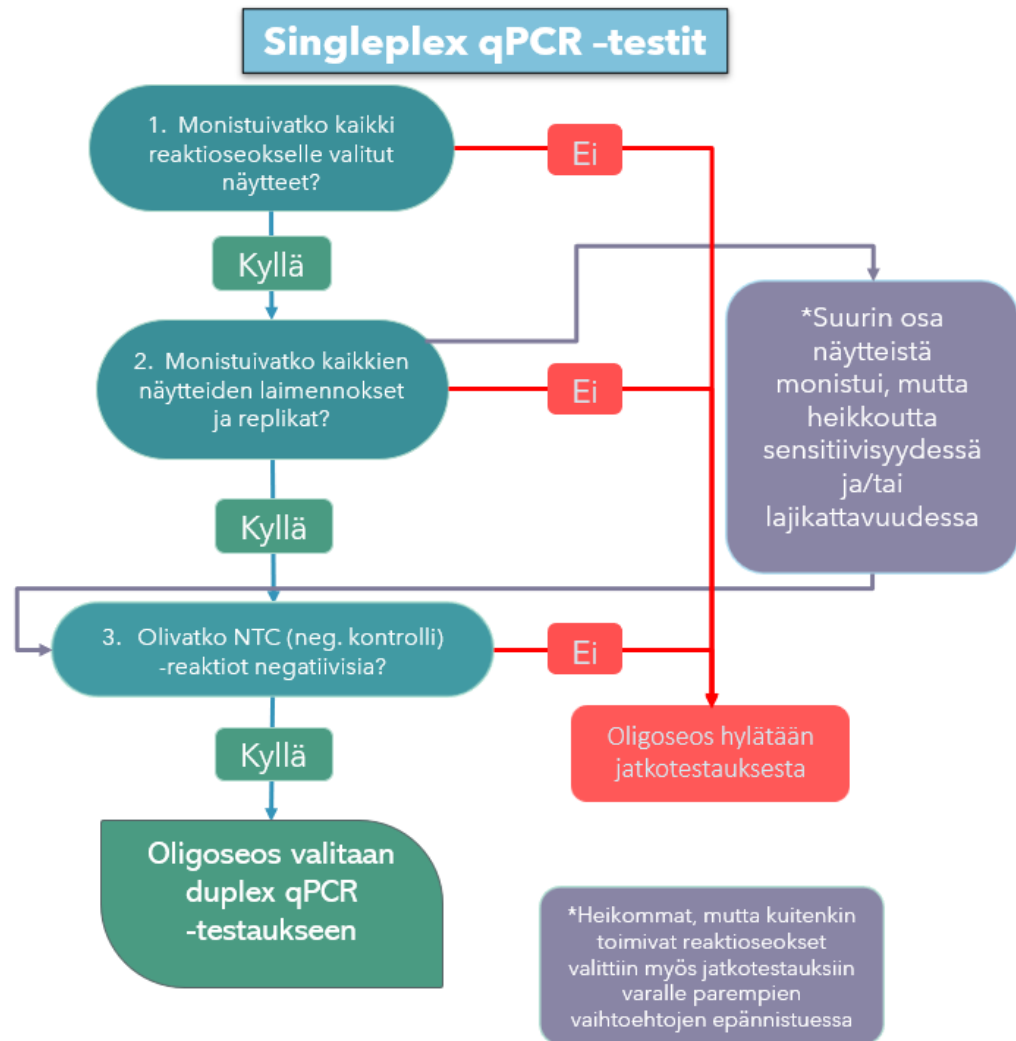
Kaikki qPCR-ajot suoritettiin Bio-Rad CFX96 C1000 qPCR -laitteella. Tulosten analysointi tehtiin jokaiselle qPCR-ajolle Bio-Rad Manager versio 3.1 qPCR -datankäsittelyohjelmalla.

Reaktioseosten performanssin arvioimiseksi tarkasteltiin kunkin reaktioseoksen inklusiviteettia (kykyä tunnistaa kaikkia näytteitä) ja herkkyyttä (kykyä tunnistaa pieniä määriä näytettä). Työssä käytettiin taulukossa 4 esitettyä PCR-protokollaa.

Taulukko 4. Työssä käytetty PCR-protokolla.

Vaihe	Lämpötila	Kesto	
1. RT-reaktio	40 °C	5 min.	
2. Alkudenaturaatio	95 °C	3 min.	
3. Denaturaatio	95 °C	15 sek.	x44
4. Liittymisvaihe (elongaatio)	60 °C	1 min.	

Syklitysprotokolla sisältää käänteiskopiointivaiheen (vaihe 1.), sillä Novodiag-testissä näyte on usein peräisin RNA-viruksesta, jolloin nukleiinihapon monistukseen tarvitaan käänteiskopioijaentsyymiä (engl. reverse transcriptase, RT) kääntämään RNA-näytteet cDNA:ksi. RT-entsyymi vaatii noin 40–50-asteisen, muutaman minuutin käänteiskopiointivaiheen. Kuvassa 8 on esitetty, miten työssä edettiin ja miten qPCR-testien tuloksia tarkasteltiin.



Kuva 8. Singleplex qPCR -kokeen suoritus.

