



Nopean PCR-ohjelman soveltuvuus sytomegaloviruksen nukleinihapon määrittämiseen

DyNAmo™ Flash Probe qPCR ja QuantiFast™ Probe
PCR -reagenssien sekä PCR-ohjelmien vertailu

Bioanalytiikan koulutusohjelma
Bioanalyttikko
Opinnäytetyö
20.10.2009

Hanna Kola
Veera Kortelainen

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Hanna Kola ja Veera Kortelainen			
Työn nimi			
Nopean PCR-ohjelman soveltuvuus sytomegaloviruksen nukleiinihapon määrittämiseen, DyNAmo™ Flash Probe qPCR ja QuantiFast™ Probe PCR -reagenssien sekä PCR-ohjelmien vertailu			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syysy 2009	47 + 3 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Sytomegalovirus (CMV) on yleinen herpesviruksiin kuuluva taudinaiheuttaja. Se voi aiheuttaa immuunipuutospotilailla, kuten elinsiirtopotilailla, vaikeita infektioita. Yleisin CMV:n diagnosointiin ja hoidon seurantaan käytetty tutkimus on viruksen nukleiinihapon määrittäminen. Se tehdään kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR -menetelmällä. Viime aikoina markkinoille on tullut uusia nopeampia reagensseja menetelmää varten, nk. fastmixejä.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin HUSLABin virologian osastolle. Työn tarkoituksena oli selvittää, sopiiko Finnzymesin DyNAmo Flash Probe Master Mix tai Qiagenen QuantiFast Probe PCR Master Mix CMV:n nukleiinihapon määrittämiseen lyhyellä PCR-ohjelmalla. Mastermixeistä tutkittiin niiden inhibitionsietoa, herkkyyttä, toimivuutta pakastetuilla templaateilla ja tulosten korrelaatiota Applied Biosystemsien TaqMan Universal PCR Master Mix -reaktioliuoksella saatuihin tuloksiin. Paremmalta vaikuttanut fastmix otettiin mukaan jatkotestaukseen. Nukleiinihapon eristykseen käytettiin Magna Pure LC -laitetta ja PCR-mittauksiin Stratagenen MX3005P-analysaattoria. Jatkotestauksessa määritimme 91 potilasnäytettä ja kaksi toistonäytettä sekä lyhyellä että normaalilla PCR-ohjelmalla.</p> <p>Fastmixit olivat herkkiä ja sietivät hyvin inhibiittoreita. Pakastetuilla templaateilla saadut tulokset olivat ristiriitaiset. Finnzymesin DyNAmo Flash Probe Master Mix:llä oli parempi kvantitaation korrelaatio ja yhteneväisempi tulostasoa TaqMan Universal PCR Master Mix:n kanssa kuin Qiagenen QuantiFast Probe PCR Master Mix:llä. Valitsimme jatkomittauksiin Finnzymesin reagenssin. Jatkomittauksissa Finnzymesin lyhyellä PCR-ajolla ja Applied Biosystemsien normaalilla PCR-ajolla saatujen tulosten korrelaatio oli 0,629. Regressiosuoran kulmakerroin oli 0,76, y-akselin leikkauspiste 24 294 ja selitysaste 0,40. Toistonäytteiden tulosten keskihajonta oli Finnzymesin reagenssilla paljon suurempi kuin Applied Biosystemsien reagenssilla.</p> <p>Tulokset osoittavat, ettei Finnzymesin DyNAmo Flash Probe -reaktioliuos sovellu virologian osastolla CMV:n nukleiinihapon määrittämiseen. Korrelaatio Applied Biosystemsien TaqMan Universal PCR reaktioliuoksen kanssa ei ollut hyvä. Tuloksissa oli paljon hajontaa ja tulostasoa oli selvästi korkeampi.</p>			
Avainsanat			
sytomegalovirus, kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR, fastmix			

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science		Degree Bachelor of Health Care Services
Authors Hanna Kola and Veera Kortelainen		
Title Suitability of Fast PCR for Cytomegalovirus Nucleic Acid Quantitation		
Type of Work Final Project	Date Autumn 2009	Pages 47 + 3 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>Cytomegalovirus is a very common pathogen. It can cause severe infections among patients with low immunocompetence e.g. organ transplant patients. It is commonly diagnosed with the real time PCR cytomegalovirus nucleic acid quantitation. Lately we have been introduced to new reagents that enable faster PCR cycling times. These reagents are called fastmixes.</p> <p>We made our final project for the HUSLAB Department of Virology. Our aim was to find out if it would be possible to use Finnzymes DyNAmo Flash Probe PCR Master Mix or Qiagen QuantiFast Probe PCR Master Mix and shorter PCR programming times for the CMV nucleic acid quantitation. We evaluated their inhibition tolerance, sensitivity, PCR efficiency using frozen templates and correlation with the results obtained with Applied Biosystems TaqMan Universal Master Mix. The Fastmix that gave better results was included to additional measurements. CMV DNA was isolated with MagNA Pure LC system and the quantitation was made with Stratagene Mx3005P real time PCR analyzer. We made additional measurements with 91 patient samples which were analyzed using fast and normal PCR cycling times. To evaluate repeatability we included two samples to all PCR measurements.</p> <p>Fastmixes were sensitive and tolerated well different inhibitors. The results obtained with the frozen templates were controversial. Applied Biosystems TaqMan Universal Master Mix had better correlation with Finnzymes DyNAmo Flash Probe PCR Master Mix than Qiagen QuantiFast Probe PCR Master Mix. We made additional measurements with the Finnzymes reagent. The results of Finnzymes and Applied Biosystems correlated poorly. The value for correlation was $R=0.629$ and for coefficient of determination $Rsq=0.40$. The regression equation had a slope of 0.76 and y-intercept of 24 294. Finnzymes had much larger variation with the standard deviation than Applied Biosystems when measuring repetition samples. These results indicate clearly that it is not possible to use the Finnzymes fastmix for the CMV nucleic acid quantitation.</p>		
Keywords cytomegalovirus, quantitative real-time PCR, fastmix		

TERMEJÄ JA LYHENTEITÄ

aluke	synteettinen DNA-jakso, kiinnittyy monistettavan DNA-jakson viereen (primer)
cutoff	positiivisen tuloksen raja-arvo
dNTP	deoksinukleosidi-5'-trifosfaatti, nukleotidin trifosfaattimuoto
dUTP	nukleotidin trifosfaattimuoto, jossa emäksenä urasiili
FAM	yleisimmin käytetty reportteri koettimen 5'-päässä, karboksifluoresiini (carboxyfluorescein)
fastmix	sama asia kuin mastermix, mutta polymeraasi toimii nopeammin ja tehokkaammin
inhibiittori	estävä tai hidastava tekijä
koetin	leimattu DNA-jakso, joka kiinnittyy etsittyyn sekvenssiin (probe)
mastermix	liuos, joka sisältää PCR-reaktiossa tarvittavat polymeraasin, nukleotidit ja mahdollisen passiivisen referenssivärin sekä polymeraasin toimintaa optimoivan puskurin
perinataali	syntymän aikana tai pian syntymän jälkeen tapahtuva
profylaksia	estolääkitys eli ennaltaehkäisevä lääkehoito
qPCR	kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
reportteri	signaalia lähettävä leima koettimessa (reporter)
ROX	yleisimmin käytetty passiivinen referenssiväri, jolla normalisoidaan reportterin signaali, karboksi-x-rodamiini (carboxy-x-rhodamine)
TAMRA	yleisimmin käytetty vaimennin koettimen 3'-päässä, karboksitetrametyylirodamiini (carboxytetramethylrhodamine)
tegumentti	viruksen nukleokapsidin ja vaipan väliin jäävä heterogeeninen tila
templaatti	DNA-jakso, joka toimii polymeraasin mallina vastinjuostetta syntetisoitaessa
tropismi	kertoo solutyypin, jossa virus pystyy replikoitumaan
UNG	urasiili-N-glykosylaasientsyymi
vaimennin	vaimentaa reportteria, kiinni koettimen toisessa päässä (quencher)

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	SYTOMEGALOVIRUS	2
2.1	Sytomegaloviruksen genomi ja replikaatiosykli	3
2.2	Sytomegalovirusinfektio ja latenssi	4
2.3	Sytomegaloviruksen diagnostiikka	6
3	MENETELMÄT JA REAGENSsit	7
3.1	DNA:n eristäminen	7
3.2	Polymeraasiketjureaktio PCR	9
3.3	Reaaliaikainen PCR ja TaqMan-kemia	9
3.4	Vertailtavat mastermixit	15
3.5	Inhibitiopaneeli	16
4	TUTKIMUSONGELMAT	17
5	TYÖN SUORITTAMINEN	19
5.1	Aineiston valinta	19
5.2	Mittausten suoritus	21
5.3	Mittausasetukset	23
6	TULOKSET	24
6.1	Vertailu kahden fastmixin välillä	24
6.1.1	Inhibitiopaneeli	25
6.1.2	Herkkyys	26
6.1.3	Pakastetut templaattit	27
6.1.4	Kvantitaation korrelaatio	28
6.1.5	Toisen fastmixin valinta jatkotutkimuksiin	30
6.2	Vertailu Applied Biosystems mastermixin ja valitun fastmixin välillä	31
6.2.1	Korrelaatio mastermixien ja ajo-ohjelmien välillä	31
6.2.2	Toistonäytteet	34
6.2.3	Standardisuorien vertailu	36
6.2.4	Kvalitatiivinen sensitiivisyys ja spesifisyys	37
7	TYÖN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	39
8	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	41
	LÄHTEET	45
LIITTEET	Mittausten tulokset	
	Laitteet ja reagenssit	
	Sytomegaloviruksen nukleinihapon määrittäminen	

1 JOHDANTO

Sytomegaloviruksen (CMV) aiheuttama infektio on hyvin yleinen ja suomalaisista noin 75% on sairastanut sen. Herpesviruksille tyypillisesti virus jää elimistöön latentiksi ja voi aktivoitua myöhemmin. Henkilöillä, joiden immuunipuolustus on normaali, reaktivaatio on lieväoireinen tai jopa oireeton, mutta immuunipuutteisilla potilailla infektiot ovat huomattavasti vaikeampia. Immuunipuutos voi johtua muun muassa HIV-infektiosta, syöpähoidon sytostaateista tai elinsiirtoon liittyvästä hyljinnänestolääkityksestä.

CMV-tutkimuksia tehdään eniten elinsiirtojen yhteydessä. Luovuttajan ja vastaanottajan serologinen tila selvitetään ja elinsiirron jälkeen tutkimuksia tehdään immunosuppression aiheuttamien infektioiden selvittelyssä. CMV-infektion diagnosointiin ja hoidon seurantaan käytetään nykyään yleensä kvantitatiivista reaaliaikaista polymeraasiketjureaktiota eli qPCR-menetelmää. Se on geenimonistusmenetelmä, jossa halutun geenisekvenssin monistumista ja sen aiheuttamaa signaalia mitataan koko monistusohjelman ajan.

Opinnäytetyössämme testaamme CMV:n tutkimisessa HUSLABilla käytössä olevan Applied Biosystems'in TaqMan Universal Master Mix -liuoksen ja kahden niin kutsutun Fast Mix -liuoksen soveltuvuutta reaaliaikaiseen nopeaan PCR-menetelmään. Liuoksista käytetään kirjoitettaessa yleisesti muotoja mastermix ja fastmix. Käytämme näitä muotoja myös omassa kirjoituksessamme. Mastermix sisältää kaikki PCR-reaktioon tarvittavat ainesosat lukuun ottamatta templaattia, alukkeita ja koetinta. Testattavat liuokset ovat Qiagenin QuantiFast™ Probe PCR Master Mix ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Master Mix. PCR-mittaukset teemme Stratagenen Mx3005P-laitteella. Työ tehdään kahdessa vaiheessa, joista ensimmäisen jälkeen karsimme toisen fastmixin pois.

Teemme opinnäytetyömme virologian osastolle, joka kuuluu HUSLABin mikrobiologian vastuualueeseen. CMV:n nukleiinihappo-osoituksen näytemäärät ovat kasvaneet ja kerran viikossa joudutaan tekemään kaksi sarjaa yhden päivän aikana, jotta vastaukset saadaan valmiiksi. Tutkimus on aikaavievä ja joskus työntekijöillä tulee kiire saada sarjat valmiiksi saman päivän aikana. Tällä hetkellä käytössä olevaan ajo-ohjelmaan verrattuna ajoaika lyhenisi fastmixillä noin puoleen.

2 SYTOMEGALOVIRUS

Sytomegalovirus kuuluu beetaherpesvirusten ryhmään ja se on hyvin yleinen ihmisen patogeeni. Ensimmäisen elinvuoden aikana 20–40 % saa infektion ja aikuisiässä vallitsevuus vaihtelee väestöittäin. Joissain osissa Afrikkaa se on lähes 100 %, Euroopassa 60 % ja Suomessa noin 75 %. Suurin osa väestöstä on sairastanut infektion aikuisikään mennessä. Herpesviruksille luonteenomaisesti se jää infektion jälkeen elimistöön latentiksi. (Ylipalosaari 2000; Hukkanen – Suni – Lautenschlager – Linnavuori 2005: 487.)

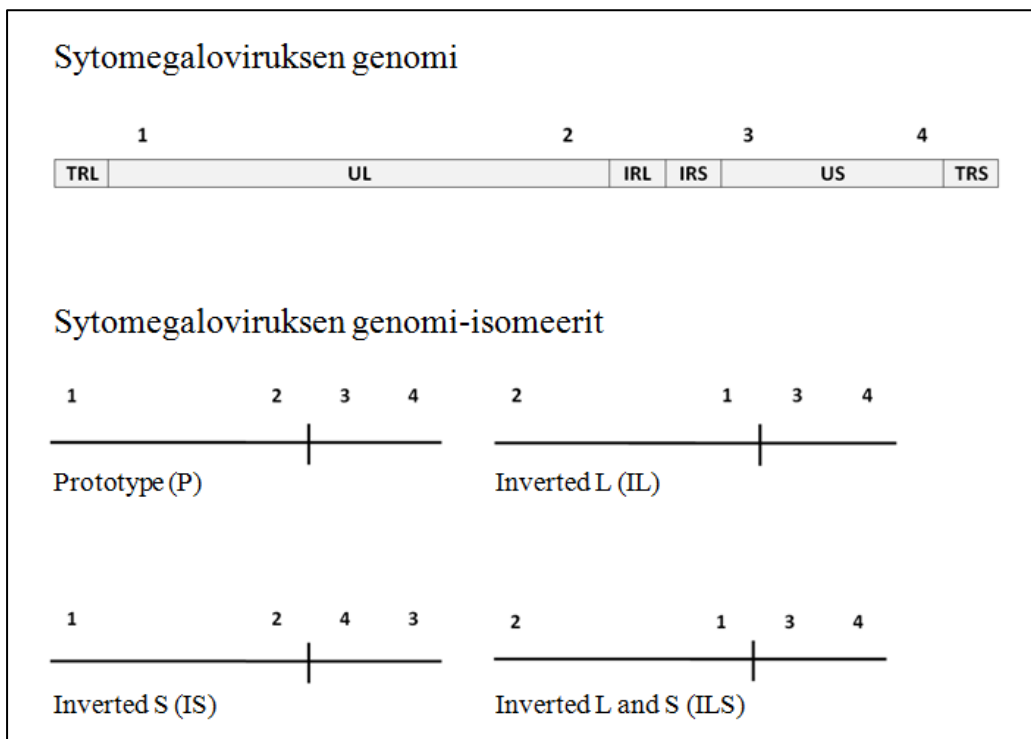
Herpesviruksia tunnetaan yli sata, mutta ihmistä infektoivia viruksia on vain kahdeksan. Herpesvirusten ominaisuuksia ovat lineaarinen kaksisäikeinen DNA-genomi, jota ympäröi ikosahedraalinen nukleokapsidi sekä vaippa. Nukleokapsidin ja vaipan väliin jää tegumenttiosa. Tegumenttiosassa on virusproteiineja, joiden tehtävästä ei olla yksimielisiä. Herpesvirukset jaetaan kolmeen ryhmään ominaisuuksiensa perusteella ja CMV kuuluu beetaherpesviruksiin (ks. taulukko 1). Beetaherpesvirusten replikaatiosykli on pitkä (CMV noin 72h) ja niiden tropismin kuuluu useampi solutyyppeihin. Viruksen vaikutuksesta solut suurenevat ja tästä on peräisin CMV:n nimi (sytomegalia). CMV on suuri virus, jonka halkaisija on keskimäärin 215nm ja genomien pituus 230kb. (Hukkanen et al. 2005: 463, 485–486; Herpesviruses; The human cytomegalovirus 272, 278.)

TAULUKKO1. Ihmistä infektoivat herpesvirukset ja niiden ryhmät.

Herpesvirus	Virusryhmä
Herpes simplex-1 (HSV-1)	Alfaherpesvirus
Herpes simplex-2 (HSV-2)	Alfaherpesvirus
Varicella zoster virus (VZV)	Alfaherpesvirus
Sytomegalovirus (CMV)	Beetaherpesvirus
Herpes lymphotropic virus (HHV-6)	Beetaherpesvirus
Human herpes virus-7 (HHV-7)	Beetaherpesvirus
Human herpes virus-8 (HHV-8)	Gammaherpesvirus
Epstein-Barr virus (EBV)	Gammaherpesvirus

2.1 Sytomegaloviruksen genomi ja replikaatiosykli

Sytomegaloviruksen genomissa on UL- ja US-alueet (unique long, unique short) sekä TRL- ja TRS-toistojaksot (terminal repeat long, terminal repeat short) genomien päissä. Lisäksi sen keskellä on IRL- ja IRS-jaksot (internal repeat long, internal repeat short), joiden kohdalta genomi voi katketa. UL- ja US-jaksot voivat olla kahdessa eri orientaatioissa, minkä ansiosta virus voi tuottaa neljää eri genomi-isomeeriä (ks. kuvio 1). CMV:n genomilla on kapasiteetti tuottaa yli 200 proteiinia. (The human cytomegalovirus 272; Ylipalosaari 2000.)



KUVIO 1. Sytomegaloviruksen genomien rakenne ja genomi-isomeerien orientaatiot.

Sytomegalovirus pääsee soluun membraanifuusion avulla. Sen gB-glykoproteiini (gpUL55) tarttuu solukalvon heparaanisulfaattiproteoglykaaneihin (HSPG) ja signaalintäjäjärjestelmän lopuksi solukalvo ja viruksen vaippa fuusioituvat. Endosytoosirakkula hajoaa pH-riippuvaisen mekanismin viimeisessä vaiheessa ja nukleokapsidi vapautuu sytoplasmaan. Vapautunut nukleokapsidi kuljetetaan mikrotubulustukirankaa hyväksi käyttäen tumakalvolle. Genomi siirtyy tumaan tumakuljetuksen avulla. (The human cytomegalovirus 273–274.)

Transkriptio, replikaatio ja kapsidin kokoaminen tapahtuvat tumassa. Viruksen genomista ilmentyvät ensiksi IE-geenit (immediately early), joiden geenituotteet säätelevät isäntäsolun geeniekspressiota sekä toimintaa ja niitä tarvitaan viruksen genomien replikaatioon. Ne ovat myös välttämättömiä myöhempien geenien ilmentymiseen. Nämä geenituotteet muun muassa estävät solun MHC1-molekyylien kulkeutumisen solun pinnalle, minkä seurauksena T-solut eivät pysty tunnistamaan infektoitunutta solua. Eräs proteiini pysäyttää isäntäsolun solusyklin varhaiseen S-vaiheeseen. Tässä vaiheessa isäntäsolu tuottaa DNA-synteesiin tarvittavia aineita, mutta ei pysty käyttämään niitä ja virus hyödyntää ne. (The human cytomegalovirus 274, 276.)

Seuraavaksi koodattavat E-geenien (early) proteiinit ovat välttämättömiä viruksen genomien monistamisessa. Ne ovat pääasiassa viruksen replikaatioon tarvittavia tekijöitä, korjausentsyymejä ja immuunipuolustuksen välttämiseen tarvittavia proteiineja. L-geenituotteet (late) ovat lähinnä rakenneproteiineja ja kapsidin kokoamiseen tarvittavia proteiineja. (The human cytomegalovirus 274, 276, 278.)

Kapsidin kokoaminen ja DNA:n pakkaaminen tapahtuvat tumassa. Virus saa primaarisen vaipan poistuessaan tumasta, mutta se hajotetaan tumakalvostossa. Paljas nukleokapsidi hankkii tegumentin solulimassa ja vaipansa se saa Golgin laitteesta. Kypsä virioni poistuu solusta eksosytoosilla. Virusten poistuessa isäntäsolu kuolee. Joihinkin soluihin virus voi jäädä latentiksi infektioksi. (The human cytomegalovirus 278; Herpesviruses.)

