



**PALSAMIN
KUOLIOLAIKKUVIRUKSEN
MÄÄRITTÄMINEN**

Kaupallisten ELISA-testien vertailu

Noora Kumlander

Opinnäytetyö
Joulukuu 2014
Laboratorioalan koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

KUMLANDER, NOORA:

Palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittäminen: Kaupallisten ELISA-testien vertailu

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Joulukuu 2014

Palsamin kuoliolaikkuvirus (INSV) on kasvipatogeeni, joka aiheuttaa tautia sadoissa kasvilajeissa. Vaaralliseksi kasvintuhoojaksi luokiteltu virus leviää saastuneiden kasvien ja ripsiäisten välityksellä aiheuttaen tyypillisesti kasvin lehtiin selkeärajaisia, renkaanmuotoisia laikkuja. Maailmanlaajuisesti levinnyttä palsamin kuoliolaikkuvirusta tavataan luonnossa useimmiten trooppisilla ja subtrooppisilla kasvillisuusvyöhykkeillä, mutta myös avomailla lauhkealla vyöhykkeellä. Viileällä vyöhykkeellä, kuten Suomessa, virusta esiintyy lähinnä kasvihuoneviljelmillä. Palsamin kuoliolaikkuviruksen torjunta perustuu ennaltaehkäisyyn, koska taudin toteamisen jälkeen siirtäjät ja taudinaiheuttaja hävitetään. Ilman torjuntatoimia viruksen leviäminen voi johtaa merkittäviin sadonmenetyksiin.

ELISA on immunologinen määrittämenetelmä, joka perustuu antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen sitoutumiseen. Kiinteälle pinnalle sidottuun antigeeniin sitoutuu vasta-aine, joka on yleensä entsyymillä leimattu. Vasta-aineessa kemiallisilla sidoksilla kiinni oleva entsyymi reagoi substraatin kanssa muodostaen värillisen lopputuotteen, jonka intensiteetti voidaan mitata spektrofotometrisesti. Menetelmä on suosittu sen helppouden, tarkkuuden ja alhaisten kustannusten vuoksi. Lisäksi se mahdollistaa usean näytteen samanaikaisen määrittämisen nopeasti, eikä testin suorittamiseen vaadita erikoisvälineistöä.

Opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa, ja sen tavoitteena oli saada Kasvintuhoojajaostossa nykyisin käytössä olevan kaupallisen ELISA-kitin rinnalle toinen kaupallinen testikitti, jolla olisi mahdollista määrittää palsamin kuoliolaikkuvirusta. Testiä voitaisiin käyttää epäselvien tai heikkojen positiivisten tulosten varmistamisessa. Työn tarkoituksena oli vertailla neljää kaupallista ELISA-testikittiä, joiden valmistajat olivat Loewe, Agdia, DSMZ ja PRI.

Tutkimuksen perusteella havaittiin DSMZ:n ELISA-testin sopivan Kasvintuhoojajaoston rutiinikäyttöön palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämisessä. Testi oli käytännöllinen ja helposti suoritettava sekä saatujen tulosten perusteella se todettiin luotettavaksi viruksen määrittämisessä.

Asiasanat: INSV, palsamin kuoliolaikkuvirus, kasvivirus, ELISA

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Science

KUMLANDER, NOORA:

Qualification of Impatiens Necrotic Spot Virus: Comparing Commercial ELISA Tests

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 3 pages
December 2014

Impatiens necrotic spot virus (INSV) is a pathogenic plant virus which causes damage in numerous plant species. This dangerous pest is transmitted by thrips but contaminated plants can also spread the virus. Typical symptoms of INSV are chlorotic and necrotic patches on leaves. Impatiens necrotic spot virus has spread worldwide and it exists usually in warm vegetation zones, for example in the subtropical zone. The control of this pest is based on prevention and without preventive measures INSV can cause considerable losses of crops.