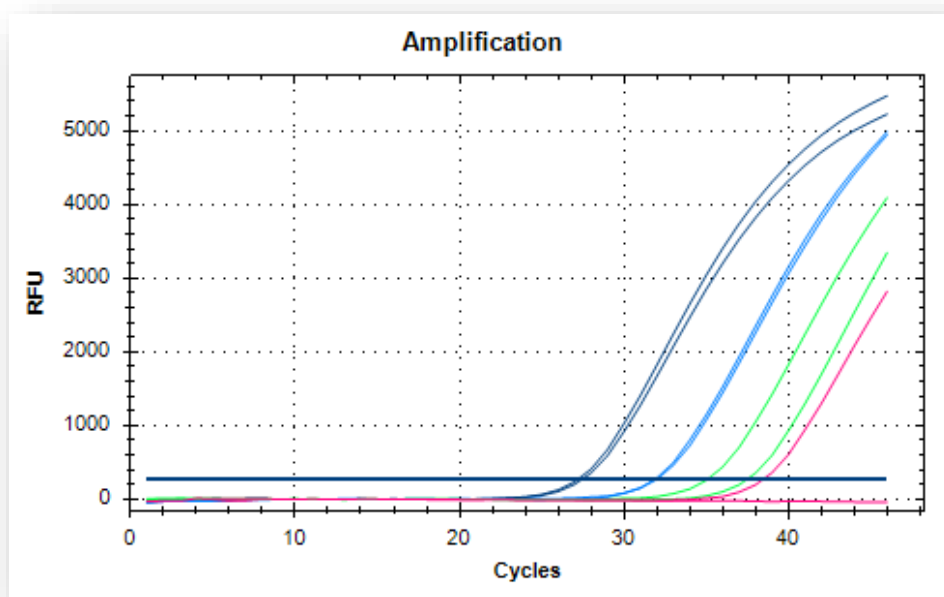
Valituista reaktioseoksista singleplex vaiheessa parhaiten toimivat valittiin jatkotestaukseen eli duplex qPCR -osuuteen. Jokainen duplex qPCR -reaktioseos sisälsi yhden rinovirusia ja yhden enterovirusia tunnistavan reaktioseoksen. Duplex qPCR -reaktioseokset testattiin kukin kaikilla gBlocks-näytteillä (38 kpl). Analysoitiin reaktioseosten herkkyyttä ja myös inklusiviteettia eli kuinka monta eri kliinisesti merkitsevää varianttia reaktioseos pystyy monistamaan.

5 Tulokset

5.1 Singleplex qPCR -tulokset

Työssä kaikkiaan 23 singleplex qPCR -reaktioseoksista kuusi reaktioseosta toimi hyvin inklusiviteetin ja sensitiivisyyden suhteen. Edellä mainituilla reaktioseoksilla onnistuttiin monistamaan testatuista gBlocks-näytteistä lähes kaikki näytteet kaikissa testatuissa pitoisuuksissa: 5000, 500, 50 ja 5 kopiota reaktiossa. Jokainen näyte testattiin kahtena rinnakkaisena reaktiona neljässä eri pitoisuudessa.

Osa testatuista reaktioseoksista tunnisti kaikki testatut enteroviruskannat hyvin, mutta osa rinnakkaisista reaktioista ei tuottanut monistusta (Kuva 8). Monien reaktioseosten osalta ei havaittu monistusta ollenkaan.



Kuva 9. Enterovirus AM3:lla saadut monistuskäyrät Entero 5 gB 5 (coxsackievirus A9) gBlocks-näytteelle. (Tummansininen = 5000 kopiota/reaktiossa, sininen = 500 kopiota/reaktiossa, vihreä = 50 kopiota/reaktiossa, punainen = 5 kopiota/reaktiossa.) Kuvassa vaakasuora punainen viiva on laimeimmasta pitoisuudesta rinnakkaisista reaktioista toinen, joka on siis jäänyt negatiiviseksi.

Rinnakkaisen reaktion epäonnistunut monistus voi johtua lukuisista seikoista, esimerkiksi pipetointivirheestä, qPCR-laiteviasta tai muusta syystä epäonnistuneesta qPCR-reaktiosta. Kuvassa 8 näkyvä negatiivinen tulos yhdelle reaktiolle voi myös johtua hyvin pienestä kopiomäärästä reaktiossa (5 kopiota).

Kyseistä reaktioseosta ei oltaisi valittu mukaan, mikäli monistus olisi epäonnistunut vahvemmissa reaktioissa tai useammassa kuin yhdessä. Rhino AM3:n suorituskyky oli erinomainen, eli se tunnisti kaikki näytteet yhtä lukuun ottamatta, ja reaktioseos valittiin muokattuna mukaan jatkotestaukseen. Vaihdettiin yksi oligo reaktioseoksessa toiseen, jolloin oletettiin, että kyseisen reaktioseoksen inklusiviteetti parantuisi. Päätös vaihtaa kyseinen oligo tehtiin in silico -analyysin perusteella.

Kun valinnat tehtiin jatkotestaukseen otettavista reaktioseoksista, jouduttiin tekemään kompromissi hyvän sensitiivisyyden ja hyvän laji- tai varianttikattavuuden eli inklusiviteetin välillä. Yksikään valituista reaktioseoksista ei ollut täydellinen. Joidenkin reaktioseosten huono monistusteho helpotti jatkotestaukseen valittavien seosten valintaa. Rhino AM1 ja AM3 sekä Entero AM1, AM3, AM4 ja AM9 valittiin jatkotestaukseen.