2.2 Sytomegalovirusinfektio ja latenssi

Virus voi tarttua joko yksilöstä toiseen tai äidistä sikiöön. Äidin infektiosta välittyy sikiöön istukan kautta. Perinataalinen tartunta saadaan synnytyksessä genitaalieritteistä tai imettäessä äidinmaidosta. Myöhemmät tartunnat saadaan todennäköisesti syljen tai seksin välityksellä. Virus tarttuu myös veriteitse, jolloin sen voi saada verensiirroissa ja elinsiirroissa. Tartuntavaaraa voidaan pienentää poistamalla valkosolut verivalmisteista. Suurin osa Suomen aikuisväestöstä on sairastanut CMV-infektion ja on viruksen kantajia. Väestön seropositiivisuus on noin 75 %. (Hukkanen et al. 2005: 486–487.)

CMV aiheuttaa systeemisen infektion. Leukosyytit voivat kuljettaa viruksen verenkierron mukana kaikkialle elimistöön. Terveellä henkilöllä infektiio on yleensä lieväoireinen. Vaikeita oireita havaitaan synnynnäisissä infektioiden ja immuunipuotopotilailla. Virus voi infektoida kaikkia siirrettäviä kudoksia. Erityisen herkkiä tartunnalle ovat maksa, keuhkot ja suoli. (Hukkanen et al. 2005:486.)

Primaarisen CMV-infektion jälkeen virus jää elimistöön latentiksi ja voi aktivoitua myöhemmin esimerkiksi elimistön alentuneen puolustuskyvyn takia. Infektion voi saada uudestaan myös toisen viruskannan aiheuttamana. Latenssin ja aktivoitumisen mekanismeja ei tunneta kovin hyvin. Latentin infektion aikana isäntäsolu ei tuota virusproteiineja. Latenssin aikana viruksen arvellaan piilevän monosyyteissä sekä verisuonten endoteelisoluissa, munuaisten epiteelisoluissa ja sylkirauhasen soluissa. (Hukkanen et al. 2005: 486; Ylipalosaari 2000.)

Synnynnäinen infektiio aiheuttaa oireita 0,1 %:lle syntyneistä lapsista vuodessa. Oireet voivat olla vakavia neurologisia oireita ja keskushermoston kehityshäiriöitä tai ilmetä esimerkiksi sikiön hitaana kasvuna, mikrokefalia, ikteruksena, verkkokalvontulehduksena ja henkisen kehityksen hidastumisena. Perinataali-infektiio saadaan synnytyksessä tai pian sen jälkeen ja se on yleensä oireeton. CMV-infektiio sairastetaan usein murrosikään mennessä ja taudinkuva muistuttaa mononukleoosia. Myöhemmin sairastetun infektion oireena on lähinnä lievä pitkittynyt kuume. (Hukkanen et al. 2005: 488–489.)

Immuunipuotopotilailla infektion merkitys on huomattava. Immuunipuutostila voi olla seurausta muun muassa HIV-infektiosta, syöpähoidon sytostaateista tai elinsiirtoon liittyvästä hyljinnänestolääkityksestä. Primaari- ja uusintainfektion taudinkuvat vaihtelevat oireettomasta hengenvaaralliseen. Infektion vaikeus on suunnilleen verrattavissa immunosuppression voimakkuuteen ja se on suurin luuydinsiirto- ja AIDS-potilailla. Vakavin taudinkuva on pneumoniitti ja sen yhteydessä kuolleisuus on suuri. (Hukkanen et al. 2005: 487–489; The human cytomegalovirus 284.)

Elinsiirroissa CMV vaikuttaa potilaan ja siirännäisen ennusteeseen. Se voi infektoida siirteiden ja aiheuttaa taudin. Se lisää myös hylkimistaipumusta ja liittyy käänteislyöntään luuydinsiirroissa. Infektioiden esiintyvyys immunosuppressiopotilailla on 30–100%. Esiinty-

vyys on sitä yleisempää mitä voimakkaampaa immunosuppressio on. (Hukkanen et al. 2005: 487–489; The human cytomegalovirus 284.)

Yleensä pyritään siihen, että seronegatiiviselle ei siirrettäisi elintä seropositiiviselta henkilöltä, koska primaari-infektion vaara on suuri. Infektio on heillä vakavampi kuin seropositiivisilla, jotka ovat saaneet seropositiivisen siirteen. Infektioita pyritään estämään seronegatiivisilla luovuttajilla, profylaksialla ja valkosoluttomilla verituotteilla. (The human cytomegalovirus 279; Ylipalosaari 2000.)

CMV:tä vastaan on yritetty kehittää rokotetta, mutta vielä siitä ei ole saatu tarpeeksi tehokasta ja turvallista. Infektiota voidaan hoitaa gansikloviirilla, foskarneetilla ja sidofoviirilla. Gansikloviiria käytetään myös joissain tapauksissa profylaksiassa. Lääkkeillä on sivuvaikutuksia (luuydin- ja munuaistoksisuus) ja virus voi kehittää resistenssin niitä vastaan. (The human cytomegalovirus 287–288.)

2.3 Sytomegaloviruksen diagnostiikka

Sytomegaloviruksen läsnäolo voidaan todeta monin eri tavoin. Viruksen aiheuttama retiniitti voidaan havaita verkkokalvon muutoksista, mutta muiden tautien diagnosointi vaatii viruksen eristämisen, virustuotteiden havaitsemisen tai spesifien vasta-aineiden osoituksen. Virus voidaan diagnosoida antigeeni- ja vasta-aineosoituksella, DNA-määrittelyllä sekä virusviljelyllä. Immuunipuutteisen potilaan infektion osoittamiseen suositellaan ensisijaisesti DNA-määrittelyä ja muiden tutkimusten teko on vähentynyt. Viljely on kuitenkin välttämätön, kun halutaan tutkia viruksen antiviraaliresistenssiä. (Herpesviruses; Tutkimusohjekirja.)

Viljelyssä CMV:n läsnäolo voidaan osoittaa immunofluoresenssitekniikalla. Viljelyt ovat hitaita ja pikaviljelykin vie vähintään vuorokauden. Viljely on hyödyllinen immuunipuutteisilla potilailla, jotka eivät tuota vasta-aineita normaalisti. Viljelyt ovat käyttökelpoisempia alfa herpesvirusten diagnosointiin, koska niiden replikaatiosykli on nopeita. (Hukkanen et al. 2005: 490–492; Herpesviruses.)

Antigeenin osoittaminen on nopeaa ja sillä pyritään osoittamaan CMV-pp65-antigeeni potilaan valkosoluista. Vasta-ainemääryksiä käytetään lähinnä primaari-infektion ja CMV-kantajuuden toteamiseen. DNA:n kvalitatiivinen osoitus paljastaa myös latentit infektiot. Kvantitatiivista määrittystä käytetään taudin diagnostiikassa ja antiviraalisen hoidon seurannassa. Kohonnut nukleiinihapon määrä merkitsee aktivoitunutta infektiota ja kopioiden määrä on suhteessa infektion vakavuuteen. (Hukkanen et al. 2005: 490–492.) Yhteyden ymmärtämisen jälkeen nukleiinihapon määrittäminen reaaliaikaisella PCR:llä on yleistynyt elinsiirtopotilaiden CMV-infektion diagnostiikassa ja hoidossa (Piiparinen – Lautenschlager 2006: 148).

3 MENETELMÄT JA REAGENSIT

CMV-nukleiinihapon kvantitatiiviseen osoittamiseen käytetään reaaliaikaista geenimonistumenetelmää. Reaaliaikaisen PCR:n etuina on, että tuotteen monistumista seurataan koko reaktion ajan, eikä lopputuotetta tarvitse osoittaa muulla tavoin, esimerkiksi ajamalla agarosigeelillä. Lisäksi näytteiden väliset pitoisuuserot havaitaan helposti. Ennen monistusta haluttu nukleiinihappo täytyy eristää huolellisesti. Näytteen käsittelyssä on varottava kontaminaatioita, koska monistuksen aikana muutamakin ulkopuolinen viruspartikkeli voi aiheuttaa merkitsevän positiivisen tuloksen.

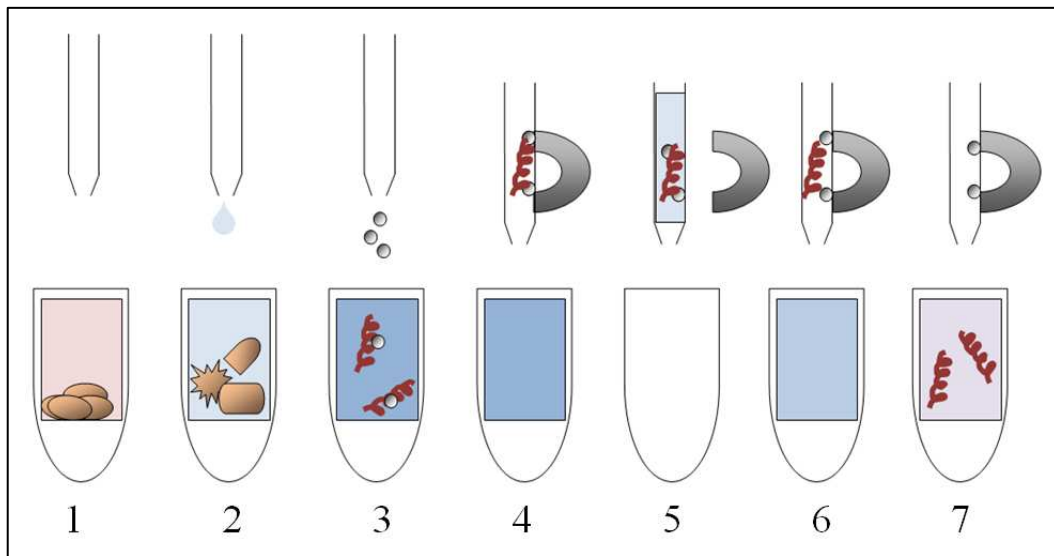
3.1 DNA:n eristäminen

Ennen kuin näytteestä voidaan mitata CMV-nukleiinihappopitoisuus, on virus-DNA eristettävä solun sisältä ja PCR-reaktiota häiritsevät epäpuhtaudet poistettava. Templaatin puhtaus on erittäin merkittävä tekijä onnistuneessa kvantitatiivisessa PCR:ssä (Bustin – Nolan 2004b: 143–144). DNA:n eristämiseksi ja puhdistamiseksi on eri tapoja, kuten fenolikloroformiuutto, etanoli- ja isopropanolisaostus ja silikapylväs menetelmä. (Suominen – Ollikka 2003: 61, 64–65.)

Eristämme DNA:n Rohen MagNA Pure LC -analysointilaitteella käyttäen MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation -pakkausta. MagNA Pure LC:n toiminta perustuu magneettihelmitekniikkaan. Vapautunut DNA sitoutuu silikalla päällystettyihin magneettihelmiin ja

siitä pestään epäpuhtaudet pois. Lopuksi DNA eluoidaan helmistä puskuriin. Analysointirilla voidaan ajaa kerralla 32 näytettä, jolloin eristysohjelma kestää 1h 30min.

Magneettihelmitekniikka on esitetty kuviossa 2. Menetelmän vaiheet ovat numeroituna kuviossa. Lyysis- ja proteinaasi K -puskuri hajottavat näytteessä olevat solut ja denaturoivat vapautuneet nukleaasit ja proteiinit (1,2). Näytteeseen lisätään magneettihelmiä, jotka on päällystetty silikapinnoitteella. DNA sitoutuu helmiin emäksisessä liuoksessa kaotrooppisen suolan (guanidinium-HCl), isopropanolin ja korkean ionivahvuuden vaikutuksesta (3). Suola poistaa veden helmen pinnalta ja muuttaa nukleiinihappojen kolmiulotteista rakennetta niin, että ne tarttuvat helmien pinnoitteeseen. (MagNA Pure LC 2.0 System.)



KUVIO 2. Magneettihelmitekniikka.

Magneettihelmet ja niihin sitoutunut DNA poistetaan näytekuopasta magneetin avulla (4). Pesujen aikana näytteestä poistuu sitoutumattomia aineita (nukleaasit, solumembraanit, hepariini, hemoglobiini) ja kaotrooppisen suolan pitoisuus pienenee (5). Pesujen jälkeen DNA poistetaan jälleen näytekuopasta ja eluoidaan 70 °C:ssa irti helmistä (6,7). (MagNA Pure LC 2.0 System.)

3.2 Polymeraasiketjureaktio PCR

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (polymerase chain reaction) on geenimonistusmenetelmä, jossa monistetaan kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välistä aluetta. PCR-menetelmä on kehitetty 1980-luvulla ja siinä hyödynnetään lämpöä kestäviä DNA-polymeraaseja, joita on saatu muun muassa kuumissa lähteissä elävistä bakteereista. Suosituin näistä on Taq-polymeraasi, joka on eristetty *Thermus aquaticus* -bakteerista. Polymeraasien on kestävä toimintakykyisinä noin 100 °C:n lämpötiloja. (Suominen – Ollikka 2003: 107.)

PCR-reaktiossa käytetään spesifisiä alukkeita, jotka kiinnittyvät monistettavaksi halutun geenialueen molempiin päihin DNA:n eri juosteisiin. Kun osoitetaan virussairauksia, käytetään alukkeita, jotka rajaavat vain kyseiselle virukselle ominaisen DNA-jakson (Suominen – Ollikka 2003: 113.)

PCR-reaktion alussa kaksijuosteinen DNA denaturoidaan kuumentamalla se noin 95 °C:een. Alukkeet kiinnittyvät vain yksijuosteiseen DNA:han. Kiinnittyminen tapahtuu noin 60 °C:n lämpötilassa ja vaihetta kutsutaan annealing-vaiheeksi. Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa nostetaan noin 72 °C:een, entsyymistä riippuen, jolloin polymeraasi aktivoituu ja templaatin pidennysreaktio eli ekstensiovaihe alkaa. Polymeraasi liittyy reaktioseoksessa olevia nukleotideja 3'-pään alukkeeseen DNA-juosteen mallin mukaisesti ja etenee kohti 5'-päättä. Molemmille DNA-juosteille syntyy oma vastinjuoste. Pidennysreaktion jälkeen lämpötila nostetaan noin 95 °C:een, jolloin juuri syntetisoidut juosteet denaturoituvat. Syklejä toistetaan useita kertoja, jolloin alkuperäisestä DNA-määrästä saadaan monistettua suuri määrä tiettyä DNA-jaksoa. Tyypillinen monistuskerroin on noin 10^6 . Syklejä toistetaan yleensä 15–40 kertaa. (Suominen – Ollikka 2003: 107–108.)

3.3 Reaaliaikainen PCR ja TaqMan-kemia

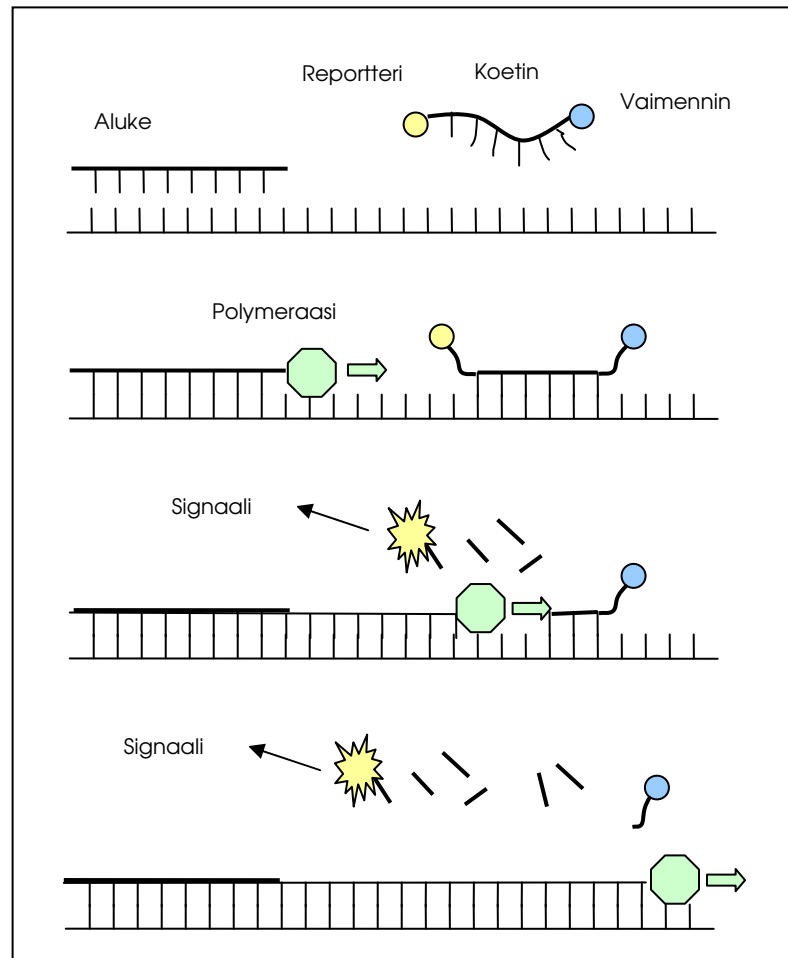
Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR:ssä (qPCR) saadaan virusmäärälle numeerinen arvo fluoresenssisignaalin avulla (Shiplely 2006: 3). Monistettava tuote havaitaan fluoresenssina samaan aikaan kun monistuminen tapahtuu. Mitä aiemmin fluoresenssi havaitaan, sitä

enemmän alkuperäisessä näytteessä on ollut monistettavaa nukleiinihappojaksoa. (Bustin – Nolan 2004a: 217–218; qPCR Technical Guide 2009: 2.)

Fluoresenssia syntyy, kun valo absorboituu reportteriin ja atomi virittyy eli elektroni siirtyy ylemmälle kuorelle. Elektroni pysyy virittyneenä $1-10 \cdot 10^{-8}$ sekunnin ajan, jonka jälkeen se palaa perustasolleen. Viritystilän purkautuessa syntyy fotoni ja fluorimetri mittaa niiden määrän. (qPCR Technical Guide 2009: 3.)

Yleisin kvantitatiivisessa PCR:ssä käytetty menetelmä on niin sanottu TaqMan-menetelmä, joka on kehitetty jo vuonna 1991 (Bustin – Nolan 2004a: 244). TaqMan-koettimessa on tavallisimmin 5'-päässä fluoresoiva reportteriosa ja 3'-päässä reportteria vaimentava vaimennosa. Reportterina käytetty fluoresenssiväri on yleensä FAM (carboxy fluorescein). Vaimennin voi olla joko fluoresoiva aine tai mikä tahansa sopivalla aallonpituusalueella valoenergiaa absorboiva molekyyli. Perinteisesti vaimentimena on käytetty TAMRA-molekyyliä (carboxy-tetra-methylrhodamine). TAMRA vaimentaa FAM:n signaalin, kun ne ovat lähekkäin koettimeen kiinnittyneinä. Vaimenemisen saa aikaan ilmiö nimeltä FRET (fluorescence resonance energy transfer), jossa reportterin viritystila ei purkaudukaan fluoresenssina, vaan siirtyy vaimentimelle. Vaimentimen fluoresenssi ilmenee eri aallonpituudella kuin reportterin, joten se havaitaan vain matalana taustasäteilynä. (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol 2002: 1-2 - 1-3; Shipley 2006: 11; Bustin – Nolan 2004a: 244 – 245.)

Jos PCR:ssä muodostuu koettimen kohdesekvenssiä, koetin sitoutuu siihen. Samalla kun *Taq*-polymeraasi tekee templaatile vastinjuostetta, se myös pilkkoo koettimen (ks. kuvio 3). Tämän seurauksena reportteri pääsee kauemmas vaimentimesta ja reportterin fluoresenssisignaali tulee esiin. DNA:n monistuminen havaitaan fluoresenssin lisääntymisenä. Jos näytteessä ei ole koettimelle sopivaa sitoutumiskohtaa, koetin pysyy liuoksessa ehjänä ja fluoresenssi pysyy matalana taustasäteilynä. (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol 2002: 1-2 - 1-3; Bustin – Nolan 2004a: 244 – 245.)