ELISA is an immunological method which is based on the interaction of antigens and antibodies. Antigen is added to the solid phase and antibodies labeled with an enzyme bind with antigen. An enzyme linked to antibodies reacts with substrate, developing a color reaction through enzymatic catalysis. The color is quantified by the use of a spectrophotometer reading. The method is popular because of the ease of performance of the assay, accuracy and the low cost. ELISA allows for the rapid quantification of a large number of samples and does not require specialized equipment.

This Bachelor's thesis was made in co-operation with the Finnish Food Safety Authority Evira. The aim of this study was to introduce a new ELISA test which can be used to determine impatiens necrotic spot virus. Four different commercial tests were compared to find the best one for routine diagnostics in laboratory. The tests were made by Loewe, Agdia, DSMZ and PRI.

According to this study the ELISA test produced by DSMZ was suitable for use in the Evira Plant Analysis Unit. The test was practical and easy to perform. The results indicated that the DSMZ ELISA test was found to be a reliable quantification of impatiens necrotic spot virus.

Key words: INSV, impatiens necrotic spot virus, plant virus, ELISA

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1	Tospovirukset.....	7
2.2	Palsamin kuoliolaikkuvirus.....	9
2.2.1	Levinneisyys ja yleisyys	10
2.2.2	Siirtäjät	10
2.2.3	Isäntäkasvit.....	11
2.2.4	Taudin oireet ja vahingollisuus	11
2.2.5	Torjunta.....	13
2.3	ELISA-menetelmä	15
2.3.1	Suora ja epäsuora menetelmä.....	15
2.3.2	Sandwich-ELISA	17
2.3.3	Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät	18
2.4	Menetelmien vertailu	19
3	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS.....	20
4	TYÖN SUORITUS	21
4.1	Kasvimateriaali	21
4.2	Kasvinäytteiden esikäsittely	22
4.3	Bioreban INSV AgriStrip -pikatesti	22
4.4	Loewen ELISA-testi	23
4.5	Agdian ELISA-testi	26
4.6	DSMZ:n ELISA-testi	27
4.7	PRI:n ELISA-testi.....	29
4.8	Testien vertailu	31
5	TULOKSET	32
5.1	Neljän testin vertailu	32
5.2	Kahden testin jatkovertilu	38
6	POHDINTA.....	41
	LÄHTEET.....	45
	LIITTEET	48
	Liite 1. Puskureiden valmistusohjeet.....	48
	Liite 2. DSMZ:n ELISA-testi	50

LYHENTEET JA TERMIT

Antigeeni	Elimistössä immuunivasteen aiheuttava molekyyli, joka esiintyy esimerkiksi viruksen tai bakteerin pintarakenteessa
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
INSV	Impatiens necrotic spot virus, palsamin kuoliolaikkuvirus
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuri, jossa mukana suoloja
PBST	PBS, johon on lisätty Tween 20 -detergenttiä tunnettu pitoisuus
PRI	Plant Research International
Tospovirukset	Virussuku, joka aiheuttaa kasvitauteja
Transmissio	Siirto, siirtyminen, kulkeutuminen
TSWV	Tomato spotted wilt virus, tomaatin pronssilaikkuvirus

1 JOHDANTO

Palsamin kuoliolaikkuvirus on patogeeninen kasvivirus, joka aiheuttaa tuhoa sadoissa kasvilajeissa. Vaaralliseksi kasvintuhoojaksi luokiteltu virus on levinnyt maailmanlaajuisesti aiheuttaen suuria kustannuksia erityisesti vihannes- ja koristekasvien viljelijöille. Virus leviää ripsiäisten ja saastuneiden kasvien välityksellä. Suomi kuuluu suoja-alueeseen palsamin kuoliolaikkuviruksen suhteen, mutta sitä tavataan silti vuosittain kasvihuoneviljelmillä, joille se leviää taimiaineiston välityksellä muista EU-maista. Ennaltaehkäisy on merkittävin torjuntakeino, koska taudin toteamisen jälkeen kasviaineisto tulee hävittää.