5.2 Duplex qPCR -tulokset

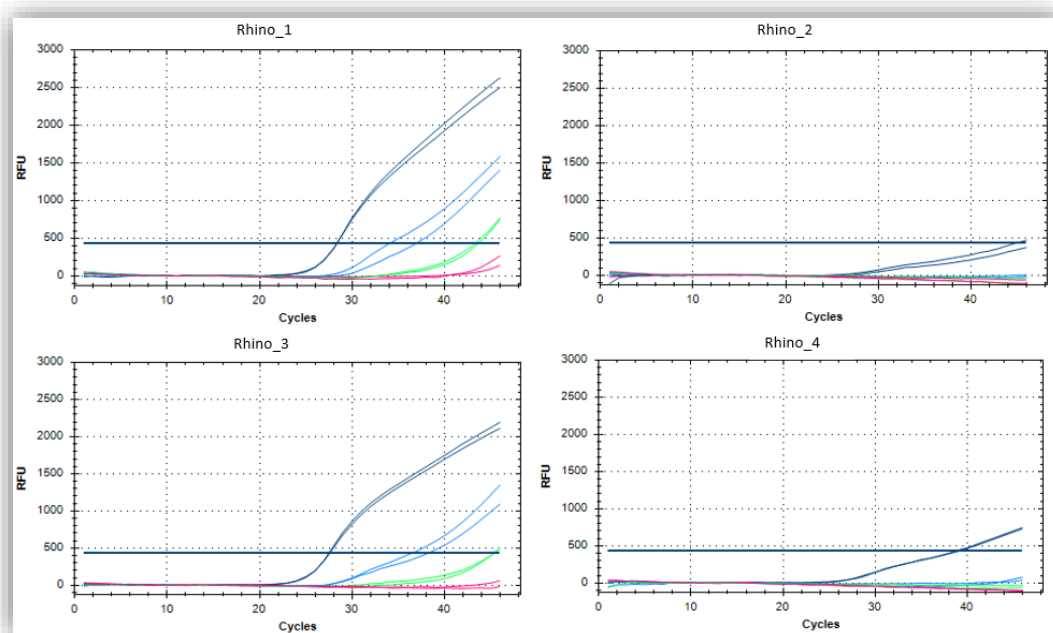
Taulukossa 5 on esitetty singleplex qPCR -reaktiot, jotka on yhdistetty duplex qPCR -reaktioseoksiksi. Koska rinovirusreaktioseoksia oli vähemmän, päätettiin yhdistää molemmat kaikkien enterovirusvaihtoehtojen kanssa ja aloittaa kokeet oletetusti parhaalla seoksella (paras Rhino- ja paras Entero singleplex qPCR -reaktioseos) sekä yhdistää ne kuudeksi duplex seokseksi samalla periaatteella.

Taulukko 5. Singleplex reaktioseokset, jotka yhdistettiin testejä varten.

Singleplex qPCR -reaktioseokset	Duplex qPCR -reaktioseos
Rhino AM3 + Entero AM1	Rhino/Entero AM1
Rhino AM3 + Entero AM9	Rhino/Entero AM2
Rhino AM1 + Entero AM4	Rhino/Entero AM3
Rhino AM3 + Entero AM3	Rhino/Entero AM4
Rhino AM3 + Entero AM4	Rhino/Entero AM5
Rhino AM1 + Entero AM3	Rhino/Entero AM6

Duplex reaktioseoksista AM1, AM2 ja AM3 olivat ainoat, joita testattiin kaikilla 38 gBlocks-näytteellä. Rhino/Entero AM2 ja AM4 olivat reaktioseoksista ainoat, joilla saatiin aikaiseksi toistettava ja vahva monistus kaikkien näytteiden vähiten kopioita sisältävistä reaktioista (50 ja 5 kopiota). Herkkyys oli siis tämän työn tarkoitukseen erinomainen (ks. liite 2).

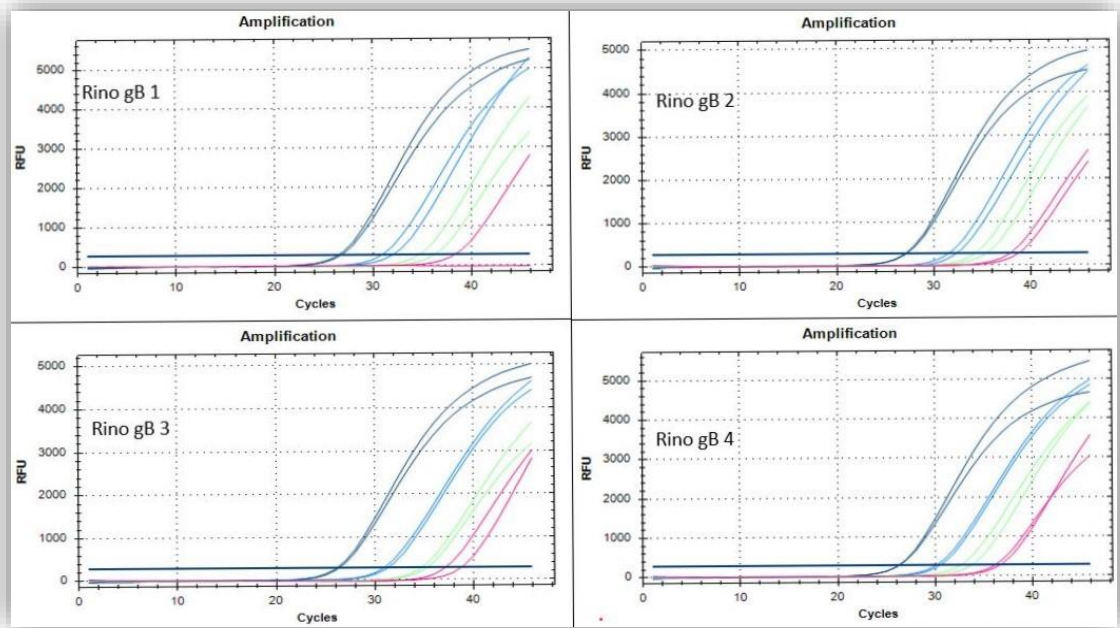
Rhino/Entero AM1, AM3, AM5 ja AM6 hylättiin testaamatta kaikkia näytteitä. Ensimmäisten tulosten perusteella voitiin jo todeta reaktioseoksen tehokkuuden olevan liian heikko (ks. liite 3). Hyviä tuloksia singleplex qPCR -testissä tuottaneet singleplex qPCR -reaktioseokset, muun muassa Rhino AM1 ja Entero AM4 (Rhino/Entero AM3), eivät yhdistettyinä pystyneet monistamaan kuin 1/10 testatuista näytteistä. Muut hylätyt vaihtoehdot muistuttivat Rhino/Entero AM5:n suorituskykyä (kuva 10), eli näidenkin seosten inklusiviteetti oli huono, jättäen valtaosan reaktioista kokonaan negatiivisiksi.