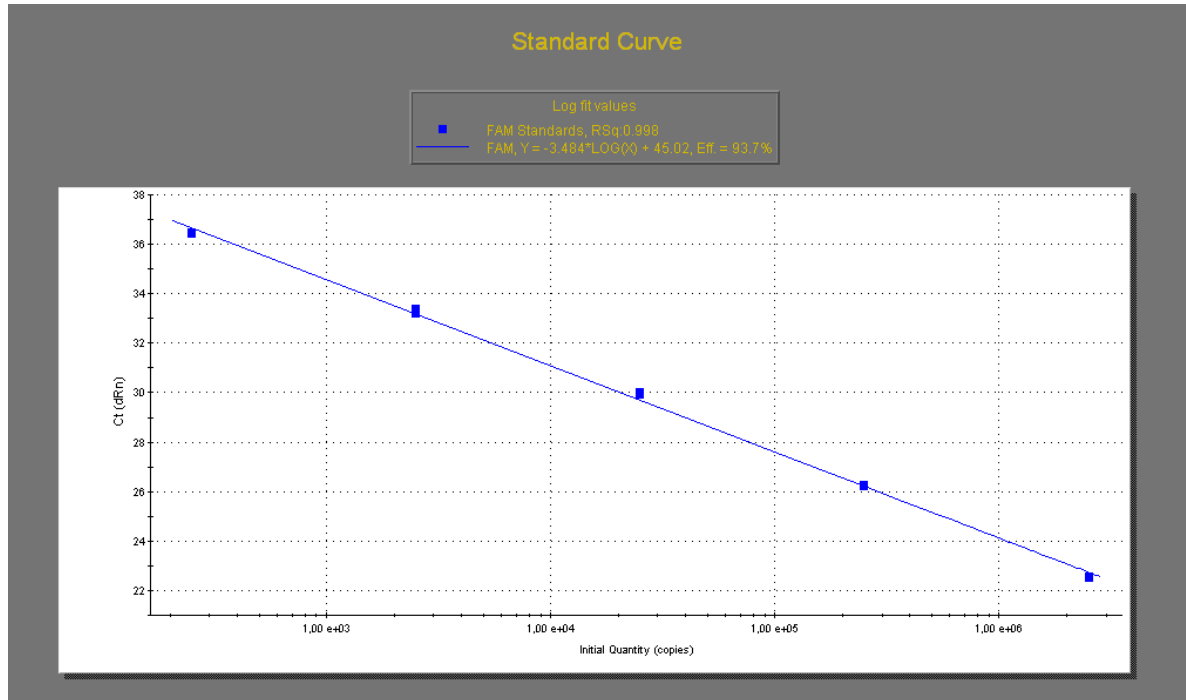


KUVIO 3. TaqMan-menetelmän periaate. Auke ja koetin kiinnittyvät DNA-juosteeseen. Polymeerasi syntetisoi uutta juostetta alukkeesta lähtien ja pilkkoo samalla koettimen. Reporterin ja vaimennin loittonevat toisistaan, jolloin reporterin signaali tulee esiin.

Reaaliaika-PCR-laitteessa on yhdistettynä lämpöblokki, valonlähde ja fluorimetri. Fluorimetri kerää valon optisen ikkunan läpi PCR-kammiosta. Jokaisen syklin aikana tehdään yksi mittausta, joko pidennysreaktion tai alukkeiden kiinnittymisvaiheen jälkeen. Näin voidaan seurata yksittäisen reaktion kehitystä. Sykliä, jolloin fluoresenssi ylittää taustasäteilyn, kutsutaan Ct-arvoksi (threshold cycle). Arvo on sitä pienempi mitä suurempi genomipitoisuus alkuperäisessä näytteessä on. (Bustin – Nolan 2004c: 332–333.)

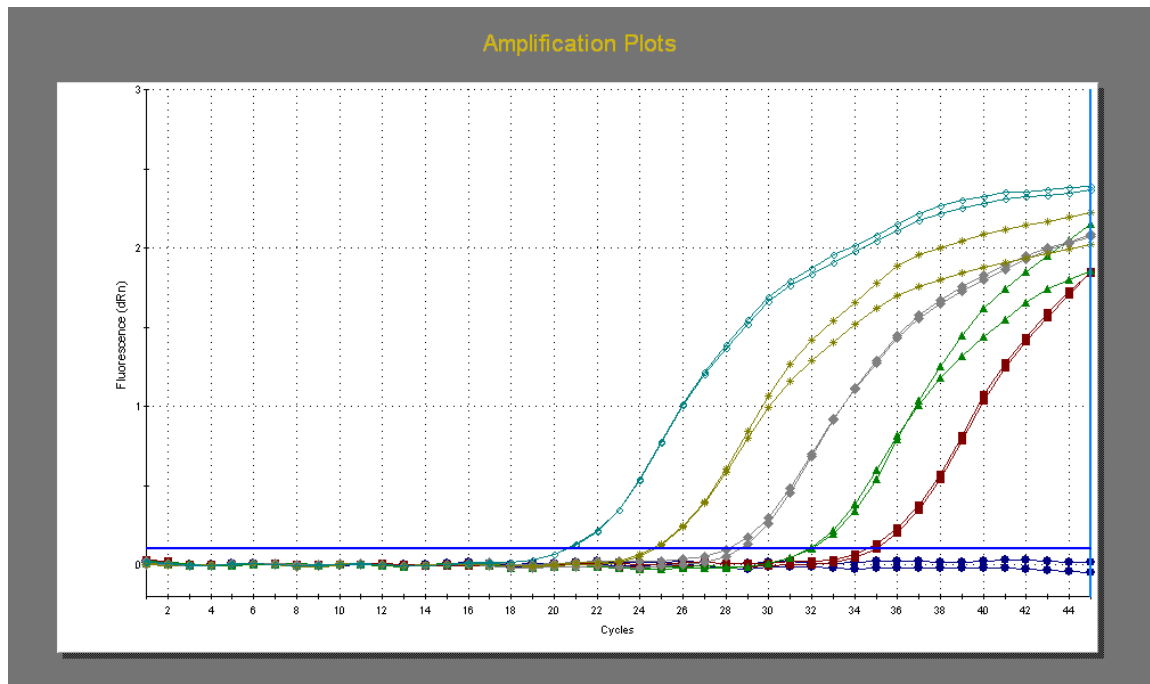
Jotta näytteessä oleva kopiomäärä saadaan selville, tehdään standardisuora määrittämällä näytteitä, joiden pitoisuus tunnetaan. Suoran avulla saadaan selville tietyn kopiomäärän sisältävän näytteen Ct-arvo. Tämän jälkeen tuntemattomien näytteiden pitoisuus saadaan sel-

ville sijoittamalla ne standardisuoralle Ct-arvojen perusteella ja katsomalla vastaavat pitoisuudet kuviosta. (Bustin – Nolan 2004c: 332–333.) Kuviossa 4 on esimerkki standardisuorasta.



KUVIO 4. Standardisuora. Y-akselilla on Ct-arvo ja x-akselilla pitoisuus.

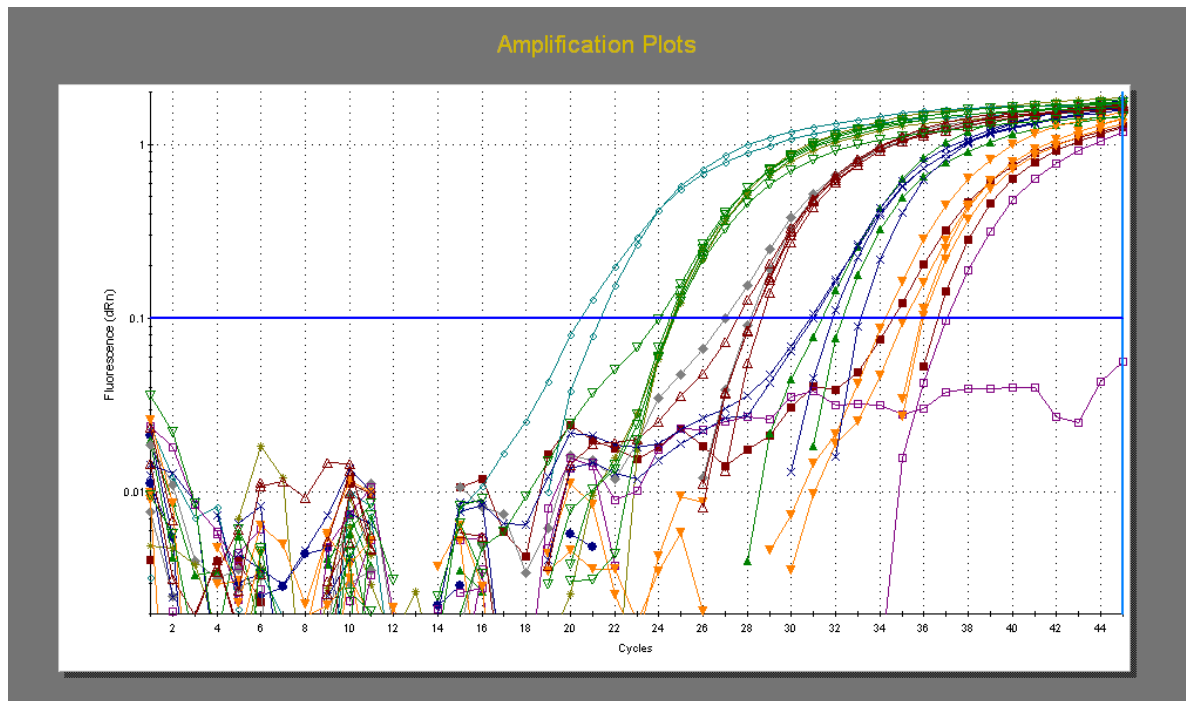
Monistumisessa on havaittavissa neljä vaihetta. Monistuskäyrästä eli amplifikaatiokäyrästä on esimerkki kuviossa 5. Aluksi monistettavaa tuotetta on niin vähän, ettei laite pysty sitä havaitsemaan, ja monistuskäyrä pysyy taustasäteilyn (baseline) tasolla. Monistuminen on kuitenkin eksponentiaalista tässäkin vaiheessa. Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa fluoresenssin signaali havaitaan ensimmäisen kerran ja monistuminen on kaikkein tehokkainta. Ideaalitapauksessa monistumisen tehokkuus on 100% jolloin jokaista templaattia kohti monistuu yksi kopio. Monistuskäyrän signaalin taso nousee tässä kohtaa ensimmäisen kerran taustasäteilyn yläpuolelle. Seuraavassa eli lineaarisessa vaiheessa monistumien alkua vähentyä ja monistuskäyrä nousee lineaarisesti. Plateau-vaiheessa monistuminen lakkaa kokonaan. Monistuskäyrä on tasainen ja signaali pysyy muuttumattomana. (Shipley 2006: 9; qPCR Technical Guide 2009: 2.)



KUVIO 5. Monistuskäyrä lineaarisella asteikolla. Kynnystaso on asetettu eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen, jolloin fluoresenssisignaali ensimmäisen kerran ylittää taustasäteilyn tason

Ct-arvo määrittyy sen mukaan, mihin kohtaan kynnystaso (thresholdline) asetetaan. Kynnystason tulisi olla taustasäteilyn yläpuolella eksponentiaalisen kasvun alueella. Amplifikaatiokäyriä voidaan tutkia joko lineaarisella tai puolilogaritmisella asteikolla. Puolilogaritmisessa kuvaajassa (kuvio 6) eksponentiaalisen kasvun vaihe on lineaarinen ja kynnystaso asetetaan sen alueelle. (qPCR Technical Guide 2009: 2.)

PCR-menetelmässä käytetään usein passiivista referenssiväriä, joka on yleisimmin ROX (carboxy-X-rhodamine). Referenssivärin avulla varmistetaan, että kuoppien signaalit ovat verrattavissa keskenään. Eroja kuoppien välille voi tulla esimerkiksi laitteen epätasaisesta signaalinhavaitsemiskyvystä tai pipetointivirheistä. Jokaisesta kuopasta monitoroidaan ROX-signaali ja erot korjataan normalisoimalla eli jakamalla FAM-signaali ROX-signaalilla. (Shipley 2006: 12.)



KUVIO 6. Monistuskäyrä puolilogaritmisella asteikolla. Kynnystaso on asetettu eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen, joka puolilogaritmisella asteikolla on lineaarisen mallinen.

PCR-menetelmä on herkkä kontaminaatioille. Kontaminaatiot ovat virus-DNA:ta, jotka eivät ole peräisin potilasnäytteestä. Ne voivat olla peräisin reagensseista tai epätarkasta pipetoinnista. Näyte voi kontaminoitua myös näytteenoton yhteydessä. Yksi mahdollinen kontaminoiva tekijä on myös aikaisemmasta ajosta peräisin oleva PCR-tuote. Jotkin mastermixit mahdollistavat UNG-käsittelyn, jolla nämä aiemmista ajoista peräisin olevat PCR-tuotteet pystytään tuhoamaan. Näissä mastermixeissä on UNG-entsyymi (uracil-N-glykosylase) ja dUTP (deoxyuridine triphosphate), joka voi korvata dTTP:n osittain tai kokonaan. Markkinoilla on myös mastermixejä, jotka sisältävät dUTP:n, mutta eivät UNG-entsyymiä. Näihin entsyymi täytyy lisätä erikseen, jos sitä halutaan käyttää. (Scott Adams 2006: 54; DyNAmo Flash Probe qPCR Kit Instruction manual 2008: 6.)

UNG-käsittely tehdään PCR-ohjelmassa ensimmäisenä ennen polymeraasin aktivointia. UNG-entsyymi aktivoidaan noin 50 °C:n lämpötilassa ja sillä on kyky katkaista DNA-juosteet, joissa on dUTP:tä, minkä jälkeen ne eivät voi enää toimia templaatteina. dUTP:tä on vain aikaisemmin monistetuissa tuotteissa, joten näytteen DNA ei vahingoitu. (Scott Adams 2006: 54.)

3.4 Vertailtavat mastermixit

Viime aikoina eri reagenssivalmistajat ovat tuoneet markkinoille mastermixejä, jotka toimivat nopeammin kuin aiemmat mastermixit. Näitä nopeita mastermixejä kutsutaan fast-mixeiksi. Käymme tässä läpi Applied Biosystems'in TaqMan[®] Universal PCR Master Mix -liuoksen sekä kahden fastmixin, Qiagenin QuantiFast[™] Probe PCR Master Mix ja Finnzymesin DyNAmo[™] Flash Probe qPCR Master Mix -liuosten, ominaisuuksia. Viittaamme tekstissämme mastermixeihin myös pelkillä valmistajien nimillä.

Applied Biosystems'in TaqMan[®] Universal PCR Master Mix on tarkoitettu käytettäväksi perinteisellä ajonopeudella. Se sisältää AmpliTaq Gold DNA Polymerase -polymeraasin, AmpErase UNG -entsyymin, dNTP/dUTP-seoksen, passiivisen referenssiväriin (ROX) ja puskuriaineita (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix Protocol 2002: 6). HUSLABin virologian osasto käyttää tätä mastermixiä tällä hetkellä CMV:n diagnostiikassa.

Qiagenin QuantiFast[™] Probe PCR Master Mix sisältää Hot StarTaq Plus DNA -polymeraasin, dNTP-seoksen, passiivisen referenssiväriin (ROX) ja puskuriaineita. Puskurissa on lisäaineita, kuten Q-Bond, jotka mahdollistavat nopean PCR:n. Q-Bondin ansiosta Taq-polymeraasi sitoutuu DNA:han tehokkaammin ja alukkeiden kiinnittyminen nopeutuu. Puskurin koostumus on suunniteltu niin, että se mahdollistaa lyhyet denaturointi-, kiinnitymis- ja pidennysjaksot. (Quanti Fast Probe PCR Handbook: 4, 7, 9-10.)

Finnzymesin DyNAmo[™] Flash Probe qPCR Master Mix sisältää Hot start *Thermus brockianus* DNA -polymeraasin, dNTP/dUTP-seoksen ja puskuriaineita. dUTP mahdollistaa UNG:n käytön, mutta entsyymi itsessään ei ole valmiina mastermixissä. Passiivinen referenssiväri ROX on erillisenä, ja se voidaan pipetoida mukaan haluttaessa. (DyNAmo Flash Probe qPCR Kit Instruction manual: 2.)

Kaikissa mastermixeissä olevat polymeraasit ovat inaktiivisia huoneenlämmössä, eikä reaktioita tarvitse valmistella jäällä. Polymeraasit aktivoidaan lämpökäsittelyllä 95 °C:ssa. (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix Protocol 2002: 5; Quanti Fast Probe PCR Handbook: 9-10; DyNAmo Flash Probe qPCR Kit Instruction manual: 2, 5.)

3.5 Inhibitiopaneeli

Veressä ja kudoksissa on monia yhdisteitä, jotka voivat inhiboida PCR-reaktiota. Inhiboivia aineita ovat muun muassa punasolujen hemoglobiini, jotkin reagenssit ja ruokien ainesosista rasvat. Lisäksi jotkin orgaaniset yhdisteet, glykogeeni ja ympäristön yhdisteet, kuten fenoliset yhdisteet ja raskasmetallit, inhiboivat PCR-reaktiota. Tiedetään, että hemoglobiinissa oleva hemi sisältää inhiboivia osia Taq-polymeraasiin ja että näyteputkien hepariini-anti-koagulantti alentaa PCR:n tehokkuutta. (Bustin – Nolan 2004b: 146–147; Bustin – Nolan 2004d: 400)

PCR-reagenssien inhibitionsiedon ja DNA-eristyksen tehokkuuden testaamiseen on käytössä Acrometrixin OptiChallenge-inhibitiopaneeli. Paneeli sisältää viittä yleisesti potilasnäytteissä esiintyvää inhiboivaa tekijää. Näitä ovat hepariini, EDTA, lipidit, bilirubiini ja hemoglobiini (OptiChallenge Inhibition Panel 2007). Hyvin pieninä pitoisuuksina nämä aineet eivät häiritse tuloksia, mutta ne voivat nousta häiritsevälle tasolle esimerkiksi potilaan elintapojen tai näytteenkäsittelyn seurauksena. Inhibitiopaneelin analyytit on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Inhibitiopaneelin analyytit.

Paneeliliuos	Analyytti	Pitoisuus
EDTA-plasma	EDTA	30,0 mmol/l
Hemolyysi, matala	Hemoglobiini	9,7 g/l
Hemolyysi, keskitaso	Hemoglobiini	20,0 g/l
Hemolyysi, korkea	Hemoglobiini	40,0 g/l
Hepariiniplasma	Hepariini	39,4 IU/ml
Lipemia	Triglyseridit	16,59 – 18,90 mmol/l
Ikteria	Bilirubiini	457 µmol/l

4 TUTKIMUSONGELMAT

Työmme lähtökohtana on tutkia mahdollisuutta nopeampaan CMV:n nukleinihapon määrittämiseen. Määrittäminen on monivaiheinen ja erityisesti PCR-ajo on aikaavievä. Käytössä olevalla analysaattorilla (ABI Prism 7900) se kestää 2h 9min. Määrittämisen nopeutuminen olisi hyödyllistä, koska virologian osasto ehtisi analysoida potilasnäytteet nykyistä paremmin. Näytteistä on tärkeää saada tulokset saman päivän aikana, koska elinsiirtopotilaiden sytomegalovirusmäärien monitoroinnissa tulokset tarvitaan nopeasti. Joinain päivinä näytteitä on niin paljon, että niiden kaikkien määrittämisessä tulee kiire. Näytemäärien kasvu tulee todennäköisesti jatkumaan, jolloin tarve nopeammalle PCR-ohjelmalle kasvaa.

Tarkoituksenamme on selvittää, voidaanko PCR-ajossa siirtyä Applied Biosystems'in TaqMan[®] Universal PCR Master Mix -reagenssista Qiagenin QuantiFast[™] Probe PCR tai Finnzymes'in DyNAmo[™] Flash Probe qPCR -reagenssin käyttöön ja lyhyempään ajo-ohjelmaan. Lyhyemmällä PCR-ohjelmalla ajoaika lyhenisi noin puoleen. Työmme on kvantitatiivinen ja luonteeltaan vertaileva tutkimus. Vertailevan tutkimuksen tavoitteena on parempi ymmärrys tutkittavasta ilmiöstä ja sen yhteydessä ilmenevistä eroista (Vilka 2007: 21). Testaamme eri reagensseja ja ajo-ohjelmia CMV:n nukleinihapon määrittämisessä ja pyrimme saamaan selville, miten ne vaikuttavat määrittämisen tuloksiin.