ELISA on immunologinen määrittämenetelmä, joka perustuu määritettävän yhdisteen ja yhdisteen tunnistavan vasta-aineen sitoutumiseen. Reaktion lopputuotteena syntyvän värireaktion perusteella näyte todetaan joko positiiviseksi tai negatiiviseksi. ELISA:n avulla on mahdollista määrittää palsamin kuoliolaikkuvirusta ja menetelmän suosio perustuu sen helppouteen, tarkkuuteen sekä alhaisiin kustannuksiin. Lisäksi useaa näytettä voidaan määrittää samanaikaisesti, eikä testin suorittaminen vaadi erikoisvälineistöä.

Opinnäytetyön tavoitteena on saada nykyisin Eviran Kasvintuhoojajaostossa käytössä olevan kaupallisen ELISA-kitin rinnalle toinen kaupallinen testikitti, jolla voitaisiin määrittää palsamin kuoliolaikkuvirusta, ja jota voitaisiin käyttää epäselvien tai heikkojen positiivisten tulosten varmistamisessa. Työn tarkoituksena on vertailla kaupallisia ELISA-testejä palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämisessä ja laatia ohjeet käyttöön otettavasta testistä.

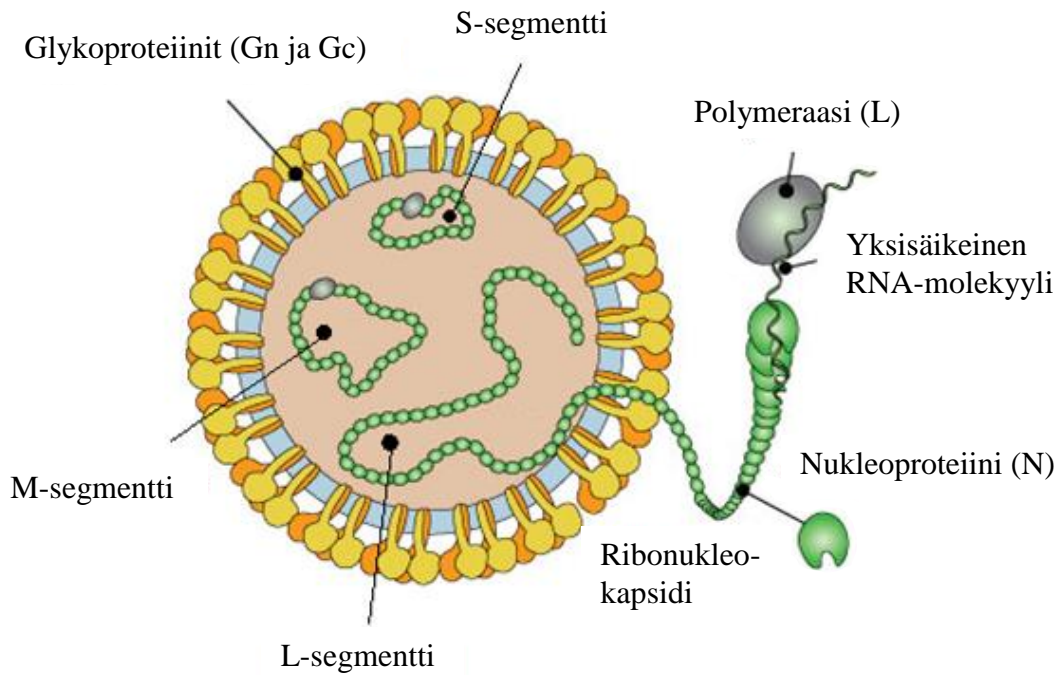
Opinnäytetyö toteutettiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Kasvianalytiikan yksikössä, Kasvintuhoojajaostossa kesän 2014 aikana. Työn ohjaajana toimi jaostopäällikkö ja kasvitautien erikoistutkija Jukka Tegel.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Tospovirukset

Tospovirukset ovat pallomaisia, lipidikalvon ympäröimiä kasvipatogeenejä. Hal-
kaisijaltaan 80–120 nm:n kokoiset virukset ovat *Bunyaviridae*-heimoon kuuluvia nega-
tiivisia RNA-virusia, jotka aiheuttavat kasvitauteja. Toisin kuin muut heimon virussu-
vut, tospovirukset eivät kykene infektoimaan eläimiä. Niiden ei ole myöskään todettu
aiheuttavan terveydellistä vaaraa ihmiselle. (Ball ym. 2005, 695; EFSA 2012, 9.)