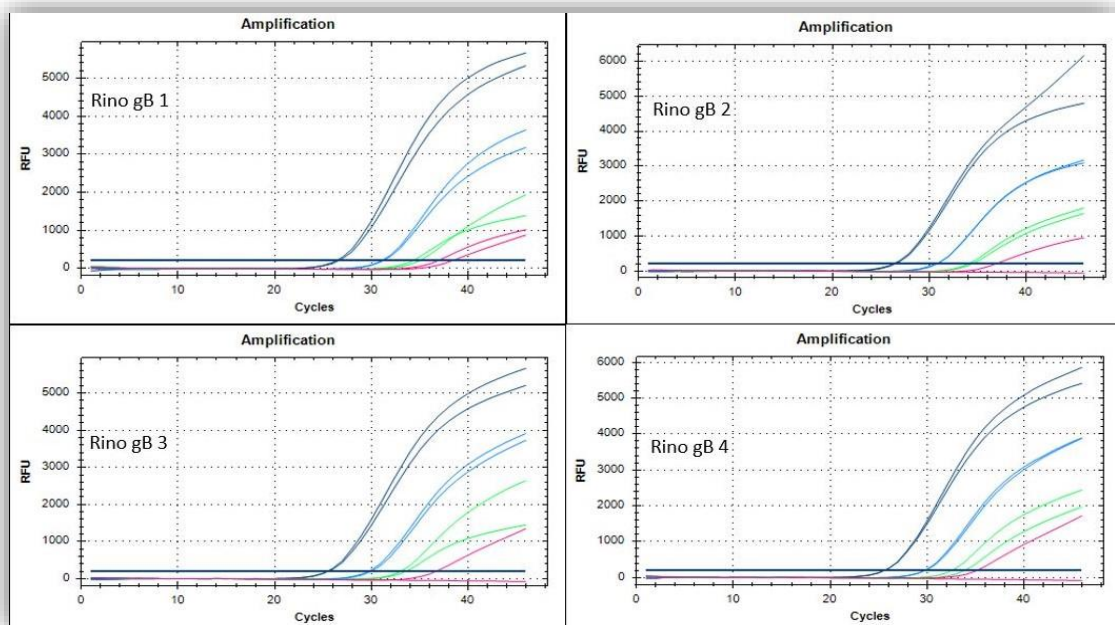
Kuva 10. Rhino/Entero AM5:llä saadut monistuskäyrät näytteille Rhino gB 1–Rino gB 4. Kyseinen duplex qPCR -reaktioseos hylättiin ensimmäisten tulosten jälkeen.

Monistustehokkuuden ja lajikattavuuden perusteella valittiin Rhino/Entero AM2 ensisijaiseksi vaihtoehdoksi ja AM4 toiseksi vaihtoehdoksi. Kuvassa 11 on esitetty AM2:n monistuskäyrät Rhino gB 1–4 näytteille. Näistä näytteistä yksi rinnakkaisista (5 kopiota reaktiossa) ei monistunut, mutta valtaosa näytteistä monistui toivotulla tehokkuudella.

Rhino/Entero AM2 ja AM4 toimivat hyvin lähes kaikilla näytteillä. Kuvissa 11 ja 12 on esitetty esimerkkejä näytteiden Rhino gB 1–4 monistuksesta edellä mainituilla reaktioseoksilla. Rhino/Entero AM2 monistavat jokaista näytettä kaikissa testatuissa pitoisuuksissa. Rhino/Entero AM4:en (kuva 12) tuottamat monistuskäyrät eivät ole yhtä tasaisia, etenkin herkkyyttä verrattaessa. Tästä huolimatta AM4 monisti jokaista näytettä vähintään yhdestä rinnakkaisesta reaktiosta.