Fastmixien käytöstä ja toimivuudesta ei löydy kovin paljoa tutkimustietoa, koska ne ovat olleet markkinoilla vasta vähän aikaa. Hilscher, Vahrson ja Dittmer (2005) ovat tutkineet nopeaa PCR-menetelmää eri alukkeilla ja todenneet, että nopealla PCR-menetelmällä tuloksien vaihtelut ovat suurempia ja sensitiivisyys huonompi kuin perinteisillä mastermixeillä. Väärää positiivisia ei kuitenkaan ollut, eikä spesifisyys ollut huonompi. Yoderin ja Fishelin (2008: 253) tutkimus taas osoitti, että HIV-viruksen määrittämisessä nopealla PCR-menetelmällä oli yhtä hyvä tarkkuus ja herkkyys kuin normaalilla nopeudella. He myös toteavat menetelmän säästävän aikaa ja kustannuksia. Kustannusten säästöä saadaan aikaan, jos käytetään pienempiä reaktioilavuuksia, jolloin myös reagensseja kuluu vähemmän. Jotkin fastmixit tarjoavat mahdollisuuden pienempien reaktioilavuuksien käyttöön. PCR-menetelmä tulee aina optimoida käytössä olevien laitteiden, reagenssien ja alukkeiden mukaan. Näin ollen fastmixien ja ajo-ohjelmien vertailulle on selkeä tarve.

Yksi tärkeimmistä mastermixin ominaisuuksista on, että se sietää näytteessä mahdollisesti olevia inhiboivia aineita. Voimakkaan inhibiittorin läsnä ollessa selvästi positiivinenkin näyte voi antaa negatiivisen tuloksen, jolloin lääkäri tekee vääriä johtopäätöksiä potilaan tilasta. Yksi tunnetuimmista inhiboivista yhdisteistä on hepariini, jota voi olla näytteessä esimerkiksi silloin, kun näyte on otettu hepariiniputkeen. On tärkeää testata, onko fast-mixeillä joitain voimakkaita inhibiittoreita.

Diagnostisen tuloksen taustalla on herkkä ja kvantitaatioiden suhteen luotettava menetelmä. Herkällä menetelmällä pystytään havaitsemaan näytteestä pienetkin viruspitoisuudet. Kvantitaatioiden tulee olla yhdenmukaisia, niin että sama viruspitoisuus antaa aina saman tuloksen. Kvantitaatioiden on oltava yhteneviä myös vanhaan menetelmään. Fastmixeillä saatujen tulosten täytyy korreloida selvästi Applied Biosystems'in mastermixiin, jotta niiden käyttöönottoa voidaan harkita.

Toisinaan CMV-määrittystä tehdessä käy jokin virhe tai saadaan epäselvä tulos, minkä takia näyte tai koko sarja joudutaan analysoimaan uudestaan. Tällaisessa tilanteessa määrittys on aloitettava alusta DNA:n eristämällä, joka vie paljon aikaa. Tavallista määrittystä tehdessä templaattia saadaan kaksinkertaisesti se määrä, mitä tarvitaan PCR-reaktioon. Tämä ylimääräinen templaatti säilyy jääkaapissa vuorokauden, jonka jälkeen se ei enää ole analysointikelpoinen. Jos templaatin voisi pakastaa ja säilyttää pidempiä aikoja, sitä voitaisiin käyttää uusintanäytteen analysointiin. Pakastamismahdollisuus voisi helpottaa joissain tapauksissa tutkimusten työnkulkua, koska PCR-ajoa ei tarvitsisi tehdä samana päivänä kuin eristystä. Paula Marttinen on tutkinut pakastamisen vaikutusta templaatteihin opinnäytetyössään. Hänen tutkimuksensa koski Epstein-Barrin virusta ja hän käytti Qiagenin reagenssia (Qiagen artus EBV TM PCR Master Mix). Hän havaitsi pakastettujen templaattien antavan selvästi pienempiä tuloksia kuin ennen pakastamista (Marttinen 2007: 26–27).

Näiden kaikkien edellä mainittujen seikkojen pohjalta muotoilimme tutkimuskysymyksemme seuraavanlaisiksi:

- Mikä on Qiagenin QuantiFast™ Probe PCR Kit ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit -pakkausten fastmixien inhibition sietokyky?

- Kuinka hyvä herkkyys Qiagenin QuantiFast™ Probe PCR Kit ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit -pakkausten fastmixeillä on CMV:ta määrittäessä?
- Vaikuttaako templaattien pakastaminen CMV-tuloksiin Qiagenin QuantiFast™ Probe PCR Kit ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit -pakkauksilla?
- Kuinka hyvin CMV-tulokset korreloivat eri mastermixien välillä?
- Kumpi fastmix vaikuttaa paremmalta CMV:n reaaliaikaiseen PCR-määrittelyyn, Qiagenin QuantiFast™ Probe PCR Kit vai Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit?

Ensimmäisen vaiheen perusteella valitsemme paremmalta vaikuttavan fastmixin jatkotestaukseen. Työn toisessa vaiheessa tarkoituksenamme on selvittää, sopiiko valittu fastmix ja lyhyempi ajoaika CMV:n määrittelyyn HUSLABin virologian osastolla. Tämän arvioimiseen tarvitsemme vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

- Kuinka hyvin valitulla fastmixillä saadut CMV-tulokset korreloivat TaqMan Universal PCR Master Mix -reagenssilla saatujen tulosten kanssa?
- Kuinka hyvin CMV-tulokset korreloivat normaalimittaisen ja lyhyen ajon kesken?
- Kuinka hyvä toistettavuus CMV-näytteitä määrittäessä näillä kahdella mastermixillä ja kahdella ajo-ohjelmalla on?

5 TYÖN SUORITTAMINEN

Teemme työmme virologian osastolle, joka kuuluu HUSLABin mikrobiologian vastuualueeseen. Teemme mittauksemme osaston geenimonistuspisteessä Haartmaninkadulla Helsingissä. PCR-työskentelytapoihin tutustumme keväällä 2009 ja työn mittaukset ja analysoinnin teemme syksyllä 2009.

5.1 Aineiston valinta

Inhibitionsiedon testaukseen käytämme simuloituja näytteitä. Ne valmistetaan lisäämällä inhibitiopaneelin liuokseen viljeltyä virusta. Saamme virusviljelyosastolta CMV-

kantaliuosta, josta etsimme laimennoksen, jossa on noin 2000 viruskopiota millilitrassa. Kopiomäärän valitsimme jonkin verran detektorajaa (250 kopiota/ml) korkeammaksi, jotta mahdolliset inhibitiot tulisivat paremmin ilmi ja niiden voimakkuutta voitaisiin arvioida.

Reagenssien herkkyyttä tutkimme laimennossarjalla, johon käytetään osastolla valmistettua plasmidia. Plasmidi sisältää PCR:n kohdealueen sekvenssin ja sitä käytetään rutiinisti standardisuoran mittaukseen. Laimennossarjalla pyrimme löytämään pienimmän pitoisuuden, jolla saadaan vielä monistumaa. Kantaliuoksen laimennoksiksi valitsimme pitoisuudet 25, 250, 2 500, 25 000 ja 250 000 kopiota/ml.

Pakastamisen vaikutusta templaatteihin tutkimme neljällä potilasnäytteellä. Näytteet analysoidaan heti eristyksen jälkeen ja uudelleen kolme vuorokautta kestäneen pakastuksen (-20 °C) jälkeen. Valitsemiemme näytteiden pitoisuudet ovat 420, 620, 2 720 ja 81 100 kopiota/ml. Valittujen pitoisuuksien avulla voimme arvioida, kuinka suuri mahdollinen pitoisuuden aleneminen on ja kuinka helposti matalat positiiviset näytteet jäävät negatiivisiksi. Käyttämiamme potilasnäytteitä on säilytetty -20 °C:ssa ja ne ovat vuodelta 2009.

Toisen vaiheen mastermixien ja ajo-ohjelmien testauksessa käytämme aiemmin analysoituja potilasnäytteitä. Yhteensä näytteitä on 91, joista 53 on positiivisia ja 38 negatiivisia. Positiivisiksi näytteiksi etsimme eritasoisia näytteitä, mutta painotamme matalaa pitoisuutta. Matalan pitoisuuden näytteiden avulla näemme, tuleeko fastmixeillä vääriä negatiivisia tuloksia ja voimme arvioida fastmixien herkkyyttä. Negatiiviset näytteet valitsemme niin, että alkuperäisessä mittauksessa kumpikaan rinnakkaisnäytteistä ei ole tuottanut monistumaa. Lisäksi otamme jokaiseen ajoon mukaan kaksi eritasoista toistonäytettä (ks. taulukko 3). Käsittelemme potilasnäytteitä nimettöminä. Eettisen toimikunnan lupaa emme tarvitse, koska teemme potilasnäytteistä saman määrityksen, mikä niistä on tehty jo aiemmin. Käyttämiamme näytteitä on säilytetty -20 °C:ssa ja ne ovat kaikki vuodelta 2009.

TAULUKKO 3. Toisessa vaiheessa käytettyjen potilasnäytteiden pitoisuudet ja määrät.

Potilasnäytteet	Näytteen pitoisuus	Näytteiden määrä
Negatiivinen	0 kopiota/ml	38 näytettä
Matala	<10 000 kopiota/ml	31 näytettä
Keskitaso	10 000 – 60 000 kopiota/ml	10 näytettä
Korkea	>60 000 kopiota/ml	12 näytettä
Toistonäytteet	510 ja 6920 kopiota/ml	2 näytettä
		Yhteensä 93 näytettä

5.2 Mittausten suoritus

Teemme mittaukset geenimonistuspisteelle ominaisten työtapojen mukaisesti ja noudatamme HUSLABin työohjetta sytomegaloviruksen nukleinihapon määrittämisestä. Käytetyt laitteet ja reagenssit on lueteltu liitteessä 2 ja määrittämisprosessin suoritus liitteessä 3. Tutkimus aloitetaan eristämällä virus-DNA MagNA Pure LC -analysointilaitteella. Näytteet pipetoidaan analysointilaitteen näyteastian kuoppiin. Jokaisessa ajossa kuoppiin pipetoidaan myös vesikontrolli ja positiivinen potilasnäytekontrolli. Kontrolleilla varmistetaan, että eristyksessä käytetyt reagenssit tai koneen osat eivät ole kontaminoituneita ja että eristysohjelma toimii asianmukaisesti. Analysointilaitteeseen lisätään tarvittavat muovitarvikkeet ja reagenssit, jonka jälkeen eristys tapahtuu automaattisesti. MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit -pakkauksessa on kaikki eristyksessä tarvittavat reagenssit. (HUSLAB 2008).

PCR-reaktioseos valmistetaan puhdashuoneessa. Reaktioseosta tehdään eristettyjen näytteiden lisäksi myös standardisuoraa ja NTC-kontrollia (non-template control) varten. NTC-kontrollissa on templaatin sijasta vettä ja sillä varmistetaan, etteivät reaktioseoksen reagenssit ole kontaminoituneet. Reaktioseokseen lisätään vettä, mastermixiä, F- ja R-aluketta sekä koetinta (HUSLAB 2008). Lisäksi Finnzymesin mastermixin mukana tulee erillisenä ROX-referenssi, joka lisätään haluttaessa reaktioseokseen. Qiagenin ja Applied Biosystemsin mastermixeissä ROX on jo valmiina. Koska tarkoituksenamme on käyttää referenssiä PCR-ajoissamme, lisäämme reaktioseokseen suositellun (0,3x) määrän ROX-liuosta (DyNAmo Flash Probe qPCR Kit Instruction manual 2008: 5). Taulukossa 4 on esitetty yhteen

reaktioon tarvittavat reagenssimäärät. Yksi reaktio vastaa yhtä kuoppaa PCR-ajossa. Temp-laattina toimii eristetty virus-DNA.

PCR-ajot tehdään Stratagenen Mx3005P -laitteella, joka toimii virologian osastolla CMV-diagnostiikan varalaitteena (rutiinidiagnostiikassa ABI Prism 7900). Jokainen näyte ajetaan rinnakkaisina, paitsi laimennossarjan näytteet, joita ajetaan neljä rinnakkain. Näytteiden lisäksi jokaisessa ajossa on mukana myös vesikontrolli, NTC-kontrolli ja standardisuora. Ajamme joka vaiheessa kaikki näytteet kahdella eri ajo-ohjelmalla. Normaaliohjelma on sama, mitä käytetään rutiinisti ABI Prism 7900-laitteella. Fastmixeille tehdään yhteinen ajo-ohjelma.

TAULUKKO 4. Yhteen PCR-reaktioon tarvittavat reagenssit

1x-reaktioseos	Applied Biosystems: TaqMan® Universal PCR Master Mix	Finnzymes: DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit	Qiagen: QuantiFast™ Probe PCR Kit
Aqua	6,5µl	6,2µl	6,5µl
Mastermix	25µl	25µl	25µl
CMV F	1,5µl	1,5µl	1,5µl
CMV R	4,5µl	4,5µl	4,5µl
CMV Probe	2,5µl	2,5µl	2,5µl
ROX	-	0,3µl	-
(Templaatti 10µl)			
Yhteensä	50µl	50µl	50µl

Lyhyt ohjelma suunnitellaan Finnzymesin ja Qiagenin tuoteselosteissa ehdottamien ajoaikojen perusteella. Finnzymesin ja Qiagenin PCR:n ohjelmointiajat eroavat toisistaan vain vähän. Ohjelmaan otetaan mukaan UNG-käsittelyvaihe, koska se parantaa mittauksen luotettavuutta. Tämä vaikuttaa vain niissä reagensseissa missä UNG-entsyymi on lisätty. Käsittelyvaihe ei kuitenkaan haittaa monistumista, vaikka reagenssissa ei sitä olisikaan. Sykliä ajat ohjelmoidaan ehdotetuista ajoista pidempien mukaan (ks. taulukko 5). Syklejä on yhtä monta kuin rutiiniajossakin. Normaaliohjelman pituus on 1h 44min ja lyhyen ohjelman 1h 11min. (ABI Prism 7900 -analysointorilla normaali ohjelma kestää 2h 9min).

TAULUKKO 5. Mittauksissa käytetyt PCR-ohjelmat.

	Lyhyt ohjelma		Normaali ohjelma	
1. UNG	2min	50°C	2min	50°C
2. Polymeraasin aktivointi	7min	95°C	10min	95°C
3. Denaturaatio	5s	95°C	15s	95°C
4. Kiinnitys ja pidennys	30s	60°C	1min	60°C
Syklejä (vaiheet 3. ja 4.)	45		45	

5.3 Mittausasetukset

Saatujen kopiomäärien lisäksi tarkastellaan seuraavia tunnuslukuja, jotta nähdään kuinka hyvin monistuminen on onnistunut. Hyvän standardisuoran tehokkuus on mahdollisimman lähellä 100%:a. Kun tehokkuus on 100%, templaatin määrä kaksinkertaistuu jokaisella sykliä. R_{sq} on korrelaatiokertoimen arvo korotettuna toiseen potenssiin. Se kuvaa standardisuoran selitysastetta ja sen tulisi olla suurempi kuin 0,98. Esimerkiksi arvo 0,98 tarkoittaa, että suoran avulla voidaan selittää 98% tulosten vaihtelusta. Arvolla 1,00 saavutetaan korkein selitysaste. Standardisuoran kulmakertoimen tulisi olla mahdollisimman lähellä -3,3 ja y-akselin leikkauspisteen eli C_t -arvon tulisi olla lähellä 38:aa (Bustin – Nolan 2004e: 452; Heikkilä 2004: 92).

HUSLABilla potilasnäytteen tulos voidaan hyväksyä vain, kun tietyt ehdot toteutuvat. Hyväksymisehtojen täyttymiseksi vahvimman standardin C_t -arvon tulee olla $22 - 23 \pm 0,2$, standardisuoran kulmakertoimen -3,2 ja -3,6 välillä ja positiivisen kontrollin $\pm 50\%$ alkuperäisestä tuloksesta. Näitä rajoja käytetään, kun tulosalgoritmiksi on asetettu normalisoitu non-adaptiivinen ja fluoresenssin kynnysarvo 0,1:een.

Applied Biosystemsien mastermixille tulosalgoritmi ja kynnysarvo ovat jo olemassa, mutta fastmixeille jouduimme etsimään ne itse. Tulosten kuvaajissa käytimme puolilogaritmista asteikkoa, jotta amplifikaatiokäyrien eksponentiaalivaihe olisi paremmin havaittavissa. Vertailimme ensimmäisen vaiheen ajojen monistuskäyriä eri asetuksilla. Huomasimme, että fastmixien käyrät olivat parempia adaptiivisella baseline -asetuksella. Rinnakkaiset arvot

olivat lähempänä toisiaan ja monistuksen eksponentiaalivaihe oli helpommin havaittavissa. Qiagenin fastmixissä ROX-referenssi ei jostain syystä toiminut. Sen antamat fluoresenssiarvot pienenivät ajon edetessä ja normalisoidulla asetuksella saatiin monituhatkertaisesti liian suuria arvoja. Qiagenin reagenssin kohdalla käytimme siis ei-normalisoitua asetusta. Fluoresenssin kynnysarvon pyrimme asettamaan kohtaan, jossa kaikki ajon monistuskäyrät olivat eksponentiaalivaiheessa. Tämä arvo asetui Finnzymesin kohdalla arvoon 0,02 ja Qiagenilla arvoon 1000 (ks. taulukko 6).

TAULUKKO 6. Mastermixeille käytetyt tulosalgoritmit ja kynnysarvot.

Mastermix	Applied Biosystems: Taq-Man® Universal PCR Master Mix	Finnzymes: DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit	Qiagen: QuantiFast™ Probe PCR Kit
Tulosalgoritmi	non-adaptiivinen	adaptiivinen	adaptiivinen
Normalisointi	normalisoitu	normalisoitu	ei-normalisoitu
Kynnysarvo	0,1	0,02	1000

6 TULOKSET

Käsittelimme tulokset kahdessa osassa. Ensiksi vertailimme alkutestauksen tuloksia ja karsimme niiden perusteella toisen fastmixin pois mittauksista. Jatkomittausten tarkoituksena oli selvittää valitun fastmixin ja Applied Biosystems tulosten yhtenevyyttä. Tuloksissa olemme keskittyneet enemmän Applied Biosystems normaaliajon ja Finnzymesin ja Qiagenin lyhyen ajon tuloksiin, koska mastermixit on kehitetty juuri niitä varten. Käymme myös lyhyesti läpi Applied Biosystems lyhyen ajon ja fastmixien normaalin ajon tulokset. Kaikki mittaustulokset ovat liitteessä 1.

6.1 Vertailu kahden fastmixin välillä

Työn ensimmäisessä vaiheessa tutkimme mastermixien inhibitionsietoa, templaattien pakastamisen vaikutusta PCR-reaktioon sekä mittausten herkkyyttä. Lopuksi vertasimme fastmixien tulosten korrelaatioita Applied Biosystems mastermixiin ja valitsimme lupavamman jatkotestaukseen.

Pyrimme vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

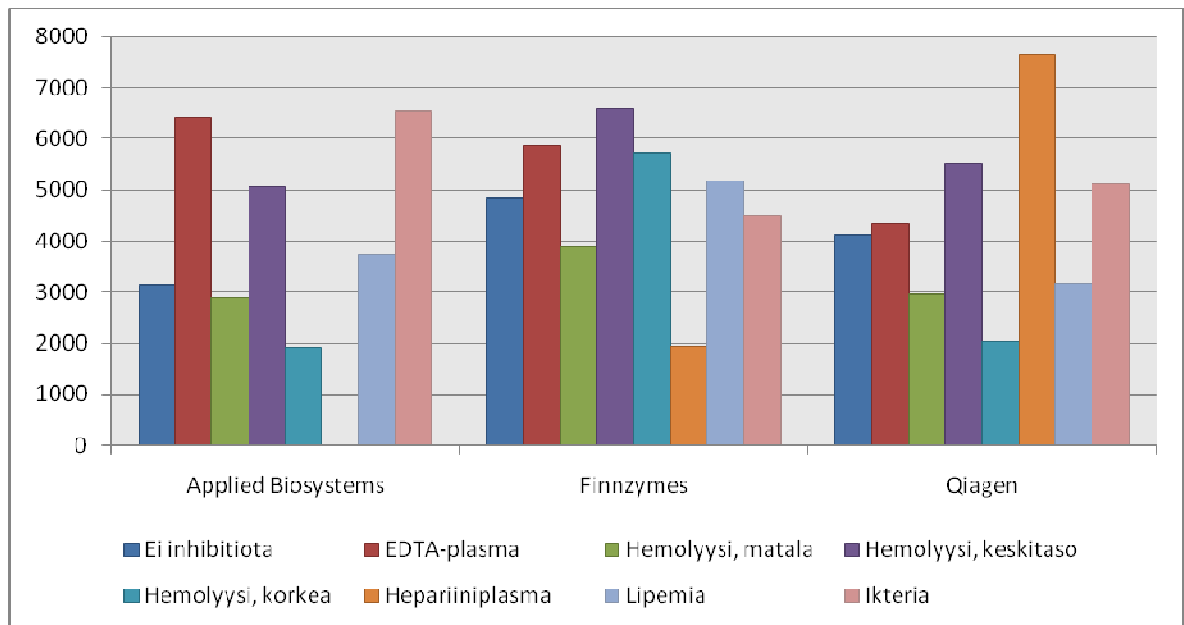
- Mikä on Qiagenin QuantiFast Probe PCR Kit ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit -pakkausten fastmixien inhibition sietokyky?
- Kuinka hyvä herkkyys Qiagenin QuantiFast Probe PCR Kit ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit -pakkausten fastmixeillä on CMV:ta määrittäessä?
- Vaikuttaako templaattien pakastaminen CMV-tuloksiin Qiagenin QuantiFast Probe PCR Kit ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit -pakkauksilla?
- Kuinka hyvin CMV-tulokset korreloivat eri mastermixien välillä?
- Kumpi fastmix vaikuttaa paremmalta CMV:n reaaliaikaiseen PCR-määrittelyyn, Qiagenin QuantiFast Probe PCR Kit vai Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit?