Kuviossa 1 on esitetty tospoviruksen rakenne. Tospovirukset koostuvat kolmesta yksi-
juosteisesta RNA-segmentistä, L-, M- ja S-segmenteistä, jotka ovat tiukasti sitoutuneet
toisiinsa muodostaen lipoproteiini-vaipan ympäröimän ribonukleoproteiini-kompleksin.
L-segmentti koodaa RNA-ohjattua RNA-polymeraasia (L), joka osallistuu transkripti-
oon ja replikaatioon. Viruksen pinnalla sijaitsevat glykoproteiinit, Gn ja Gc, vuorovai-
kuttavat reseptorimolekyylien kanssa ja osallistuvat siten viruksen transmissioon. M-
segmentillä on tärkeä rooli viruksen solusta soluun siirtymisessä isäntäkasvissa. S-seg-
mentin sisältämä nukleoproteiini N on vastuussa partikkelien rakenteesta ja transkrip-
tion säätelystä sekä RNA:n hiljentämisestä. (EFSA 2012, 9; Yang ym. 2014, 1.)



KUVIO 1. Tospoviruksen rakenne (Viralzone 2010, muokattu).

Tospovirusten monistuminen tapahtuu elävän kasvisolun sytoplasmassa. Virus tuottaa oman perimänsä ja tarvitsemansa valkuaisaineet käyttäen hyväksi solun rakenteita ja aineita. Viruksen leviäminen tartuntakohtasta on ensin hidasta solusta soluun kulkeutumista. Johtosolukkaan päästyään se kulkeutuu nopeasti nilassa juuriin ja muihin kasvinosiin. Virus leviää systemaattisesti kaikkialle aiheuttaen ensin esimerkiksi kuoliolaikkuja lehtiin, minkä jälkeen kuolio-oireet leviävät koko kasviin. (Meinander & Pohto 2003, 10.)

Aiemmin tospovirukset luokiteltiin yhdeksi virukseksi, tomaatin pronssilaikkuvirukseksi (Tomato spotted wilt virus, TSWV). Taudin oireet kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 1915, ja virukseen liittyvä alkuperä selvisi 1930-luvulla. (Howley & Knipe 2007, 1746–1747.) Kyseistä taksonomista yksikköä pidettiin TSWV:n erilaisten muotojen ryhmänä 1990-luvulle asti, kunnes eri muotojen todettiin olevan omia viruslajejaan. Tospovirusten sukuun kuuluvia lajeja on kuvattu 29, joita ovat tomaatin pronssilaikkuviruksen lisäksi esimerkiksi palsamin kuoliolaikkuvirus ja kurkkukasveihin kuuluvia melonia, vesimelonia ja kurkkua infektoiva Watermelon silver mottle virus (WSMV). (Meinander & Pohto 2003, 9–10; ICTV 2014.)

Lähes jokaisen tospoviruksen on mahdollista aiheuttaa vahinkoa kasveissa. Ainoastaan PolRSV:n (*Polygonum ringspot virus*) ei ole todettu aiheuttavan tuhoa, vaikka virusta ja sen siirtämiseen sopivia ripsiäisiä esiintyy Euroopassa. Luonnossa tospovirukset leviävät *Thysanoptera*-heimoon kuuluvien ripsiäisten välityksellä. Lisääntyneen kansainvälisen kaupan myötä ne ovat levinneet maailmanlaajuisesti kaikkiin maanosiin. Virusten aikaansaamat kasvitaudit aiheuttavat taloudellisesti suuria tappioita, erityisesti koristekasveja viljeleville tahoille. (Agrios 2005, 795–799; EFSA 2012, 3–20.) Ympäri maailmaa taudeista aiheutuvien viljelysatojen menetykset ovat suuruudeltaan jopa miljardi euroa (Howley & Knipe 2007, 1746–1747).