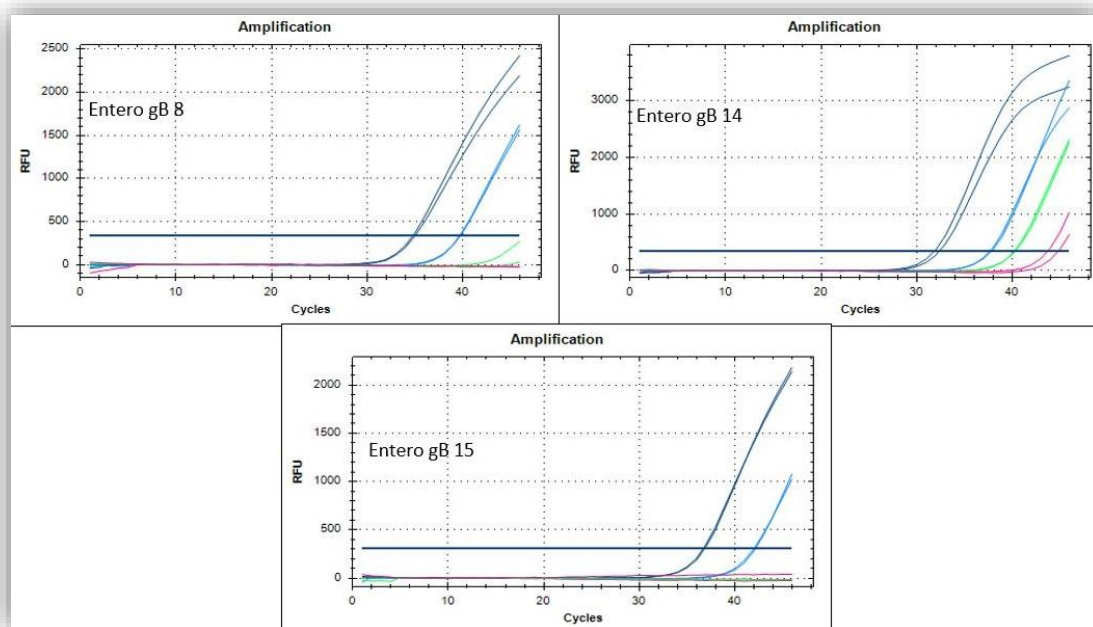


Kuva 11. Rhino/Entero AM2:n monistuskäyrät näytteille Rhino gB 1–Rhino gB 4 (neljäportainen laimennossarja ja rinnakkaiset reaktiot).



Kuva 12. AM4:n monistuskäyrät vastaaville näytteille Rhino gB 1–Rhino gB 4 (neljäportainen laimennossarja ja rinnakkaiset reaktiot).

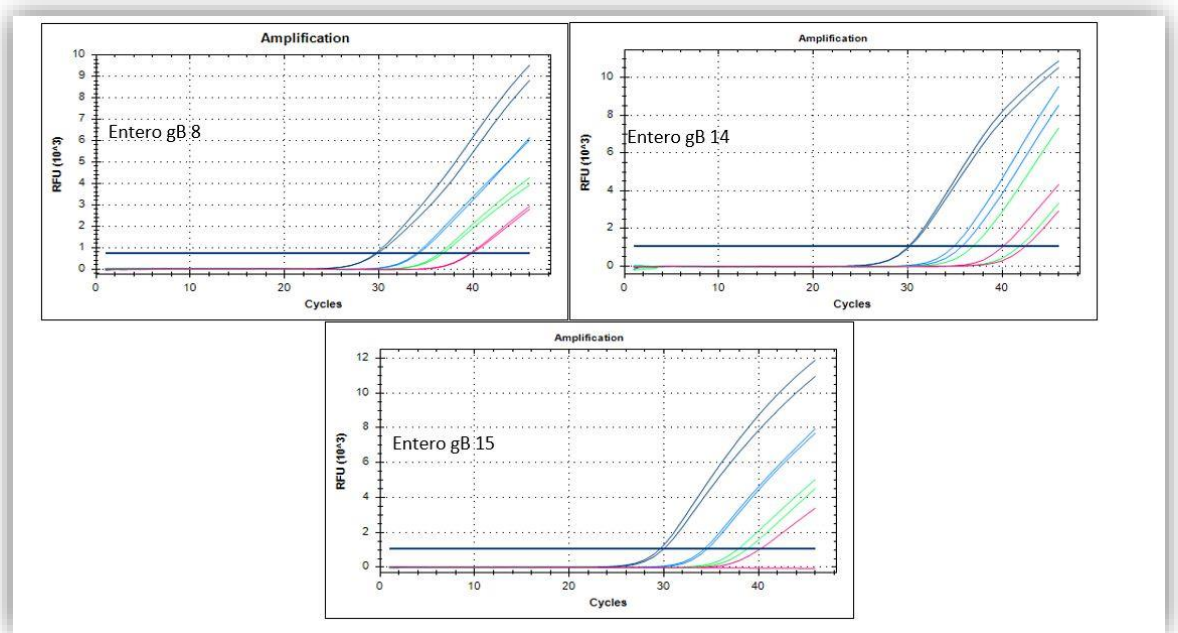
Suuri osa seoksista ei saanut aikaiseksi monistusta ollenkaan käyttäen 50 ja 5 kopiota reaktiossa. Herkkyys kärsi siis huomattavasti kaikilla duplexseoksilla. Erityisesti Entero gB 8 (ihmisen enterovirus B), 14 (coxsackievirus A8) ja 15 (echovirus 30) toimivat huonosti AM2:lla (kuva 13).



Kuva 13. AM2:n monistustehokkuus Entero gB 8, 14 ja 15 näytteillä (neljäportainen laimennossarja ja rinnakkaiset reaktiot).

Reaktioissa, joissa oli alhainen (50–5 kopiota reaktiossa) kopiomäärä, duplex qPCR -reaktioseosten monistustehokkuus ei vastannut singleplex qPCR -reaktioseosten monistustehokkuutta. Tämä oli odotettavissa oligomäärän kasvaessa reaktioseoksessa.

Muutamaa Entero gB -näytettä lukuunottamatta, AM2:lla monistusta saatiin aikaiseksi aikaisemmilla C_q-arvoilla ja saavutettiin korkeampi loppuintensiteetti kuin AM4:lla (kuva 14). Ero oli kuitenkin muihin testattuihin reaktioseoksiin verrattuna vähäinen.



Kuva 14. AM4:än monistuskäyrät Enteroglycan 8, gB 14 ja gB 15 -näytteille (neljäportainen laimennossarja ja rinnakkaiset reaktiot).

Kaikkien duplex qPCR -testien tulosten tarkastelun jälkeen parhaat vaihtoehdot voitiin tehdä melko vaivattomasti, koska AM1, AM3, AM5 ja AM6 eivät oikeastaan, muutamaa näytettä lukuun ottamatta, toimineet ollenkaan testattujen näytteiden monistuksessa.