6.1.1 Inhibitiopaneeli

Inhibitionsiedon testaukseen käytimme Acrometrixin OptiChallenge -inhibitiopaneelia. Käytimme paneeliin simuloituja näytteitä, joiden pitoisuus oli noin 2000 kopiota/ml. PCR-ajot tehtiin normaalilla ja lyhyellä ajo-ohjelmalla kolmella vertailtavalla mastermixillä. Verinäyte ohjeistetaan ottamaan EDTA-putkeen, sillä hepariiniantikoagulantti voi aiheuttaa voimakkaan inhibition. Hemolyytiset näytteet ovat paljon yleisempiä ja hemin aiheuttama inhibitio olisi paljon merkitsevämpää.

Kuviosta 7 havaitaan, että ainoastaan Applied Biosystems'n kohdalla hepariini aiheutti huomattavan inhibition. Kaikkien muiden näytteiden kohdalla pitoisuudeksi saatiin lähes tai yli 2000 kopiota/ml eli muut inhibiittorit eivät aiheuttaneet merkittävää tulostason alenemista (ks. liite 1, taulukko 1).

Eri ajo-ohjelmia vertailtaessa Finnzymesin normaalilla ja lyhyellä ajolla saatiin hyvin samansuuruisia tuloksia. Qiagenin normaali-ajolla saadut tulokset olivat noin kymmenen kertaa suurempia kuin oli odotettavissa ja hajonta oli suurempaa. Applied Biosystems'n tulokset olivat noin puolet pienempiä kuin normaalilla ajolla saadut tulokset (ks. liite 1, taulukko 2).



KUVIO 7. Inhibitiopaneelin tulokset. Inhibiittorit eriteltynä kunkin mastermixin kohdalla. Applied Biosystems'in kohdalla käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesin ja Qiagenin kohdalla lyhyttä ajoa. Tulosten yksikkö on kopiota/ml.

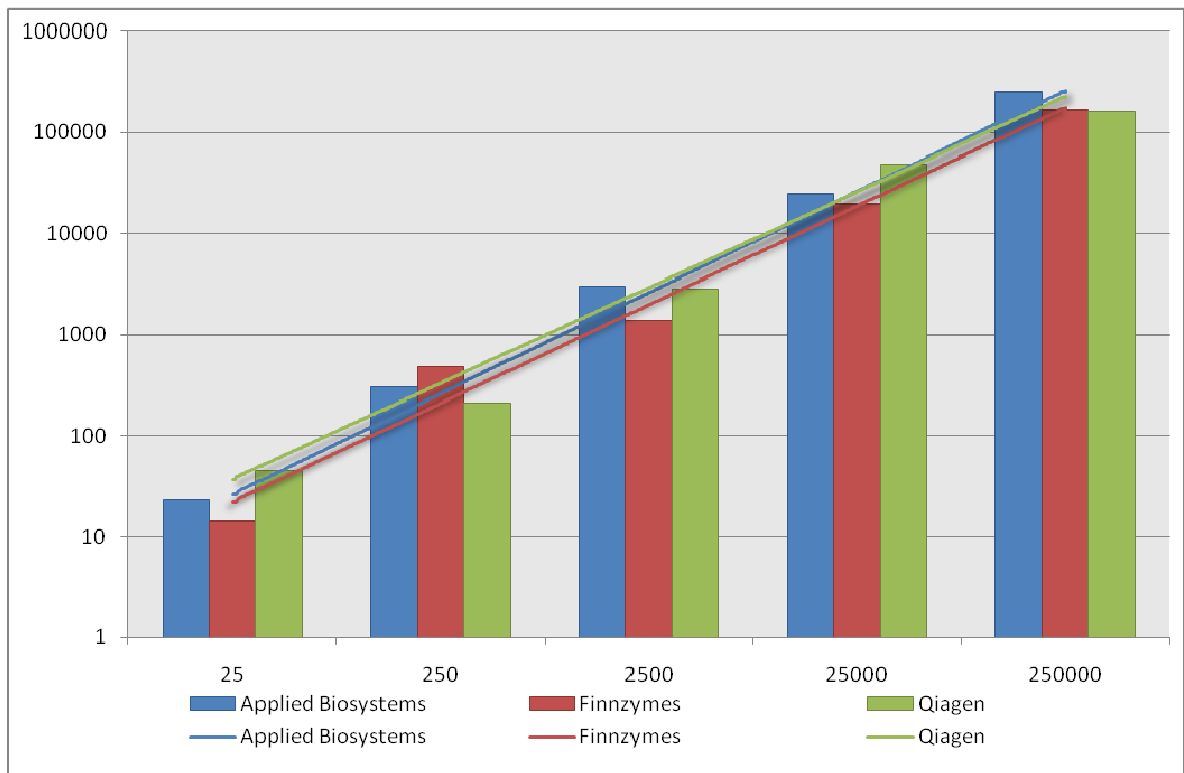
6.1.2 Herkkyys

Herkkyuden tutkimiseen käytimme plasmidista valmistettua laimennossarjaa. Pyrimme löytämään pienimmän pitoisuuden, jolla saadaan vielä monistumaa. Laimennokset olivat 25, 250, 2 500, 25 000 ja 250 000 kopiota/ml.

Kuviosta 8 nähdään, että Qiagenin tulokset ovat hivenen yhtenevämmät Applied Biosystems'in mastermixin kanssa. Finnzymesin tulokset olivat lähes aina vähän pienempiä kuin Applied Biosystems'in reagenssilla saadut tulokset. Kaikkien reagenssien herkkyudet olivat samaa luokkaa. Pitoisuus 25 kopiota/ml näyttäisi olevan positiivisuuden cutoff-arvo, koska tällä laimennoksella jokaisen mastermixin kohdalla oli rinnakkaisia kuoppia, joissa ei ollut monistumaa.

Trendiviivojen selitysasteet ovat Applied Biosystemsilla 0,999, Finnzymesille 0,980 ja Qiagenille 0,984. Käytetty laimennossarja oli periaatteessa standardisuoran valmistusta varten. Voimme siis varovasti käyttää selitysastetta reagenssien vertailussa. Applied Biosys-

temsien mastermixillä saadut tulokset olivat erittäin hyvät. Fastmixien arvot olivat hieman huonommat eikä niiden välillä ollut suurta eroa.



KUVIO 8. Laimennossarjan tulokset. Applied Biosystemsillä käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesin ja Qiagenin kohdalla lyhyttä ajoa. Tulosten yksikkö on kopiota/ml, puolilogaritminen asteikko. Kuvioon lisätty trendiviivat.

Myös muiden ajo-ohjelmien mittauksissa saatiin herkkyudeksi 25 kopiota/ml. Finnzymesin molemmilla ohjelmilla saatiin jälleen samansuuruisia tuloksia. Qiagenin tulokset olivat oikeaa kertaluokkaa molemmilla ajoilla, mutta hajonta oli edelleen suurta. Applied Biosystemsillä tulokset olivat molemmilla ajoilla samaa luokkaa. (ks. liite 1, taulukko 3)

6.1.3 Pakastetut templaatit

Pakastetemplaatteihin käytettiin neljää potilasnäytettä. Ne analysoitiin heti eristyksen jälkeen ja uudestaan kolme vuorokautta kestäneen pakastuksen (-20 °C) jälkeen. Taulukosta 7 voidaan lukea, että matalilla pitoisuuksilla pakastamisen pienentävä vaikutus oli melko vähäinen. Korkean pitoisuuden kohdalla havaitaan, että Applied Biosystemsillä pitoisuus pu-

tosu huomattavasti. Pitoisuus putosi myös Qiagenin kohdalla, mutta Finnzymesin reagenssilla se jopa kasvoi. Fastmixeillä pitoisuuden pieneneminen oli suhteellisesti vähäisempää kuin käytössä olevalla mastermixillä.

TAULUKKO 7. Pakastamisen vaikutus templaatteihin. Applied Biosystems'n kohdalla käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesin ja Qiagenin kohdalla lyhyttä ajoa. Tulosten yksikkö on kopiota/ml.

Alkuperäinen pitoisuus	Applied Biosystems		Finnzymes		Qiagen	
	Ennen pakastusta	Pakastuksen jälkeen	Ennen pakastusta	Pakastuksen jälkeen	Ennen pakastusta	Pakastuksen jälkeen
420	250	110	430	500	100	40
620	150	160	860	610	1420	560
2720	4890	2420	12 370	9510	3780	3890
81 100	73 980	1690	278 150	740 900	197 200	92 230

Muiden ajojen kohdalla Finnzymesin tulokset olivat muuten yhtenevät, mutta korkean pitoisuuden näyte antoi pakastamisen jälkeen liian korkeita tuloksia lyhyellä ajolla. Keski- ja korkean tason näytteen kohdalla tulokset olivat muutenkin korkeita, erityisesti lyhyellä ajolla. Qiagenin tulokset olivat muuten hyvät, mutta hajontaa oli paljon. Applied Biosystems'n tulokset olivat lyhyellä ajolla jälleen pienempiä ja pakastamisen jälkeen melkein kaikki tulokset putosivat nollaan (ks. liite 1, taulukot 4 ja 5).

6.1.4 Kvantitaation korrelaatio

Kvantitaation korrelaatiota tutkimme edellisten vaiheiden tuloksilla (ks. taulukko 8). Keskitimme fastmixien lyhyihin ajoihin ja Applied Biosystems'n mastermixin normaaliin ajoon. Applied Biosystems'n ja Qiagenin kohdalla kopiomäärä laski ja Finnzymesin kohdalla se nousi.

Kun korrelaatiota verrattiin laimennossarjan sekä potilasnäytteiden välillä (ks. taulukko 9), havaittiin, että Finnzymes korreloi paremmin Applied Biosystems'n kanssa ja korrelaatio oli erittäin merkitsevää ($p=0,014$). Qiagenin kohdalla korrelaatio oli tilastollisesti oireellinen ($p = 0,053$). Havaitimme, että suurilla pitoisuuksilla fastmixien antamien tulosten hajonta kasvoi. Testasimme korrelaatiota niin, että otimme mukaan näytteet, joiden pitoisuus

oli alle 150 000 kopiota/ml. Tässäkin vertailussa Finnzymes korreloi paremmin Applied Biosystemsien kanssa.

TAULUKKO 8. Rinnakkaiskuoppien keskiarvot. Applied Biosystemsien kohdalla käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesin ja Qiagenin kohdalla lyhyttä ajoa. Tulosten yksikkö on kopiota/ml.

	Applied Biosystems	Finnzymes	Qiagen
Laimennossarja			
25	90	90	60
250	300	210	480
2500	2980	2850	1390
25000	25040	48570	19730
250000	250750	161190	165730
Potilasnäytteet (ennen pakastusta)			
420	240	100	380
620	150	1420	860
2720	4980	3780	12370
81 100	73980	197200	278200

TAULUKKO 9. Korrelaatiot eri reagenssien välillä. Fastmixien lyhyiden ajojen korrelaatio verrattuna Applied Biosystemsien normaaliajoon.

Applied Biosystems	Finnzymes	Qiagen
Laimennossarja ja potilasnäytteet ennen pakastusta		
Pearsonin korrelaatio	0,774	0,660
Merkitsevyys	0,014	0,053
Laimennossarja ja potilasnäytteet ennen pakastusta, <150 000		
Pearsonin korrelaatio	0,939	0,879
Merkitsevyys	0,005	0,021

Finnzymesin regressiosuoran yhtälö oli $y = 0,72 \cdot AB + 352$ ja Qiagenin $y = 2,06 \cdot AB + 408$ ($AB = \text{Applied Biosystems}$). Yhtälöiden perusteella voimme sanoa, että Finnzymesin tulokset olivat jonkin verran pienempiä kuin Applied Biosystemsien ja Qiagenin tulokset noin kaksinkertaiset verrattuna Applied Biosystemsiin.

Tulosten vertailun lisäksi voimme vertailla myös eri reagensseilla saatuja standardisuoria (ks. taulukko 10). Ihanteellisen standardisuoran antama kulmakerroin on -3,33 ja selitysaste 1,000. Standardisuoria vertailemalla huomasimme Finnzymesisin antavan kulmakertoimen suhteen parempia tuloksia kuin Qiagen, mutta selitysasteen suhteen huonompia.

TAULUKKO 10. Mittauksissa saatujen standardisuorien kulmakerroin ja selitysaste. Applied Biosystemsillä käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesisin ja Qiagenin kohdalla lyhyttä ajoa.

		Inhibitio	Laimennos-sarja	Ennen pakastusta	Pakaste-templaattit	Avg.	StDev
Slope	Applied Biosystems	-3,666	-3,657	-3,480	-3,509	-3,578	0,097
	Finnzymes	-3,428	-3,353	-3,299	-3,489	-3,392	0,083
	Qiagen	-3,493	-3,381	-3,112	-2,997	-3,246	0,230
Rsq	Applied Biosystems	0,987	0,984	0,994	0,994	0,990	0,005
	Finnzymes	0,890	0,817	0,984	0,992	0,921	0,083
	Qiagen	0,983	0,973	0,958	0,989	0,976	0,014

6.1.5 Toisen fastmixin valinta jatkotutkimuksiin

Ensimmäisen vaiheen tulokset olivat ristiriitaiset testattavien fastmixien suhteen. Tulosten korrelaatiot Applied Biosystemsillä olivat Finnzymesillä paremmat, mutta sen standardisuorien selitysasteet olivat huonommat. Finnzymesisin kohdalla eduksi katsottiin halvempi hinta ja kotimaisuus.

Qiagenin standardisuorien selitysasteet olivat hyvät, mutta korrelaatiot Applied Biosystemsillä olivat huonot. Qiagen antoi korkeilla viruspitoisuuksilla huomattavan korkeita tuloksia ja keskiarvoisesti tulokset olivat noin kaksi kertaa suurempia kuin Applied Biosystemsillä.

Edellä mainittujen seikkojen perusteella päädyimme valitsemaan jatkotutkimuksiin Finnzymesisin reagenssin.

6.2 Vertailu Applied Biosystems'in mastermixin ja valitun fastmixin välillä

Toisessa vaiheessa ajoimme potilasnäytteitä rinnakkain Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Master Mix:n ja Applied Biosystems'in TaqMan Universal Master Mix:n kanssa. Teimme kaikki ajot normaalilla ja lyhyellä PCR-ohjelmalla. Kaikista näytteistä ajettiin kaksi rinnakkaista kuoppaa. Tuloksia verrattiin aina Applied Biosystems'in normaaliajon tuloksiin, joka on osastolla diagnostiikassa käytössä oleva menetelmä.

Työn toisessa vaiheessa pyrimme vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

- Kuinka hyvin valitulla fastmixillä saadut CMV-tulokset korreloivat TaqMan Universal Mix -reagenssilla saatujen tulosten kanssa?
- Kuinka hyvin CMV tulokset korreloivat normaalimittaisen ja lyhyen ajon kesken?
- Kuinka hyvä toistettavuus näillä kahdella mastermixillä ja kahdella ajo-ohjelmalla määritetyillä CMV näytteillä on?
- Soveltuuko nopea PCR-ohjelma CMV:n nukleiinihapon määrittämiseen?

6.2.1 Korrelaatio mastermixien ja ajo-ohjelmien välillä

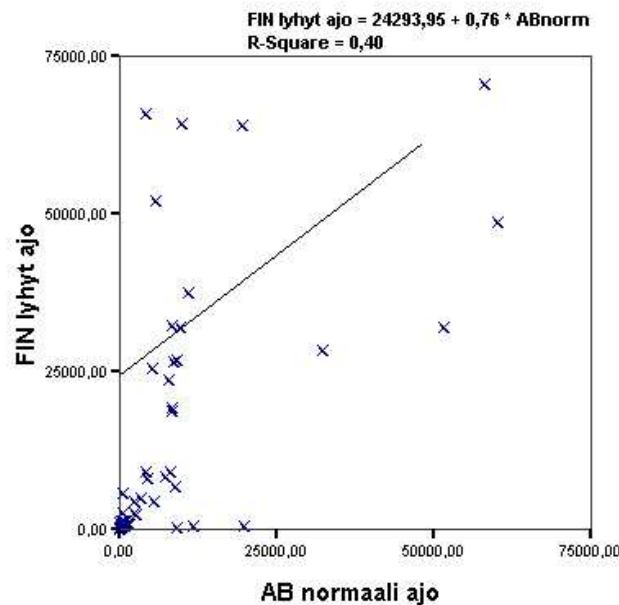
Toisen vaiheen mittaustuloksista laskettiin Pearsonin korrelaatiot eri mastermixeille ja ajonopeuksille käyttäen vertailukohtana Applied Biosystems'in normaaliajoa. Korrelaatio laskettiin positiivisten näytteiden rinnakkaiskuoppien keskiarvotuloksista. Positiiviseksi näytteeksi laskettiin näyte, jonka monistuman keskiarvo oli yli 250 kopiota/ml. Toisen vaiheen kaikki mittaustulokset on esitetty liitteessä 1 (taulukko 6 ja taulukko 7).

Mittauksissa oli yksi näyte, jonka kohdalla tulokset olivat todella korkeat. Tulosten vaihtelu ja suuruus selittyvät sillä, että näytteen pitoisuus oli alun perin ollut hyvin korkea (678500 kopiota/ml) ja PCR-menetelmä on hyvin herkkä. Herkkyytensä ja eksponentiaalisen monistustehonsa ansiosta rinnakkaiskuopat voivat erota toisistaan paljonkin. Näytteen kohdalla vaihtelu oli niin suurta, että se väärästi laskettuja korrelaatioita eikä sitä ole otettu mukaan seuraaviin vertailuihin. Taulukosta 11 huomaamme, että Pearsonin korrelaatiot Finnzymesin kohdalla eivät ole niin selviä Applied Biosystems'in normaaliajon kanssa. Korrelaatiot ovat tilastollisesti merkitseviä ja lyhyellä ajolla korrelaatioksi saadaan $r = 0,629$.

TAULUKKO 11. Pearsonin korrelaatiokertoimet toisessa vaiheessa, kun mukana on positiiviset näytteet joissa ABnormaalijao < 1 000 000 kopiota/ml.

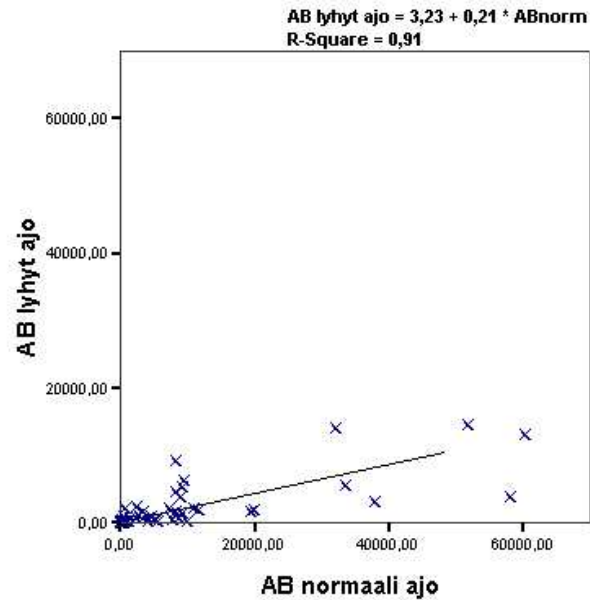
Applied Biosystems, normaali ajo	Applied Biosystems, lyhyt ajo	Finnzymes, normaali ajo	Finnzymes, lyhyt ajo
Pearsonin korrelaatio	0,954	0,751	0,629
Merkitsevyys	0,00	0,00	0,00

Seuraavissa kuvioissa 9, 10 ja 11 on esitetty eri ajo-ohjelmilla saatujen tulosten hajontakuviot ja regressiosuorat Applied Biosystems:n normaali ajon tuloksiin verrattuna. Kuviossa 9 on vertailtu Finnzymesin lyhyttä ajoa Applied Biosystems:n normaali ajon kanssa. Hajontakuviosta ja regressiosuoran y-akselin leikkauspisteestä ($y = 24294$) voidaan päätellä, että Finnzymesin tulokset lyhyellä ajolla ovat suurimmaksi osaksi liian suuria. Osa tuloksista on kuitenkin matalampia eli hajonta on suurta.