2.2 Palsamin kuoliolaikkuvirus

Palsamin kuoliolaikkuvirus (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) on patogeeninen kasvivirus, joka aiheuttaa tuhoa erityisesti ruukku- ja ryhmäkasveille. Kasvinterveyden suojelemisesta annetun lain (702/2003) mukaan INSV luokitellaan vaaralliseksi kasvintuhoojaksi. Se kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 1991, minkä jälkeen sen on todettu levinneen maailmanlaajuisesti. (Meinander & Pohto 2003, 9–10; Evira 2011.)

Tospovirus-sukuun kuuluvan palsamin kuoliolaikkuviruksen taksonominen luokittelu on esitetty taulukossa 1 (Ball ym. 2005, 695–696). INSV leviää saastuneiden kasvien ja ripsiäisten välityksellä aiheuttaen tyypillisesti kasvin lehtiin renkaanmuotoisia laikkuja ja kuvioita. Kasvinsuojeluviranomaisille on ilmoitettava, mikäli havaitsee tai epäilee kasvintuhoojan olemassaolon. Ilman torjuntatoimia viruksen leviäminen voi johtaa merkittäviin sadonmenetyksiin. Suomessa INSV:tä on esiintynyt muutamia kertoja, mutta esiintymät on hävitetty. (Laki kasvinterveyden suojelemisesta 2003; Evira 2011.)

TAULUKKO 1. Palsamin kuoliolaikkuviruksen taksonominen luokittelu.

INSV:n taksonominen luokittelu	
Ryhmä	Ryhmä V (-) ssRNA
Heimo	<i>Bunyaviridae</i>
Suku	<i>Tospovirus</i>
Laji	<i>Impatiens necrotic spot virus</i>

2.2.1 Levinneisyys ja yleisyys

Palsamin kuoliolaikkuvirusta esiintyy luonnossa Keski- ja Etelä-Amerikan, Afrikan, Aasian ja Oseanian trooppisella ja subtrooppisella kasvillisuusvyöhykkeellä sekä avomailla Pohjois-Amerikan ja Etelä-Euroopan lauhkealla vyöhykkeellä. Viileällä vyöhykkeellä, kuten Suomessa, virusta esiintyy kasvihuoneviljelmissä. INSV:n leviämisen kannalta Suomi sijaitsee maantieteellisesti suojaisessa paikassa, koska kylmä ilmasto ja meri toimivat esteenä kasvintuhoojan leviämiselle. (Meinander & Pohto 2003, 3–6.)

INSV ei ole levinnyt maantieteellisesti yhtä laajalle alueelle kuin tomaatin pronssilaikkuvirus rajoittuneemman isäntäkasvilajiston ja siirtäjiksi sopivien ripsiäislajien vähäisen määrän takia (Morris 2011, 2–3). Viruksen leviäminen on tiukasti sidoksissa sen tärkeimmän siirtäjän, kalifornianripsiäisen, leviämiseen, sillä virus ei leviä siementen välityksellä (OEPP & EPPO 2004, 272). TSWV ja INSV esiintyvät toisinaan sekainfektiona, mikä on vaikeuttanut esiintymistietojen keräämistä (Meinander & Pohto 2003, 6).

2.2.2 Siirtäjät

Palsamin kuoliolaikkuvirusta levittävät luonnossa ripsiäiset, jotka ovat sukkulamaisia, aikuisena 1–2 mm:n pituisia hyönteisiä. Kasvi toimii yleensä niiden elinympäristönä, paitsi kotelovaiheessa, jolloin ne ovat kasvialustassa. Aikuisilla ripsiäisillä on siivet, jotka mahdollistavat lyhyiden matkojen lentämisen. Ne voivat kuitenkin kulkeutua pidemmälle ilmavirtojen mukana. Pistävien ja imevien suosien avulla ripsiäiset rikkovat kasvisolun ja imevät sen tyhjäksi. Tospovirusia siirtävät vain tietyt ripsiäislajit, joista kolmen lajin on todettu siirtävän INSV:tä. (Meinander & Pohto 2003, 11–12; EFSA 2012, 12–16.)