6 Pohdinta

Diagnostisen molekyylibiologisen testin tai testin osan kehitystyö on pitkäkestoinen prosessi, jossa tarvitaan muun muassa bioinformatiikan, biotekniikan, molekyylibiologian ja tietotekniikan osaamista. Kehitystyössä on huomioitava iso määrä muuttujia, ja laboratoriotyön on oltava tarkasti suunniteltua ja suoritettua. Tulosten tulkinta on tehtävä huolellisesti ja tarkasti. Tässä työssä kehitetty qPCR-menetelmää hyödynnetään tulevassa Novodiag-testissä hengitystien enterovirusten tunnistamiseen, osana laajempaa hengitystieinfektioita aiheuttavien patogeenien paneelia.

Työn tavoite saavutettiin ja pystyttiin osoittamaan entero-, rino- ja poliovirusten nukleiinihappoa onnistuneesti kaikista työssä käytetyistä näytteistä. Toimiva duplex reaktioseos voitiin valita kahdesta melkein yhtä hyvästä vaihtoehdosta (Rhino/Entero AM2 ja AM4). Tarvittaessa voidaan myös suurta kerättyä qPCR-dataa hyödyntäen korvata Rhino/Entero-reaktioseosta tulevassa Novodiag Respiratory -testissä jollain muulla jo toimivaksi todetulla Rhino/Entero-reaktioseoksella tai vaihtoehtoisesti poistaa ja/tai lisätä oligoita tarpeen mukaan. Vaihtoehtoisen reaktioseoksen alustavasta kehityksestä ja kattavasta testauksesta on hyötyä vaativimpiin testeihin siirtyessä. Toimivuuden optimointi on usein yksi suurimmista haasteista kehitettäessä multiplex qPCR -menetelmiä, joissa on kattavia patogeenipaneeleja. Haasteet johtuvat laajalti oligomäärältään suuremmasta multiplex qPCR -seoksesta.

Rhino/Entero-reaktioseokset on tarkoitus testata edelleen multiplex qPCR -seoksessa, jossa on noin 10 eri reaktioseosta patogeenien tunnistamiseksi, Rhino/Entero-reaktioseoksen lisäksi. Multiplex qPCR -testit ja siirtyminen RT-qPCR:ään, jossa käytetään RNA:ta näytteenä DNA-fragmenttien sijasta, tuo haasteita, koska RNA on molekyylinä DNA:ta paljon herkempi. Työskentely RNA:n ja entsyymien kanssa ja niiden pitoisuuksien määrittäminen on erityistä tarkkuutta vaativaa työtä. Näytteiden ja reagenssien vaihtumisen lisäksi itse menetelmä siirtyy vielä isompaan kokonaisuuteen, ja sen pitää toimia myös Novodiag-laitteiston rajojen puitteissa.

Lähteet

1. International Classification and Taxonomy of Viruses. Genus: Enterovirus. 2019. Verkkoaineisto. ICTV:n verkkosivu. <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus>. Päivitetty 20.9.2020. Luettu 13.20.2020.
2. Royston, Léna; Tapparel, Caroline. 2016. Rinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*. Vol. 8, s. 16–38.
3. Goodfellow, Ian. 2011. The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Current opinion in virology*. Vol. 1, s. 355–362.
4. van Regenmortel, Mark & Mahy, Brian. 2004. Emerging Issues in Virus Taxonomy. *Emerg Infect Dis*. Vol. 1, s. 8–13.
5. Anastasina, Maria; Domanska, Aušra; Palm, Kaia & Butcher, Sarah. 2017. *Journal of General Virology*. Vol. 98, s. 1145–1158.
6. Rhoades, Ross; Tabor-Godwin, Jenna; Tsueng, Ginger & Feuer, Ralph. 2011. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*. Vol. 411, s. 288–305.
7. International Classification and Taxonomy of Viruses. Family: Picornaviridae. 2019. Verkkoaineisto. ICTV:n verkkosivu. <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae>. Päivitetty 3.10.2020, 2020. Luettu 20.10.2020.
8. Ray, Partho Sarothi & Das, Saumitra. 2002. La autoantigen is required for the internal ribosome entry site-mediated translation of Coxsackievirus B3 RNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30, s. 4500–4508.
9. Xiang, Zichun; Gonzalez, Richard; Wang, Zhong; Ren, Lili; Xiao, Yan; Li, Janguo; Li, Yongjun; Vernet, Guy; Paranhos-Baccalà, Gláucia; Jin, Qi & Wang, Jianwei. 2012. Coxsackievirus A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China. *Emerging infectious diseases*. Vol. 18, s. 821–824.
10. World Health Organization Office for Europe. Enterovirus Surveillance Guidelines: Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. 2015. Verkkoaineisto. WHO:n verkkosivu. <https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/272810/Enterovirus-SurveillanceGuidelines.pdf>. Luettu 13.3.2020.

11. Hyypiä, Timo. 2008. Echoviruses. Teoksessa Mahy, Brian & van Regenmottel, Marc. (ed.). Encyclopedia of Virology (3rd ed.). Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
12. Hirvonen, Sanna. 2017. Rapid detection of Streptococcus agalactiae using Strand Invasion Based Amplification (SIBA®) Method. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
13. Pietrangelo, Ann & Luo, Elaine. 2012. Verkkoaineisto. Healthline verkkosivu. Herpangina: Causes, Symptoms, Treatments, and More. <<https://www.healthline.com/health/herpangina#causes>> Päivitetty 25.7.2019. Luettu 17.01.2021.
14. Novodiag-laitteen käyttöopas. (Novodiag User Manual). 2018. Käyttöohje. Mobidiag Oy.
15. UTM®: Viral Transport. 2020. Verkkoaineisto. Copan USA:n verkkosivu. <<https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/utm-viral-transport/>>. Luettu 12.2.2020.
16. Global Poliovirus Eradication Initiative. 2020. Verkkoaineisto. Kansainvälisen polionhävitysohjelman verkkosivu. <<https://polioeradication.org/where-we-work/polio-endemic-countries/>>. Luettu 17.1.2020.