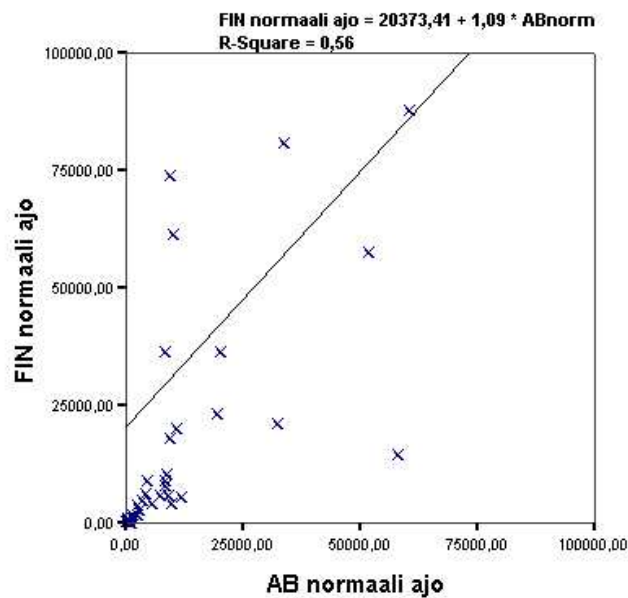
KUVIO 9. Hajontakuviot Finnzymesin lyhyen ajon ja Applied Biosystems:n normaali ajon välillä.

Kuviossa 10 on Applied Biosystems:n lyhyt ajo verrattuna normaali ajoon. Hajontakuviosta nähdään suoraan, että lyhyen ajon tulokset ovat selvästi matalampia kuin normaali ajon tulokset. Tämä nähdään myös regressiosuoran yhtälöstä, jonka kulmakerroin on vain 0,21. Tulokset näyttäisivät olevan liian matalia huolimatta näytteen pitoisuudesta yksittäisiä tuloksia lukuun ottamatta.



KUVIO 10. Hajontakuvi Applied Biosystems'in lyhyen ajon ja normaali ajon välillä.

Finnzymesin normaaliajon tulokset ovat jonkin verran korkeampia kuin Applied Biosystems'in normaaliajon tulokset, mikä näkyy kuviossa 11. Regressiosuoran kulmakerroin on kyllä varsin lähellä yhtä eli se on varsin hyvä, mutta y-akselin leikkauspiste on 20 0373, joten tulokset ovat korkeampia. Hajontaa on kuitenkin tässäkin ja osa Finnzymesin tuloksista on matalampia kuin Applied Biosystemsillä.



KUVIO 11. Hajontakuvi Finnzymesin normaaliajon ja Applied Biosystems'in normaaliajon välillä.

Jotta nähtäisiin miten tulokset riippuvat toisistaan eri pitoisuuksilla, on taulukossa 12 laskettu Pearsonin korrelaatiokertoimet neljälle eri tasolle Applied Biosystems:n normaaliajioon verrattuna. Molempien mastermixien lyhyen ajon näytteet, joiden kopiomäärä on alle 1000 kopiota/ml, korreloivat jonkin verran käytössä olevaan menetelmään ($r = 0,551$). Tulos on tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,000$).

Pitoisuuden ollessa 1000 – 100 000 kopiota/ml Finnzymes ei korreloi kovin hyvin Applied Biosystems:n normaalin ajon tulosten kanssa. Applied Biosystems:n lyhyt ajo sen sijaan korreloi normaaliajon kanssa ja tulokset ovat tilastollisesti merkitseviä.

Suurimmilla pitoisuuksilla, yli 100 000, näyttäisi olevan voimakas positiivinen korrelaatio molemmilla mastermixeillä Applied Biosystems:n normaaliajioon verrattuna ($r > 0,9$), ja tulokset ovat tilastollisesti merkitseviä ($p = 0,000$).

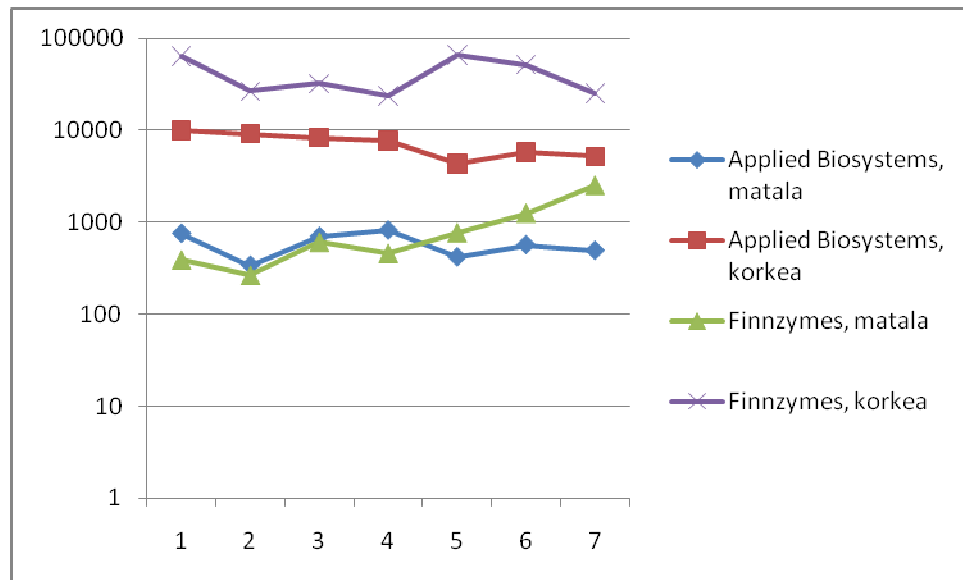
TAULUKKO 12. Pearsonin korrelaatio Applied Biosystems:n normaaliajon tuloksiin riippuen näytteiden pitoisuudesta.

		Pitoisuus <1000	Pitoisuus 1000–10 000	Pitoisuus 10 000–100 000	Pitoisuus >100 000
Näytemäärä		25	23	12	10
Finnzymes, lyhyt ajo	Pearsonin korrelaatio	0,551	0,300	0,405	0,993
	Merkitsevyys	0,00	0,16	0,19	0,00
Finnzymes, normaali ajo	Pearsonin korrelaatio	0,782	0,108	0,115	0,995
	Merkitsevyys	0,00	0,63	0,72	0,00
Applied Biosystems, lyhyt ajo	Pearsonin korrelaatio	0,551	0,523	0,803	0,998
	Merkitsevyys	0,00	0,01	0,00	0,00

6.2.2 Toistonäytteet

Toistonäytteinä käytettiin kahta potilasnäytettä, joiden alkuperäiset pitoisuudet olivat 510 ja 6920 kopiota/ml. Näytteet ajettiin seitsemässä eri ajossa molemmilla ajo-ohjelmilla. Kuviosta 12 näemme, että Applied Biosystems:n normaaliajolla toistettavuus oli hyvä molemmilla tasoilla. Finnzymesilla tulosten hajonta oli paljon suurempaa kuin Applied Biosystemsillä. Tämä näkyy varsinkin keskitason näytteessä.

Applied Biosystemsin lyhyen ajon tulosten vaihtelu oli suurempaa kuin normaaliajolla ja keskitason toistonäytteen tulokset olivat pääosin matalampia. Finnzymesin keskitason toistonäytteellä tulostaso vaihteli todella paljon normaalilla ja lyhyellä ajolla. Osa näytteistä oli todella korkeita ja kahden näytteen kohdalla rinnakkaiskuopassa ei havaittu ollenkaan monistumaa, vaikka toisessa kuopassa oli huomattava monistuma (ks. liite 1, taulukko 8 ja taulukko 9).



KUVIO 12. Matalan ja korkean tason toistonäytteiden vertailu eri mastermiksillä. Applied Biosystemsillä käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesillä lyhyttä ajoa. Tulosten yksikkö on kopiota/ml, puolilogaritminen asteikko.

Toistonäytteiden keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokerroimet ovat nähtävissä taulukossa 13. Tuloksista nähdään, että Applied Biosystemsillä normaaliajolla variaatiokerroin ja keskihajonta ovat muita parempia. Finnzymesin keskitason näytteissä on todella suuri keskihajonta ja tulostaso on korkea.

TAULUKKO 13. Matalan ja korkean toistonäytteen keskihajonnat ja variaatiokertoimet (CV%) eri ajopituuksilla ja mastermixeillä.

	Applied Biosystems Normaali ajo	Applied Biosystems Lyhyt ajo	Finnzymes Nor- maali ajo	Finnzymes Lyhyt ajo
Matala taso (510 kopiota/ml)				
Keskiarvo	582	623	554	897
Keskihajonta	222	1076	215	983
CV%	39%	173%	39%	110%
Korkea taso (6920 kopiota/ml)				
Keskiarvo	7229	1695	92775	41456
Keskihajonta	2359	4639	63152	33982
CV%	33%	274%	68%	82%

6.2.3 Standardisuurien vertailu

Standardisuurien paremmuutta voidaan vertailla tiettyjen lukuarvojen perusteella, joita on esitetty luvussa 5.3 Mittausasetukset. Luotettavalla menetelmällä standardisuurien tunnusluvut ovat hyväksymisehtojen rajoissa ja rinnakkaistulokset lähellä toisiaan.

Taulukossa 14 on esitetty toisen vaiheen standardisuurien kulmakertoimet (slope) ja selityssasteet (R_{sq}) jokaisesta ajosta sekä laskettu niiden keskiarvot ja keskihajonta. Kulmakertoimen tavoitearvosta (-3,3) poikkeaa eniten Applied Biosystems'in lyhyt ajo. Muiden ajojen kulmakertoimien keskiarvot ovat raja-arvojen -3,6 ja -3,2 sisällä. Molempien mastermixien lyhyen ajon kulmakertoimissa on suurempi vaihtelevuus kuin normaalilla ajolla. Molempien mastermixien selityssasteet ovat hyvät normaalilla ajo-ohjelmalla. Lyhyellä ajolla selityssasteet ovat huonommat erityisesti Finnzymesillä.

TAULUKKO 14. Toisen vaiheen standardisuurien kulmakerroin ja selitysaste.

Slope	Ajo1	Ajo2	Ajo3	Ajo4	Ajo5	Ajo6	Ajo7	Mean	StDev
Applied Biosystems Normaali ajo	-3,679	-3,506	-3,517	-3,523	-3,560	-3,550	-3,339	-3,525	0,100
Applied Biosystems Lyhyt ajo	-3,641	-3,773	-4,280	-3,969	-3,961	-3,814	-4,024	-3,923	0,206
Finnzymes Normaali ajo	-3,170	-3,374	-3,422	-3,427	-3,509	-3,428	-3,404	-3,391	0,106
Finnzymes Lyhyt ajo	-3,914	-3,124	-3,218	-3,317	-3,602	-3,789	-3,497	-3,494	0,294
Rs _q	Ajo1	Ajo2	Ajo3	Ajo4	Ajo5	Ajo6	Ajo7	Mean	StDev
Applied Biosystems Normaali ajo	0,994	0,997	0,989	0,963	0,995	0,990	0,993	0,989	0,012
Applied Biosystems Lyhyt ajo	0,798	0,990	0,987	0,972	0,997	0,969	0,991	0,958	0,071
Finnzymes Normaali ajo	0,990	0,995	0,985	0,973	0,989	0,989	0,981	0,986	0,007
Finnzymes Lyhyt ajo	0,815	0,970	0,968	0,978	0,989	0,911	0,824	0,922	0,074

6.2.4 Kvalitatiivinen sensitiivisyys ja spesifisyys

Kvantitatiivisen vertailun lisäksi testasimme myös tulosten kvalitatiivista yhtenevyyttä eli käsitelimme näytteitä joko positiivisina tai negatiivisina. Tällä hetkellä Applied Biosystemsillä on positiivisuuden rajana 250 kopiota/ml. Tätä olemme käyttäneet myös omissa vertailuissamme. Sensitiivisyys ilmoittaa tutkimuksen kyvyn havaita infektio ja spesifisyys tutkimuksen kyvyn erottaa terveet henkilöt sairaista. Laskuissa oli mukana kaikki toisen vaiheen näytteet.

Taulukossa 15 on laskettuna Finnzymesin lyhyen ajon tulosten sensitiivisyys ja spesifisyys. Näemme, että sensitiivisyys on 100 % ja spesifisyys 92,9 %. Applied Biosystemsillä saatiin positiivinen tulos yhteensä 63 näytteestä. Finnzymesillä on lisäksi saatu kolmella näytteellä positiivinen tulos, vaikka Applied Biosystemsillä tulos on ollut negatiivinen. Nämä kolme näytettä ovat alun perin olleet positiivisia, mutta nyt Applied Biosystemsillä tulokset ovat juuri määritysrajan alapuolella. Finnzymesin spesifisyys on siis todellisuudessa 100%.

TAULUKKO 15. Finnzymesin lyhyen ajon sensitiivisyys ja spesifisyys, määrittärajana on 250 kopiota/ml.

		Applied Biosystems normaaliajo		
		>250	<250	Yhteensä
Finnzymes Lyhyt ajo	>250	63	3	66
	<250	0	39	39
	Yhteensä	63	42	105
	Sensitiivisyys 100 %			
Spesifisyys 92,9 %				

Taulukossa 16 on Applied Biosystems'in lyhyen ajon tulosten sensitiivisyys ja spesifisyys käyttäen positiivisuuden rajana 250 kopiota/ml. Tällöin sensitiivisyys oli 76,2 % ja spesifisyys 100 %. Huono sensitiivisyys aiheutuu 15 näytteestä, jotka normaalilla ajolla olivat positiivisia, mutta lyhyellä ajolla negatiivisia. Nämä kaikki näytteet ovat alun perin olleet positiivisia. Tuloksissa oli myös muutama näyte, jotka alun perin olivat positiivisia, mutta nyt antavat tulokseksi molemmilla menetelmillä <250 kopiota/ml.

TAULUKKO 16. Applied Biosystems'in lyhyen ajon sensitiivisyys ja spesifisyys, määrittärajana on 250 kopiota/ml.

		Applied Biosystems normaaliajo		
		>250	<250	Yhteensä
Applied Biosystems lyhyt ajo	>250	48	0	48
	<250	15	42	57
	Yhteensä	63	42	105
	Sensitiivisyys 76,2 %			
Spesifisyys 100 %				

Finnzymesin normaaliajon tulosten sensitiivisyys ja spesifisyys on esitetty taulukossa 17. Sensitiivisyys oli 93,7 % ja spesifisyys 95,2 %. Finnzymesin normaalilla ajolla saatiin 61 positiivista näytettä. Näistä kaksi oli Applied Biosystems'in normaaliajolla negatiivisia, tuloksen ollessa hieman määrittärajana 250 kopiota/ml alapuolella. Alun perin nämä olivat olleet positiivisia. Näiden lisäksi Finnzymesin normaaliajolla saatiin neljä negatiivista tulosta, jotka olivat Applied Biosystemsillä positiivisia. Yhden näytteen kohdalla tulokset

erosivat toisistaan selvästi, Applied Biosystems oli positiivinen tuloksella 900 kopiota/ml ja Finnzymes negatiivinen tuloksella 40 kopiota/ml.

TAULUKKO 17. Finnzymesin normaalin ajon sensitiivisyys ja spesifisyys, määrittärajana on 250 kopiota/ml.

		Applied Biosystems normaaliajo		Yhteensä
		>250	<250	
Finnzymes normaali ajo	>250	59	2	61
	<250	4	40	44
	Yhteensä	63	42	105
Sensitiivisyys 93,7 %				
Spesifisyys 95,2 %				

7 TYÖN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Reliabiliteetti arvioi tutkimuksen tulosten toistettavuutta. Mitä paremmin toistomittausten tulokset yhtenevät sitä luotettavampi ja tarkempi tutkimus on (Vilka 2007: 149). Validiteetilla arvioidaan tutkimuksen kykyä mitata ilmiötä, jota oli tarkoitus tutkia. Validiteettia täytyy miettiä jo ennen mittauksia ja muotoilla tutkimuskysymykset niin, että niihin vastaamalla saadaan luotettavaa ja täsmällistä tietoa ilmiöstä. (Heikkilä 2004: 29.)

Teimme kaikki mittaukset geenimonomistuloriorille ominaisten työtapojen ja ohjeiden mukaan. DNA:n eristämisen ja PCR-ajon luotettavuuden tarkistimme vesikontrollilla, NTC-kontrollilla ja positiivisella näytekontrollilla. Kaikki vesi- ja NTC-kontrollit olivat negatiivisia ja positiivisia näytekontrolleja oli joka ajossa yleensä useampi ja tarkistimme niiden monistumisen. Mittaustuloksia eivät siis häirinneet ulkopuoliset kontaminaatiot ja DNA:n eristys oli onnistunutta. HUSLAB käyttää diagnostisten näytteiden kohdalla 5.3 Mittausasetukset -kappaleessa lueteltuja kriteerejä, joiden tulee toteutua, jotta näytteen tulos voidaan hyväksyä. Nämä kriteerit eivät toteutuneet kaikissa mittauksissamme, mutta koska tuloksiamme ei käytetty potilaiden hoidon arviointiin vaan menetelmävertailuun, se voidaan hyväksyä.

Olimme päässeet harjoittelemaan työssämme käytettäviä menetelmiä työharjoittelumme aikana. Tämä paransi työmme luotettavuutta huomattavasti, koska pystyimme suunnittelemaan työmme mittaukset paljon tarkemmin ja opimme, mitkä työvaiheet olivat tulosten luotettavuuden kannalta kriittisiä. Pidimme käyttämistämme reagensseista ja standardeista samanlaista kirjanpitoa kuin osastolla on tapana tehdä potilasnäytteiden kohdalla. Kaikki käyttämämme reagenssit oli testattu toimiviksi osaston kriteerien mukaisesti. Käyttämämme reagenssit ja välineet olivat oikein säilytettyjä ja niiden päiväykset olivat voimassa lukuun ottamatta inhibitiopaneelin liuoksia, jotka olivat juuri vanhentuneet. Käytimme työhömme kaiken tasoisia potilasnäytteitä, joita oli säilytetty ohjeiden mukaisesti. Käytimme myös viljeltyä virusta ja plasmidia, joiden toimivuus oli tarkistettu.

Määrittäminen on vaativa, koska siinä on monta tarkkuutta vaativaa vaihetta. Pyrimme tekemään mittaukset aina samalla tavalla, mutta joitain satunnaisvirheitä pääsi käymään. Kun virhe tapahtui, arvioimme sen vaikutusta tuloksiin. Esimerkiksi yhdessä ajossa Finnzymesin näytteitä ei sekoitettu ja sentrifugoitu ennen PCR-levylle pipetoimista. Mittauksen tulostaso oli hyvä, mutta rinnakkaisissa näytteissä oli tämän takia enemmän hajontaa.

Systemaattinen virhe tapahtui, kun käytimme Qiagenin reagenssia, jossa oli suurempi ROX-pitoisuus kuin Stratagenen analysaattorille oli suositeltu (Quanti Fast Probe PCR Handbook: 10). Tämä oli todennäköisesti syy siihen, että ROX ei toiminut, jolloin Qiagenin mittaussäätöissä ei voitu käyttää normalisointia. Toinen virhe oli lyhyen PCR-ajoon ohjelmoitu UNG-käsittely. Olimme ymmärtäneet Finnzymesin tuoteselosteesta, että siinä on UNG-entsyymi, mutta reagenssissa olikin vain UNG-käsittelyn mahdollistavat dUTP-nukleotidit. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut tuloksiin, koska käsittely tehdään ennen varsinaista PCR-ajoa lämpötilassa, jossa polymeeraasi ei aktivoitu.