INSV:tä levittävät luonnossa pääasiassa Pohjois-Amerikasta lähtöisin olevat kalifornianripsiäiset (*Frankliniella occidentalis*), jotka kulkeutuivat Eurooppaan 1980-luvulla. Kyseisiä ripsiäisiä todettiin Suomessa ensimmäisen kerran vuonna 1987, minkä jälkeen kasvinterveysviranomaiset yrittivät estää niiden leviämisen. Lämpimässä viihtyvät kalifornianripsiäiset pääsivät kuitenkin leviämään Suomessa kasvihuoneisiin hävitystoinnista huolimatta. Ympärivuotisen kasvihuoneviljelyn yleistyminen on yksi kannan vah-

vistumisen syistä. (DeAngelis, Rossignol & Sether 1994, 197; Meinander & Pohto 2003, 13.)

Kalifornianripsiäisen lisäksi *Frankliniella fusca* ja yleinenripsiäinen, *Frankliniella intosa* levittävät palsamin kuoliolaikkuvirusta (EFSA 2012, 12). Yhdysvaltojen itäisistä osista lähtöisin oleva *F. intosa* on nimensä mukaan yleinen tuholainen erityisesti luonnonvaraisesti kukkivissa kukissa, mutta sitä esiintyy myös vihanneksissa ja koristekasveissa. Satunnaisesti kyseinen ripsiäinen tunkeutuu myös kasvihuoneisiin ja suosii erityisesti kukkia, joissa on runsaasti siitepölyä. Lajin tuholaisstatus eri maiden kasvinterveyslainsäädännössä vaihtelee, sillä *F. intosa* aiheuttaa toisinaan ongelmia kasvissa, mutta on usein pelkkä harmiton vierailija. (Meinander & Pohto 2003, 13; Vänninen 2014, 7.)

2.2.3 Isäntäkasvit

Palsamin kuoliolaikkuviruksella on lukuisia isäntäkasveja, mikä tekee siitä merkittävän kasvintuhoajan. Verrattuna tomaatin pronssilaikkuvirukseen INSV:llä on kuitenkin rajoittuneempi isäntäkasvivalikoima. Tautia esiintyy yli 300 kasvilajissa, kun taas TSWV:llä isäntäkasvilajeja on jopa yli 1300. Nimensä mukaisesti palsamin kuoliolaikkuvirusta esiintyy palsamien suvussa, mutta sitä on todettu myös esimerkiksi begonioidissa, daalioissa, morsiustähdissä, tuliköynnöksissä, ukonhatuissa ja vuokoissa. Koristekasvien lisäksi virus aiheuttaa tuhoa vihanneksissa, kuten kurkuissa, tomaateissa, paprikoissa ja salaateissa. (EFSA 2012, 19; EPPO 2014, 1.)

2.2.4 Taudin oireet ja vahingollisuus

INSV:n aiheuttamien oireiden kirjo on laaja. Oireiden vakavuus riippuu muun muassa isäntäkasvista, kasvin iästä ja ympäristötekijöistä, kuten lämpötilasta ja vuodenajasta. (German, Moyer & Ullman 1992, 316–317; EFSA 2012, 19.) Jotkin isäntäkasvit saavat voimakkaita oireita, kun taas toisilla kasvilajeilla saattaa esiintyä vain lievää kirjavuutta lehdissä. Oireiden voimakkuus ei ole yhteydessä kasvisolukon viruspitoisuuteen, vaan kuvastaa enemmänkin kasvin herkkyyttä virukselle. Oireettoman isäntäkasvin viruspi-

toisuus saattaa olla erittäin korkea, vaikka INSV:lle tyypillisiä oireita ei havaittaisi silmämääräisesti. (Meinander & Pohto 2003, 13–14.)