Enterovirusten taksonomia [1.]

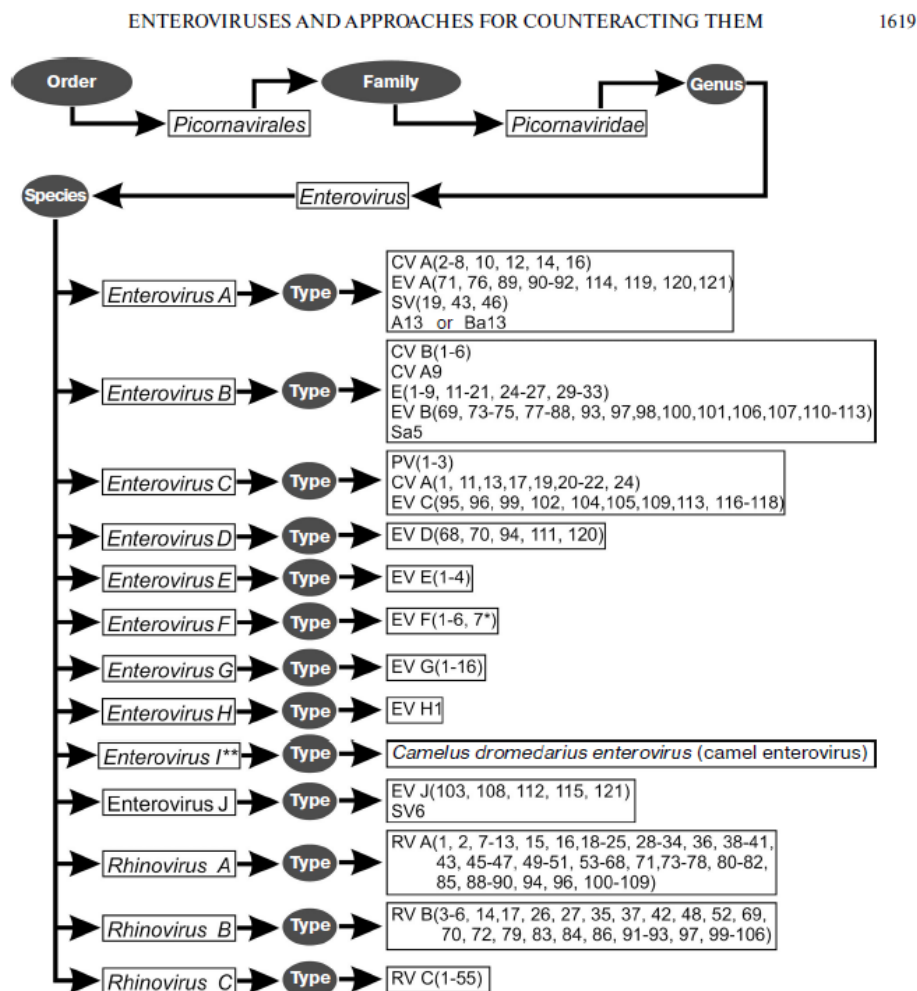


Fig. 3. Taxonomy of enteroviruses.

The species *Enterovirus E* includes bovine enterovirus group A: from EV-E1 to EV-E4.

The species *Enterovirus F* includes bovine enterovirus group B (at present, six types are described): from EV-F1 to EV-F6.

The species *Enterovirus G* consists of 16 (sero)types: from EV-G1 to EV-G16.

The species *Enterovirus H* includes three monkey viruses isolated in 1950 (SV4, SV28, and SA4) and A-2

plaque virus. However, these four viruses were joined into a single (sero)type enterovirus H1 (EV-H1) due to their strong similarity at the molecular level.

The species *Enterovirus J* contains six simian enterovirus species: SV6, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115, and EV-J121.

The species *Rhinovirus A* is the most numerous; it contains 80 (sero)types: rhinovirus (RV) A1, A2, A7-A13, A15, A16, A18, A19-A25, A28-A36, A38-A41, A43, A45-