Mittaukset tehtiin Stratagenen analysaattorilla, joka on määrittäksen varalaitte. Kaikkia tuloksia verrattiin Applied Biosystems:n normaaliajoon, koska se vastaa käytössä olevaa menetelmää. Applied Biosystems:n reaktioseosohjetta käytettiin myös fastmixeille, vaikka niiden tuoteselosteissa suositellaan eri ohjetta. Nyt ei kuitenkaan ollut tarkoituksena optimoida reagenssin toimintaa vaan saada vertailukelpoisia tuloksia.

Suurempien näytemäärien analysointi olisi parantanut tuloksiamme. Mittausten määrää rajoitti kuitenkin mittauksiin käytössä oleva aikamme ja se, että jouduimme tekemään omat mittauksemme osastolla tehtävien muiden määritysten lomassa. Ensimmäisessä vaiheessa inhibitiopaneelin liuosta riitti vain nyt tehtyihin määrityksiin. Pakastetemplaattien tutkimisessa olisi mittaukset täytynyt tehdä useammalla näytteellä. Nyt saaduista tuloksista on vaikea vetää johtopäätöksiä. Pakastettujen templaattien soveltuvuus PCR-reaktioon ei kuitenkaan ollut työmme tärkein vaihe. Reagenssin korrelaatio Applied Biosystems'n kanssa oli tärkein tutkittava asia ja pystyimme työssämme vastaamaan hyvin siihen liittyviin tutkimuskysymyksiin.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Tavoitteenamme oli selvittää, voisiko virologian osasto siirtyä sytomegaloviruksen nukleinihapon määrityksessä Applied Biosystems'n TaqMan Universal PCR Master Mix -reagenssista Qiagenin QuantiFast Probe PCR tai Finnzymes'in DyNAmo™ Flash Probe qPCR reagenssin käyttöön ja lyhyempään PCR-ohjelmaan. Kyseisistä fastmixeistä ei ollut aiempaa kokemusta virologian osastolla eikä niistä löytynyt tutkimustietoa CMV- diagnostiikkaan liittyen.

Tuloksista selvisi, että Applied Biosystems'in reagenssi ei toimi lyhyellä ajolla niin hyvin kuin normaalilla. Normaaliajon tulokset olivat hyvin paikkansapitävät aikaisempien ja odotettujen tulosten kanssa. Lyhyellä ajolla tulokset jäivät yleensä selvästi pienemmiksi eikä ohjelmaa voi käyttää potilasnäytteiden tutkimisessa. Fastmixit toimivat lyhyellä ajolla odotetusti paremmin. Normaalilla ajolla tulokset olivat yleensä liian korkeita todennäköisesti siksi, että reagenssivalmistajat ovat optimoineet reagenssin nimenomaan lyhyille ajoille. Tuloseröjen takia painotimme vertailussa fastmixien lyhyitä ajoja ja Applied Biosystems'in normaalia ajoa.

Ensimmäisessä vaiheessa oli tarkoitus selvittää, kumpi fastmix toimisi paremmin CMV:n diagnostiikassa. Tulokset olivat kuitenkin ristiriitaisia ja valinta niiden perusteella vaikea. Inhibitiopaneelissa ei löytynyt selkeitä eroja fastmixien välillä. Mikään inhibiittoreista ei selvästi inhiboinut PCR-reaktiota kummallakaan fastmixillä. Tulosten vaihtelu ei ilmeisesti

johtunut inhibitiosta vaan PCR-menetelmän herkkyyden aiheuttamasta epätarkkuudesta. Menetelmästä johtuen 50%:n suuruiset tulosvaihtelut ovat mahdollisia ja hyväksyttäviä. Finnzymenin tuloksissa näytti kuitenkin olevan vähemmän hajontaa kuin Qiagenin tuloksissa, mutta tämäkään ero ei ollut kovin selkeä.

Inhibitiopaneelin tulokset osoittivat, että Applied Biosystems'in TaqMan Universal PCR mastermixillä hepariini inhiboi monistumisen täysin. Tulos oli merkittävä, sillä vaikka hepariinin tiedettiin olevan mahdollinen inhibiittori, asiaa ei ole aiemmin tutkittu virologian osastolla.

Pakastamisen vaikutus templaatteihin havaittiin selvästi ainoastaan Applied Biosystems'in reaktioliuoksella. Pakastamisen jälkeen pitoisuudet laskivat ja korkean näytteen kohdalla pitoisuuden pudotus oli todella suuri. Pakastamisen madaltava vaikutus tuloksiin oli aiemmin todettu Paula Marttisen opinnäytetyössä (2007). Pakastamisen aikana templaattiseokseen mahdollisesti saostuu jokin yhdiste, joka inhiboi Applied Biosystems'in mastemixiä. Inhibiittori voi olla peräisin MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit- paketin reagenssista. Tämä inhibiittori vaikutti vain vähän tai ei ollenkaan testattuihin fastmixeihin. Tuloksissa on kuitenkin hajontaa jonkin verran ja on vaikea sanoa, vaikuttaako pakastaminen siihen. Kummankaan fastmixin tulostaso ei kuitenkaan selvästi pudonnut, joten emme voi tämän testin perusteella sanoa, kumpi fastmixeistä on parempi.

Laimennossarjan mittauksissa saatiin kaikilla kolmella mastermixillä pitoisuudella 25 kopiota/ml kuoppia, joissa monistumista ei havaittu, joten tulokset ovat tämänkin suhteen yhteneviä. Finnzymenin laimennossarjan keskihajonta oli vähän alhaisempi kuin Qiagenilla. Variaatiokertoimen arvot olivat molemmilla reagensseilla samaa luokkaa. Laimennossarjan tulosten perusteella vaikutti siltä, että Qiagenin tuloksissa olisi matalilla pitoisuuksilla vähemmän vaihtelua kuin Finnzymesillä.

Standardisuoria vertailemalla huomasimme Finnzymenin antavan kulmakertoimen suhteen parempia tuloksia kuin Qiagen. Qiagenin standardisuorien selitysasteet olivat kuitenkin paremmat kuin Finnzymenin. Finnzymesillä oli standardisuorien rinnakkaiskuoppien välillä suurempia eroja kuin Qiagenilla, tosin yhden kerran tämä johtui tekemästämme satunnaisvirheestä.

Tulosten perusteella valitsimme Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR reagenssin toisen vaiheen jatkotutkimuksiin. Finnzymesin valitsemisen puolesta puhui tulosten parempi korrelaatio Applied Biosystems'n kanssa. Myös regressiosuoran yhtälö oli parempi Finnzymesillä, joten tulostasoa oli lähempänä oikeaa. Finnzymes on myös kotimainen ja reagenssi on halvempi kuin Qiagenilla. Qiagenin korrelaatiokerroin oli huonompi kuin Finnzymesillä ja regressiosuoran yhtälöstä näimme, että tulokset olivat kaksinkertaiset Applied Biosystems'n tuloksiin verrattuna. Qiagenin tulokset olivat todella paljon Applied Biosystems'n tuloksia suurempia korkeilla viruspitoisuuksilla.

Toisessa vaiheessa tarkoituksenamme oli selvittää soveltuuko nopea PCR-ohjelma Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR -reaktioliuoksella CMV:n nukleinihapon määrittämiseen. Tuloksia verrattiin Applied Biosystems'n TaqMan Universal PCR reaktioliuoksella saatuihin tuloksiin. Tuloksista huomasimme, että Applied Biosystems'n nopean ajon tulokset jäivät mataliksi ja Finnzymesin normaaliajon tulokset olivat todella korkeita. Keskitimme Applied Biosystems'n normaaliajon ja Finnzymesin lyhyen ajon tuloksiin.

Applied Biosystems'n TaqMan Universal PCR MasterMix ja Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Master Mix korreloivat keskenään kohtuullisesti. Eri pitoisuustasoilla korrelaatioissa oli eroja siten, että kaikkein korkeimmilla pitoisuuksilla (>100 000 kopiota/ml) se oli korkeinta, ja pitoisuuksilla 1000 - 10 000 kopiota/ml matalinta. Kun kaikki pitoisuudet otettiin mukaan hajontakuviin, tulosten välinen hajonta oli selvää. Finnzymesin tulokset olivat pääsääntöisesti liian korkeita, y-akselin leikkauspisteen ollessa noin 24 000 kopiota/ml. Selitysaste R_{sq} oli vain 0,40, jolloin korrelaatio on $r = 0,63$. Korrelaation olisi täytynyt olla todella voimakasta (>0,9), tulostason hyvin samansuuruinen ja toistettavuuden hyvä, jotta reagenssin käyttöönottoa olisi voitu harkita.

Toistonäytteiden kohdalla Finnzymesin tulosten vaihtelevuus oli selvästi suurempaa verrattuna Applied Biosystems'n tuloksiin, jotka olivat varsin tasaiset. Kaikkien ajojen standardisuurien tulokset olivat suhteellisen hyvät kulmakertoimien osalta. Standardisuurien selitysasteet olivat jonkin verran huonompia lyhyellä ajolla kuin normaalilla ajolla. Standardisuurissa oli enemmän hajontaa Finnzymesin lyhyessä ajossa verrattuna Applied Biosystems'n normaaliajoihin.

Yllä esitettyjen tulosten perusteella on mielestämme selvää, että Finnzymesin DyNAmo™ Flash Probe qPCR Master Mix ei sovellu suoraan CMV:n nukleiinihapon kvantitatiiviseen diagnostiikkaan HUSLABin virologian osastolla. Tulokset vaihtelevat liikaa ollakseen luotettavia. Muillakin valmistajilla on tarjota fastmixejä ja jokin toinen fastmix voisi sopia paremmin virologian osastolle. Jos lyhyempään ajo-ohjelmaan halutaan siirtyä, täytyy näitä muitakin fastmiksejä testata. Esimerkiksi Applied Biosystemsiltä on tullut markkinoille TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, jonka tulokset voisivat olla yhtenevämmät nykyisen TaqMan Universal PCR Master Mix -reagenssin kanssa. Tämän reagenssin käyttöönotto vaatisi kuitenkin laitehankintoja.

Koska kvantitatiiviset tulokset eivät vaikuttaneet hyviltä, laskimme tuloksista myös kvalitatiivisen sensitiivisyyden ja spesifisyyden. Nämä tulokset olivat Finnzymesin masterimixin lyhyellä ajolla hyvät. Finnzymesin tulosten perusteella voi hyvin varmasti sanoa, onko näyte positiivinen vai negatiivinen. Reagenssi voisi sopia kvalitatiiviseen määrittelyyn, mutta sitä pitäisi vielä testata lisää ennen käyttöönottoa. Kannattaa kuitenkin miettiä, onko hieinan nopeampi kvalitatiivinen tulos niin tarpeellinen, ettei voida odottaa kvantitatiivista tulosta.

Fastmixeistä voimme todeta, että ne sietävät hyvin inhibiittoreita ja niillä voidaan todennäköisesti analysoida myös pakastettuja templaatteja. Myös niiden herkkyudet ovat hyvät. Fastmixeillä mitatut standardisuorat eivät aina olleet hyväksymisrajoissa ja korkeilla näytepitoisuuksilla niiden antamissa tuloksissa oli paljon vaihtelua.

Olemme saaneet paljon lisää kokemusta ja syventäneet tietoaamme reaaliaikaisista PCR-määrittelyksistä tätä opinnäytetyötä tehdessämme. Mittausten itsenäinen teko ja aikataulujen suunnittelu on ollut hyödyllistä. Huomasimme, että tulosten tilastollisessa käsittelyssä tulee ottaa huomioon paljon eri asioita, etteivät tulokset vääristy. Tulosten luotettavuuden arviointi on myös ollut opettavaista. Olemme molemmat kiinnostuneet kliinisestä mikrobiologiasta ja työn aihe oli meille mieleinen.

LÄHTEET

- Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004a: Chemistries. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.): A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, California: International University Line.
- Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004b: Template Handling, Preparation, and Quantification. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.): A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, California: International University Line.
- Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004c: Instrumentation. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.): A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, California: International University Line.
- Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004d: The PCR Step. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.): A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, California: International University Line.
- Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004e: Data Analysis and Interpretation. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.): A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, California: International University Line.
- DyNAmo Flash Probe qPCR Kit Instruction manual 2008. Finnzymes. Verkkodokumentti. <http://www.finnzymes.fi/pdf/dynamo_flash_probe_qpcrkit_1_1.pdf>. Luettu 2.5.09.
- Finnzymes 2009: Principles of qPCR. Helsinki: Edita.
- Heikkilä, Tarja 2004: Tilastollinen tutkimus. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Hilscher, Chelsey – Vahrson, Wolfgang – Dittmer, Dirk P. 2005: Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic Acids Res.* 33 (21).
- Hukkanen, Veijo – Suni, Jukka – Lautenschlager, Irmeli – Linnavuori, Kimmo 2005: Herpesvirusten ryhmä. Teoksessa Huovinen, Pentti - Meri, Seppo - Peltola, Heikki - Vaara, Martti - Vaheri, Antti - Valtonen, Ville (toim.): *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*, kirja I. 1.painoksen muuttumaton jatkopainos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- HUSLAB 2008: Geenimonistus. Sytomegalovirus, kvantitatiivinen DNA-osoitus (P-CMVNh). Työohje. Helsinki: Kliininen mikrobiologia. Virologian osasto.
- Landolfo, Santo – Gariglio, Marisa - Gribaudo, Giorgio – Lembo, David 2003: The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics* 98 (2003) 269-297.

- MagNA Pure LC 2.0 System. Roche Applied Science. 2009. Verkkodokumentti. <https://www.roche-applied-science.com/sis/automated/magna_lc/index.jsp>. Luettu 18.9.09.
- Mannonen, Laura 2009. Sairaalamikrobiologi. HUSLAB, virologian osasto. Helsinki. Suullinen tiedonanto 6.10.2009
- Marttinen, Paula 2007: Epstein-Barrin viruksen nukleiinihappomääritys plasmasta kvantitatiivisella reaaliaikaisella menetelmällä. Qiagen artus® EBV-testin verifiointi HUSLABin virologian osastolle. Opinnäytetyö. Helsinki: Helsingin ammattikorkeakoulu. Sosiaali- ja terveysala. Bioanalytiikan koulutusohjelma.
- OptiChallenge Inhibition Panel. Acrometrix. 2009. Tuoteseloste. Päivitetty 7.3.2007.
- Piiparinen H. – Höckerstedt K. – Grönhagen-Riska C. – Lautenschlager I. 2004: Comparison of two quantitative CMV PCR test, Cobas Amplicor CMV monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *Journal of Clinical Virology* 30 (2004) 258-266.
- Piiparinen, Heli – Lautenschlager, Irmeli 2006: Quantitative TaqMan® Assay for the Detection and Monitoring of Cytomegalovirus Infection in Organ Transplant Patients. Teoksessa Didenko, Vladimir V. (toim.): *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*. Totowa, New Jersey. Humana Press Inc.
- qPCR Technical Guide. 2009. Sigma-Aldrich®. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/qpcr_technical_guide.Par.0001.File.tmp/qpcr_technical_guide.pdf>. Luettu 30.9.2009
- QRT-PCR-kalvot 2006. Kuopion yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.uku.fi/sbi/MOGEII2006/QRT-PCRkalvot2006.pdf>>. Luettu 2.5.09.
- QuantiFast Probe PCR Handbook 2007. Qiagen. Verkkodokumentti. <<http://www1.qiagen.com/products/pcr/QuantiFast/QuantiFastProbePCRKit.aspx#Tabs=t2>>. Luettu 2.5.2009
- Shibley, Gregory L. 2006: An introduction to real-time PCR. Teoksessa Dorak, M. Tefvik (toim.): *Real-time PCR*. Abingdon: Taylor & Francis Group.
- Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2003: *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Helsinki: Opetushallitus.
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, Protocol 2002. Applied Biosystems. Verkkodokumentti. <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general_documents/cms_042996.pdf>. Luettu 2.5.09.
- Tutkimusohjekirja. 2009. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. HUSLAB. <<http://huslab.fi/ohjekirja/index.html>>. Luettu 30.7.09.

- Whitley, Richard J. 2009: Herpesviruses. Graduate School of Biomedical Sciences. <<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch068.htm>>. Luettu 18.7.09.
- Vilka, Hanna 2007: Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Ylipalosaari, Pekka 2000: Sytomegaloinfektiot. Oulun yliopisto. <<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/001005.htm>>. Luettu 18.7.09.
- Yoder, Kristine E. – Fishel, Richard 2008: Real-time quantitative PCR and fast QPCR have similar sensitivity and accuracy with HIV cDNA late reverse transcripts and 2-LTR circles. *Journal of Virological Methods* 153. 253–256.

MITTAUSTULOKSET

TAULUKKO 1. Inhibitiopaneelin tulosten keskiarvot (suluissa olevissa arvoissa hepariinia ei ole otettu huomioon). Applied Biosystemsillä käytetty normaalia ajoa ja Finnzymesillä ja Qiagenilla lyhyttä ajoa. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

	Applied Biosystems			Finnzymes			Qiagen		
	Avg.	StDev	CV%	Avg.	StDev	CV%	Avg.	StDev	CV%
Ei inhibitiota	3147	1309	42 %	4857	4	0 %	4105	2742	67 %
EDTA-plasma	6405	2941	46 %	5853	315	5 %	4318	1543	36 %
Hemolyysi, matala	2894	224	8 %	3869	1129	29 %	2957	439	15 %
Hemolyysi, keskitaso	5064	564	11 %	6586	69	1 %	5513	1965	36 %
Hemolyysi, korkea	1918	706	37 %	5733	1969	34 %	2026	525	26 %
Hepariiniplasma	0	0	0 %	1945	443	23 %	7635	1790	23 %
Lipemia	3745	1602	43 %	5168	1315	25 %	3180	11	0 %
Ikteria	6545	1090	17 %	4483	597	13 %	5117	1150	22 %
Keskiarvo	3714 (4245)	1054 (1205)	25% (29%)	4812	730	16 %	4356	1271	28 %

TAULUKKO 2. Inhibitiopaneelin kaikki tulokset. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

	Applied Biosystems					Finnzymes					Qiagen				
Normaaliajo	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
Ei inhibitiota	2221	4072	3147	1309	42 %	3037	1928	2483	784	32 %	145400	25740	85570	84612	99 %
EDTA-plasma	4325	8484	6405	2941	46 %	2807	3666	3237	607	19 %	82980	50140	66560	23221	35 %
Hemolyysi, matala	3052	2735	2894	224	8 %	2865	2576	2721	204	8 %	24600	72880	48740	34139	70 %
Hemolyysi, keskitaso	4665	5462	5064	564	11 %	5371	5474	5423	73	1 %	65720	44490	55105	15012	27 %
Hemolyysi, korkea	2417	1418	1918	706	37 %	3889	2763	3326	796	24 %	21300	24990	23145	2609	11 %
Hepariini-plasma	0	0	0	0	0 %	6416	6492	6454	54	1 %	1004	787	896	153	17 %
Lipemia	4878	2612	3745	1602	43 %	6469	5124	5797	951	16 %	32940	41390	37165	5975	16 %
Ikteria	7315	5774	6545	1090	17 %	5822	4686	5254	803	15 %	93850	46030	69940	33814	48 %
Keskiarvo			3714	1054	25 %			4337	534	14 %			48390	24942	40 %
Lyhyt ajo	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
Ei inhibitiota	2945	1756	2351	841	36 %	4860	4854	4857	4	0 %	6044	2166	4105	2742	67 %
EDTA-plasma	2039	1247	1643	560	34 %	5630	6075	5853	315	5 %	3227	5409	4318	1543	36 %
Hemolyysi, matala	1807	1332	1570	336	21 %	3070	4667	3869	1129	29 %	3267	2646	2957	439	15 %
Hemolyysi, keskitaso	3666	3066	3366	424	13 %	6635	6537	6586	69	1 %	4123	6902	5513	1965	36 %
Hemolyysi, korkea	678	1335	1007	465	46 %	4341	7125	5733	1969	34 %	2397	1654	2026	525	26 %
Hepariini-plasma	0	0	0	0	0 %	1632	2258	1945	443	23 %	8901	6369	7635	1790	23 %
Lipemia	1393	2166	1780	547	31 %	4238	6098	5168	1315	25 %	3187	3172	3180	11	0 %
Ikteria	2945	4701	3823	1242	32 %	4905	4061	4483	597	13 %	5930	4304	5117	1150	22 %
Keskiarvo			1942	552	27 %			4812	730	16 %			4356	1271	28 %

TAULUKKO 3. Laimennossarjan kaikki tulokset. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