Rhino/Entero AM2:n ja AM4:n Cq-arvot

Näyte	Rhino/Entero AM2				Keskim. Cq-arvo	Rhino/Entero AM4				Keskim. Cq-arvo
	Näytteen konsentraatio					Näytteen konsentraatio				
	5000 c.	500 c.	50 c.	5 c.		5000 c.	500 c.	50 c.	5 c.	
Rhino_1	26,6	31,5	35,5	38,4	33,0	27,0	31,6	35,2	38,4	33,1
Rhino_2	27,2	32,0	34,9	38,4	33,1	26,9	31,3	34,8	37,6	32,7
Rhino_3	26,3	30,3	33,2	36,5	31,6	26,2	30,3	33,8	35,8	31,5
Rhino_4	26,2	31,1	35,0	38,0	32,6	26,1	30,4	33,9	37,4	31,9
Rhino_5	26,8	32,1	38,1	36,8	33,4	26,8	31,1	34,5	39,1	32,9
Rhino_6	26,8	31,8	35,5	36,3	32,6	26,5	30,8	34,8	35,9	32,0
Rhino_7	28,4	33,5	36,5	N/A	32,8	27,8	31,6	35,7	37,9	33,3
Rhino_8	27,5	32,2	35,8	38,5	33,5	27,3	31,7	34,5	39,8	33,3
Rhino_9	27,5	33,3	36,0	38,2	33,8	27,5	32,1	35,6	39,2	33,6
Rhino_10	29,9	35,4	38,6	41,4	36,3	30,5	36,4	41,5	44,7	38,3
Rhino_11	27,1	32,4	36,3	36,9	33,2	27,0	31,5	34,5	38,4	32,9
Rhino_12	27,3	32,2	35,1	37,4	33,0	27,5	31,8	35,9	38,7	33,5
Rhino_13	27,5	31,7	35,2	36,5	32,7	27,1	31,6	35,6	39,7	33,5
Rhino_14	26,7	30,8	33,8	35,8	31,8	26,3	30,6	34,3	37,8	32,3
Entero_1	26,6	31,7	34,7	38,5	32,9	26,1	30,2	33,8	36,8	31,8
Entero_2	27,4	32,0	36,3	38,5	33,6	26,5	30,9	33,8	37,3	32,1
Entero_3	27,2	32,1	36,4	37,7	33,4	26,5	30,4	33,5	36,3	31,7
Entero_4	26,9	30,8	34,6	37,9	32,6	26,2	29,9	33,5	34,7	31,1
Entero_5	27,8	31,9	35,0	38,0	33,2	26,4	30,3	33,9	36,5	31,8
Entero_6	27,1	31,3	34,6	36,6	32,4	26,1	30,8	33,7	36,3	31,7
Entero_7	28,4	33,0	35,3	37,6	33,6	27,0	32,2	35,3	37,7	33,0
Entero_8	34,5	39,4	N/A	N/A	36,9	27,9	32,4	34,9	37,9	33,3
Entero_9	26,8	31,1	34,1	37,7	32,4	26,6	31,1	34,3	36,8	32,2
Entero_10	26,7	30,7	34,1	36,3	32,0	26,1	30,1	32,8	36,1	31,3
Entero_11	26,6	30,7	33,8	36,4	31,9	26,0	30,0	33,6	36,3	31,5
Entero_12	26,8	31,6	35,2	38,0	32,9	26,2	30,4	32,7	35,5	31,2
Entero_13	28,1	32,7	36,0	38,9	33,9	26,8	31,2	34,1	36,5	32,2
Entero_14	31,8	37,4	39,9	43,9	38,2	27,7	32,9	36,8	38,8	34,1
Entero_15	36,6	41,9	N/A	N/A	39,3	27,5	32,1	35,8	37,4	33,2
Entero_16	27,5	31,8	34,2	36,5	32,5	26,7	30,7	33,3	35,8	31,6
Entero_17	28,0	32,3	35,5	37,2	33,2	27,2	31,4	34,2	35,5	32,1
Entero_18	28,1	32,6	35,1	36,7	33,1	26,7	31,1	34,2	36,9	32,2
Entero_19	27,4	31,5	34,6	36,7	32,6	26,6	31,2	35,6	37,5	32,7
Polio_1	27,2	31,1	34,2	35,8	32,1	26,4	30,2	33,7	37,0	31,8
Polio_2	27,2	31,1	34,0	36,2	32,1	26,5	31,3	34,8	37,6	32,5
Polio_3	26,8	30,4	34,2	36,6	32,0	26,8	30,2	33,6	36,3	31,5
Polio_4	27,0	31,7	35,3	37,0	32,7	26,1	31,5	33,8	36,3	31,9
Polio_5	27,6	32,3	34,3	38,2	33,1	26,3	31,1	34,4	37,0	32,2

Rhino/Entero AM1:n, AM3:n, AM5:n ja AM6:n Cq-arvot testatuille näytteille

poor performance												mediocre			
Rhino/Entero AM1				Rhino/Entero AM3				Rhino/Entero AM5				Rhino/Entero AM6			
5000 c.	500 c.	50 c.	5 c.	5000 c.	500 c.	50 c.	5 c.	5000 c.	500 c.	50 c.	5 c.	5000 c.	500 c.	50 c.	5 c.
37,4	N/A	N/A	N/A	28,5	35,1	41,1	44,7	27,45	33,3	41,85	N/A	28,52	32,075	35,51	37,08
N/A	N/A	N/A	N/A	37,9	N/A	N/A	N/A	41,62	N/A	N/A	N/A	29,43	33,25	37,215	41
45,1	N/A	N/A	N/A	29,9	37,8	N/A	N/A	26,61	34,15	43,49	N/A	29,395	33,825	38,155	42,67
N/A	N/A	N/A	N/A	34,5	N/A	N/A	N/A	34,065	N/A	N/A	N/A	27,35	30,585	34	36,8
26,8	38,6	N/A	N/A	30,3	40,0	N/A	N/A	27,51	35,85	45,16	N/A	29,61	34,225	38,455	43,15
26,7	35,6	N/A	N/A	43,0	N/A	N/A	N/A	33,1	N/A	N/A	N/A	36,285	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	31,08	34,815	38,425	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	37,715	N/A	N/A	N/A
27,3	39,0	N/A	N/A	29,0	35,5	39,0	N/A	-	-	-	-	28,78	33,83	36,525	39,225
33,1	N/A	N/A	N/A	30,2	39,0	44,4	N/A	-	-	-	-	29,98	34,725	40,055	43,07
26,9	39,2	N/A	N/A	42,2	40,6	#DIV/0!	N/A	-	-	-	-	28,45	33,455	36,195	41,54
26,0	35,1	45,0	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39,8	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,7	32,2	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29,1	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,1	42,3	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29,8	43,0	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,4	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,9	46,0	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,8	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,8	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,3	39,0	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,6	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,2	44,3	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29,6	42,5	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29,2	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,3	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,3	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,5	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,8	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,6	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,8	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,2	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,1	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,0	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29,6	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-