Applied Biosystems														
Normaali ajo								Lyhyt ajo						
Laimennos	Kuoppa1	Kuoppa2	Kuoppa3	Kuoppa4	Avg.	StDev	CV	Kuoppa1	Kuoppa2	Kuoppa3	Kuoppa4	Avg.	StDev	CV
25	0	0	90	0	23	45	200 %	0	38	0	0	10	19	200 %
250	187	303	537	178	301	167	55 %	124	37	182	293	159	107	68 %
2500	1072	4052	4464	2348	2984	1570	53 %	2863	1489	2234	4081	2667	1097	41 %
25000	18140	23210	35620	23180	25038	7447	30 %	25780	27240	31660	24420	27275	3142	12 %
250000	214600	326200	241400	220800	250750	51588	21 %	285300	505800	286700	193100	317725	132813	42 %
Keskiarvo						12163	72 %						27436	72 %
Finnzymes														
Normaali ajo								Lyhyt ajo						
Laimennos	Kuoppa1	Kuoppa2	Kuoppa3	Kuoppa4	Avg.	StDev	CV	Kuoppa1	Kuoppa2	Kuoppa3	Kuoppa4	Avg.	StDev	CV
25	27	0	0	7	9	13	150 %	0	0	55	0	14	28	200 %
250	4671	261	322	538	1448	2152	149 %	1033	122	449	308	478	393	82 %
2500	1741	1825	1359	1499	1606	215	13 %	2476	1102	1357	630	1391	783	56 %
25000	21490	17800	27480	17800	21143	4569	22 %	25080	11770	25810	16240	19725	6859	35 %
250000	266800	158400	164600	129600	179850	59939	33 %	339100	140500	109800	73530	165733	118775	72 %
Keskiarvo						13378	73 %						25368	89 %
Qiagen														
Normaali ajo								Lyhyt ajo						
Laimennos	Kuoppa1	Kuoppa2	Kuoppa3	Kuoppa4	Avg.	StDev	CV	Kuoppa1	Kuoppa2	Kuoppa3	Kuoppa4	Avg.	StDev	CV
25	0	0	9	0	2	5	200 %	0	141	0	37	45	67	150 %
250	472	136	176	170	239	157	66%	183	135	148	371	209	110	52 %
2500	765	1201	1719	2192	1469	620	42 %	3878	1469	1558	4511	2854	1570	55 %
25000	19590	22340	39880	23820	26408	9151	35 %	75560	13530	12360	92810	48565	41732	86 %
250000	132100	219700	322400	152500	206675	85748	41 %	258900	63480	.	.	161190	138183	86 %
Keskiarvo						19136	77 %						36332	86 %

TAULUKKO 4. Pakastamisen vaikutus templaatteihin. Normaalijon kaikki tulokset. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

	Applied Biosystems					Finnzymes					Qiagen				
Ennen pakastusta	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
420	257	232	245	18	7 %	586	422	504	116	23 %	144	197	171	37	22 %
620	73	219	146	103	71 %	714	484	599	163	27 %	1039	1271	1155	164	14 %
2720	4020	5767	4894	1235	25 %	11420	10330	10875	771	7 %	5984	12730	9357	4770	51 %
81100	85710	62250	73980	16589	22 %	136100	123400	129750	8980	7 %	565	93800	47183	65927	140 %
Keskiarvo				4486	31 %				2507	16 %				17725	57 %
Pakastamisen jälkeen	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
420	51	161	106	78	73 %	589	597	593	6	1 %	81	101	91	14	16 %
620	228	89	159	98	62 %	989	1499	1244	361	29 %	632	484	558	105	19 %
2720	3281	1549	2415	1225	51 %	16630	9422	13026	5097	39 %	2933	6339	4636	2408	52 %
81100	1967	1419	1693	387	23 %	158700	134300	146500	17253	12 %	69360	76850	73105	5296	7 %
Keskiarvo				447	52 %				5679	20 %				1956	23 %

TAULUKKO 5. Pakastamisen vaikutus templaatteihin. Lyhyen ajon kaikki tulokset. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

	Applied Biosystems					Finnzymes					Qiagen				
Ennen pakastusta	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
420	31	29	30	1	5 %	437	427	432	7	2 %	100	105	103	4	3 %
620	64	91	78	19	25 %	917	805	861	79	9 %	2196	634	1415	1105	78 %
2720	1162	741	952	298	31 %	11110	13620	12365	1775	14 %	2572	4979	3776	1702	45 %
81100	40920	67280	54100	18639	34 %	361500	194800	278150	117875	42 %	264000	130400	197200	94469	48 %
Keskiarvo				4739	24 %				29934	17 %				24320	44 %
Pakastamisen jälkeen	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
420	0	0	0	0	0 %	404	594	499	134	27 %	24	60	42	25	61 %
620	0	56	28	40	141 %	420	798	609	267	44 %	558	553	556	4	1 %
2720	13	0	7	9	141 %	8732	10290	9511	1102	12 %	4183	3604	3894	409	11 %
81100	0	0	0	0	0 %	395800	1086000	740900	488045	66 %	127700	56760	92230	50162	54 %
Keskiarvo				12	71 %				122387	37 %				12650	32 %

TAULUKKO 6. Toisen vaiheen Applied Biosystems'in kaikki tulokset. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

ID	Applied Biosystems, normaali ajo					Applied Biosystems, lyhyt ajo				
	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
1	41180	34860	38020	4469	12 %	2092	4199	3146	1490	47 %
2	6288	4554	5421	1226	23 %	559	257	408	214	52 %
3	263	484	374	156	42 %	244	347	296	73	25 %
4	102700	151100	126900	34224	27 %	24400	10110	17255	10105	59 %
5	2618	2319	2469	211	9 %	510	4470	2490	2800	112 %
6	11380	11970	11675	417	4 %	1771	1937	1854	117	6 %
7	1456	1680	1568	158	10 %	251	1100	676	600	89 %
8	435	425	430	7	2 %	25	280	153	180	118 %
9	8947	8946	8947	1	0 %	5468	2371	3920	2190	56 %
10	3365	3443	3404	55	2 %	1226	2046	1636	580	35 %
11	51350	52130	51740	552	1 %	13670	15600	14635	1365	9 %
12	349	106	228	172	76 %	173	144	159	21	13 %
13	5899	10610	8255	3331	40 %	4535	4673	4604	98	2 %
14	385	382	384	2	1 %	240	199	220	29	13 %
15	23730	40770	32250	12049	37 %	14290	13680	13985	431	3 %
16	4870000	6622000	5746000	1238851	22 %	3147000	1824000	2485500	935502	38 %
17	446	598	522	107	21 %	146	0	73	103	141 %
18	81	106	94	18	19 %	86	86	86	0	0 %
19	2445	3142	2794	493	18 %	1583	896	1240	486	39 %
20	98120	103000	100560	3451	3 %	13830	39550	26690	18187	68 %
21	16260	100000	58130	59213	102 %	4091	3430	3761	467	12 %
22	7381	11840	9611	3153	33 %	2541	9939	6240	5231	84 %
23	147200	139000	143100	5798	4 %	40260	29770	35015	7418	21 %
24	8407	8198	8303	148	2 %	1514	1685	1600	121	8 %
25	766	1911	1339	810	60 %	153	272	213	84	40 %
26	607	171	389	308	79 %	118	53	86	46	54 %
27	1860	2948	2404	769	32 %	530	687	609	111	18 %
28	375300	343700	359500	22345	6 %	88510	56230	72370	22825	32 %
29	6389	8202	7296	1282	18 %	1422	2670	2046	882	43 %
30	370200	329900	350050	28496	8 %	51740	85770	68755	24063	35 %
31	1086	708	897	267	30 %	135	234	185	70	38 %
32	3768	5439	4604	1182	26 %	742	1237	990	350	35 %
33	247	702	475	322	68 %	377	134	256	172	67 %
34	68710	90270	79490	15245	19 %	13460	31530	22495	12777	57 %
35	117500	155600	136550	26941	20 %	24320	37640	30980	9419	30 %
36	99070	125100	112085	18406	16 %	20380	46390	33385	18392	55 %
37	62810	57840	60325	3514	6 %	15470	10750	13110	3338	25 %
38	666	346	506	226	45 %	97	419	258	228	88 %
39	10810	11080	10945	191	2 %	1170	3127	2149	1384	64 %
40	6025	11430	8728	3822	44 %	1151	467	809	484	60 %
41	215	65	140	106	76 %	10	26	18	11	63 %
42	28550	38850	33700	7283	22 %	5014	6213	5614	848	15 %
43	375	203	289	122	42 %	19	53	36	24	67 %
44	16590	22660	19625	4292	22 %	1158	2308	1733	813	47 %
45	5546	2928	4237	1851	44 %	367	915	641	387	60 %

	Applied Biosystems, normaali ajo					Applied Biosystems, lyhyt ajo				
ID	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
46	8123	8537	8330	293	4 %	1005	1212	1109	146	13 %
47	21250	18700	19975	1803	9 %	1626	2354	1990	515	26 %
48	465400	429800	447600	25173	6 %	51150	45390	48270	4073	8 %
49	391	612	502	156	31 %	123	475	299	249	83 %
50	511	318	415	136	33 %	71	246	159	124	78 %
51	8679	9826	9253	811	9 %	2648	7833	5241	3666	70 %
52	628100	768400	698250	99207	14 %	183900	185300	184600	990	1 %
53	291	149	220	100	46 %	54	118	86	45	53 %
54	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
55	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
56	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
57	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
58	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
59	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
60	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
61	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
62	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
63	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
64	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
65	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
66	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
67	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
68	57	0	29	40	141 %	0	0	0	0	0 %
69	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
70	0	0	0	0	0 %	6	0	3	4	141 %
71	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
72	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
73	0	0	0	0	0 %	5	0	3	4	141 %
74	0	0	0	0	0 %	3	23	13	14	109 %
75	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
76	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
77	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
78	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
79	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
80	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
81	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
82	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
83	0	37	19	26	141 %	0	0	0	0	0 %
84	0	45	23	32	141 %	0	0	0	0	0 %
85	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
86	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
87	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
88	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
89	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
90	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
91	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %

TAULUKKO 7. Toisen vaiheen Finnzymesin kaikki tulokset. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

ID	Finnzymes, normaali ajo					Finnzymes, lyhyt ajo				
	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
1	816600	881400	849000	45821	5 %	253800	109700	181750	101894	56 %
2	4199	4039	4119	113	3 %	8555	194	4375	5912	135 %
3	271	162	217	77	36 %	282	299	291	12	4 %
4	132100	228500	180300	68165	38 %	869	881	875	8	1 %
5	2129	1250	1690	622	37 %	8428	280	4354	5762	132 %
6	5676	5459	5568	153	3 %	368	315	342	37	11 %
7	1203	638	921	400	43 %	321	1296	809	689	85 %
8	100	129	115	21	18 %	435	1096	766	467	61 %
9	5557	5886	5722	233	4 %	7083	6384	6734	494	7 %
10	6786	3068	4927	2629	53 %	8701	1177	4939	5320	108 %
11	40490	74340	57415	23936	42 %	17140	46790	31965	20966	66 %
12	305	204	255	71	28 %	394	118	256	195	76 %
13	8422	9379	8901	677	8 %	5883	12090	8987	4389	49 %
14	663	310	487	250	51 %	535	340	438	138	32 %
15	18630	23770	21200	3635	17 %	19680	36950	28315	12212	43 %
16	5442000	4154000	4798000	910754	19 %	26760000	5029000	15894500	15366137	97 %
17	177	479	328	214	65 %	651	367	509	201	39 %
18	145	167	156	16	10 %	145	314	230	120	52 %
19	2648	2728	2688	57	2 %	1124	3332	2228	1561	70 %
20	91220	124100	107660	23250	22 %	544200	360800	452500	129683	29 %
21	16940	12020	14480	3479	24 %	4089	136700	70395	93770	133 %
22	24	8215	4120	5792	141 %	53010	11030	32020	29684	93 %
23	165300	151700	158500	9617	6 %	63630	308400	186015	173079	93 %
24	8830	8896	8863	47	1 %	34640	3858	19249	21766	113 %
25	1738	1701	1720	26	2 %	970	291	631	480	76 %
26	966	302	634	470	74 %	847	329	588	366	62 %
27	3352	4005	3679	462	13 %	944	4353	2649	2411	91 %
28	216900	262700	239800	32385	14 %	962600	277100	619850	484722	78 %
29	6550	5103	5827	1023	18 %	2561	13980	8271	8074	98 %
30	457	244000	122229	172211	141 %	1161000	176300	668650	696288	104 %
31	41	41	41	0	0 %	426	1917	1172	1054	90 %
32	6887	10970	8929	2887	32 %	7373	8647	8010	901	11 %
33	861	1109	985	175	18 %	1468	1128	1298	240	19 %
34	109800	92370	101085	12325	12 %	133000	133700	133350	495	0 %
35	261300	231300	246300	21213	9 %	136500	136400	136450	71	0 %
36	87960	83220	85590	3352	4 %	160100	115800	137950	31325	23 %
37	72020	103500	87760	22260	25 %	55380	41770	48575	9624	20 %
38	465	447	456	13	3 %	883	916	900	23	3 %
39	21680	18480	20080	2263	11 %	60710	13980	37345	33043	88 %
40	7258	13640	10449	4513	43 %	14300	38800	26550	17324	65 %
41	260	212	236	34	14 %	1200	518	859	482	56 %
42	99900	61780	80840	26955	33 %	67160	207500	137330	99235	72 %
43	102	213	158	78	50 %	422	449	436	19	4 %
44	15470	30740	23105	10798	47 %	52010	75920	63965	16907	26 %
45	6016	6335	6176	226	4 %	10880	7414	9147	2451	27 %

ID	Finnzymes, normaali ajo					Finnzymes, lyhyt ajo				
	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%	Kuoppa1	Kuoppa2	Avg.	StDev	CV%
46	7834	8069	7952	166	2 %	15380	21900	18640	4610	25 %
47	27000	45600	36300	13152	36 %	303	360	332	40	12 %
48	823400	420900	622150	284610	46 %	750700	439400	595050	220122	37 %
49	914	743	829	121	15 %	5329	5873	5601	385	7 %
50	624	838	731	151	21 %	1775	697	1236	762	62 %
51	14660	21540	18100	4865	27 %	306	233	270	52	19 %
52	1132000	660000	896000	333754	37 %	1172	478	825	491	59 %
53	535	425	480	78	16 %	79	594	337	364	108 %
54	0	1	1	1	141 %	0	454	227	321	141 %
55	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
56	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
57	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
58	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
59	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
60	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
61	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
62	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
63	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
64	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
65	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
66	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
67	0	0	0	0	0 %	15	0	8	11	141 %
68	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
69	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
70	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
71	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
72	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
73	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
74	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
75	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
76	0	0	0	0	0 %	3	0	2	2	141 %
77	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
78	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
79	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
80	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
81	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
82	0	0	0	0	0 %	164	0	82	116	141 %
83	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
84	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
85	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
86	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
87	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
88	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
89	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
90	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %
91	0	0	0	0	0 %	0	0	0	0	0 %

TAULUKKO 8. Matalan pitoisuuden toistonäytteet. Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

	Applied Biosystems Normaali ajo	Applied Biosystems Lyhyt ajo	Finnzymes Normaali ajo	Finnzymes Lyhyt ajo
510	810	221	574	206
	695	96	214	570
	377	491	340	90
	301	242	642	436
	763	381	566	363
	632	4113	898	850
	1014	291	603	366
	614	180	673	549
	239	180	415	404
	595	209	444	1132
	405	72	397	1791
	727	417	1014	725
	645	205	389	3934
	337	1628	590	1148
Avg.	582	623	554	897
StDev	222	1076	215	983
CV%	38%	173 %	39%	109 %

TAULUKKO 9. Korkean pitoisuuden toistonäytteet Tulosten yksikkö on kopiota/ml. Lisäksi laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

	Applied Biosystems Normaali ajo	Applied Biosystems Lyhyt ajo	Finnzymes Normaali ajo	Finnzymes Lyhyt ajo
6920	7871	74	60250	127900
	12150	236	62220	622
	7442	510	111500	41000
	11000	2288	36370	12390
	7916	17690	0	20220
	8750	639	72540	44420
	7699	271	122900	30120
	7808	706	100400	17360
	4321	103	0	56170
	4303	63	240800	75260
	6237	212	96370	36140
	5287	91	104900	67890
	5474	596	153800	50540
	4942	257	136800	352
Avg.	7229	1695	92775	41456
StDev	2359	4639	63152	33982
CV%	33 %	274 %	68 %	82 %

LAITTEET JA REAGENSsit

Laitteet:

- MagNA Pure LC
- Stratagene Mx3005P
- Biohitin pipettejä
- Thermo Electronin pipettejä
- Vortex-sekoitin
- Levysentrifuugi
- Eppendorfsentrifuugi

Reagenssit:

- MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche
 - Lot: 11157000
 - Pesupuskuri I, II ka III
 - Proteinaasi K
 - Magneettipartikkelit
 - Lyysispuskuri
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems
 - Lot: KP2759, MP4108
- DyNAmo[™] Flash Probe qPCR Master Mix, Finnzymes
 - Lot: 2
 - ROX: Lot 40
- QuantiFast[™] Probe PCR Master Mix, Qiagenin
 - Lot: 133212388, 133199266
- CMV-alukkeet ja koetin
 - F Primer
 - R Primer
 - Probe

SYTOMEGALOVIRUKSEN NUKLEIINIHAPON MÄÄRITYS

Näytelaadut: ACD- tai EDTA-plasma (likvor, koepala). Plasma erotellaan vuorokauden kuluessa näytteenotosta. Näytteet säilyvät 5vrk 2-8 °C:ssa ja pidemmän ajan -20 °C:ssa.

1. Pipetoi MagNA Pure LC -analysointilaitteen näyteastiaan 200µl hyvin sekoitettua plasmaa pipetointikaavion mukaisesti. Lisäksi jokaiseen sarjaan pipetoidaan vesikontrolli ja positiivinen näytekontrolli.
2. Ohjelmoi MagNA Pure LC -analysointilaitteen eristysohjelma ohjeiden mukaisesti. Laita tarvittavat reagenssit ja muovitarvikkeet analysointilaitteeseen. Laita eristysajo päälle. Laite suorittaa eristysprosessin automaattisesti.
3. Valmista puhdastilassa sarjan reaktioseosputket. Tee reaktioseosta 2,25x määrä, koska kaikki näytteet ajetaan rinnakkaisina ja tarvitaan myös pipetointiväline. Eppendorff-putkia tarvitaan yksi jokaiselle näytteelle, yksi vesikontrollille, yksi positiiviselle kontrollille, viisi standardille ja yksi NTC-kontrollille.
4. Reaktioseokseen tarvitset: mastermix, aqua, F-primer, R-primer ja probe. Katso pipetointikaaviossa reagenssien määrät pipetointikaaviosta. Pipetoi 90µl reaktioseosta jokaiseen eppendorff-putkeen. Pipetoi NTC-putkiin lisäksi templaatin sijaan 22,5µl aquaa.
5. Pipetoi reaktioseosputkiin 22,5µl eristettyä CMV-templaattia (10µl templaattia/näyte; kerroin huomioituna). Pipetoi myös standardit, vesikontrolli ja positiivinen kontrolli omiin putkiinsa. Sekoita vorteksilla ja sentrifugoi lyhyesti.
6. Pipetoi näytteet kuoppalevyille pipetointisuunnitelman mukaisesti. Kuoppalevyille pipetoidaan 50µl valmista reaktioseosta. Pipetoi huolella ja korkita levy kunnolla. Sentrifugoi levy nopeasti.
7. Ohjelmoi Stratagene Mx3005P -analysointilaitteeseen erillisen ohjeen mukaisesti. Normaaliajo etenee seuraavasti: 1.50 °C 2 min, 2. 95 °C 10min, 3. 95 °C 15s, 4. 60 °C 1min, 45 kierrosta (vaiheet 3. ja 4.).
8. Kun analysointilaitteeseen on saatu ajon valmiiksi, tarkista, että mittaukset ovat hyväksymisrajojen sisällä. Vahvimman standardin Ct-arvon tulee olla 22 - 23 ±0,2, standardisuoran kulmakertoimen -3,2 ja -3,6 välillä ja positiivisen kontrollin ±50 % alkuperäisestä tuloksesta. Käytä non adaptive baseline -asetusta ja määritä Threshold fluorescence -arvo 0,1:een.
9. Negatiivinen tulos ilmoitetaan <250ge/ml. Positiiviset tulokset ilmoitetaan pyöristettynä ohjeiden mukaisesti.