Viruksen aiheuttamia oireita ovat muun muassa kasvun hidastuminen, rengasmaisten ja selkeärajaisten kuvioiden muodostuminen lehtiin sekä kitukasvuisuus. INSV aiheuttaa yleensä myös kellertäviä, punertavia tai ruskeita laikkuja, jotka ovat muodoltaan juovamaisia, pyöreitä, mosaiikkimaisia tai rengasmaisia. Virus saattaa aiheuttaa myös lehtisuonien kellastumista ja tummien kuoliolaikkujen muodostumista versoihin. (Lemmetty, Laamanen, Soukainen & Tegel 2010, 33; Evira 2011.) Kuvassa 1 nähdään INSV-positiivinen sineraria, jossa esiintyy kellertäviä laikkuja, ja kuvassa 2 talvikaktus, johon palsamin kuoliolaikkuvirus on aiheuttanut rengasmaisia laikkuja.



KUVA 1. Sinerarian lehtiin on muodostunut INSV:n aiheuttamia kellertäviä laikkuja.



KUVA 2. Palsamin kuoliolaikkuvirus on aiheuttanut kellertäviä, rengasmaisia laikkuja talvikaktuksen lehtiin (Kuva: Jukka Tegel 2014).

2.2.5 Torjunta

Palsamin kuoliolaikkuvirusta ei voi torjua kemiallisesti, vaan torjunta perustuu ennaltaehkäisyyn sekä taudin toteamisen jälkeen siirtäjien ja taudinaiheuttajan hävittämiseen. INSV:n ennaltaehkäisyyn kuuluvat muun muassa ripsiäisten tarkkailu ja torjunta, lisäsmateriaalin terveyden varmistaminen sekä rikkakasvitorjunta. Lisäksi tuontitaimet suositellaan eristettäviksi ennen varsinaisiin viljelyhuoneisiin viemistä. (Meinander & Pohto 2003, 31.)

Kasvinterveysviranomaiset tarkastavat otantana viljelmille tulevia ja markkinoitavia kasveja taudin oireiden ja ripsiäisten havaitsemiseksi. Kasvintuhoajan esiintymistä on mahdollista tarkkailla myös viljelykasvien joukkoon sijoitettujen indikaattorikasvien avulla. Indikaattorikasvit ovat kasvilajeja tai -lajikkeita, joihin virus aiheuttaa helposti havaittavia oireita lyhyessä ajassa sen jälkeen, kun ripsiäinen on siirtänyt viruksen kasviin. INSV:lle sopiva indikaattorikasvi on esimerkiksi *N. benthamiana* -tupakkalaji. Tartuntalähteenä voivat olla tartunnan saaneen taimierän lisäksi rikkakasvit. Kaikki kasvit, joihin virus on todennäköisesti levinnyt, tulee hävittää niin, ettei leviämisaavaa enää ole. (Meinander & Pohto 2003, 31.)

Ripsiäisiä torjutaan mekaanisesti, kemiallisesti ja biologisesti sekä niiden esiintymistä tarkkaillaan liima-ansojen avulla. Mikäli kyseisiä tuholaisia on runsaasti, havaitaan niiden läsnäolo kasveihin jääneistä jäljistä: imennästä aiheutuvat laikut ja hopeakiilto lehdistä sekä mustat pisteet imentäalueella ovat merkkejä ripsiäisten esiintymisestä. Kasvihuoneen desinfiointi ja kylmillään pitäminen voivat vähentää ripsiäispopulaation määrää, mutta osa populaatiosta voi kuitenkin talvehtia. Ympärivuotinen kasvihuonetuotanto vaikeuttaa tuholaisten hävittämistä ja kasvihuoneen puhdistusta. (Meinander & Pohto 2003, 31–32.) Biologinen torjunta soveltuu parhaiten ennakkotorjuntaan, koska se on harvoin tarpeeksi tehokas torjumaan virusta levittäviä ripsiäisiä (Hulshof, Jaaksi, Linnamäki & Vänninen 2001, 13).

2.3 ELISA-menetelmä

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on immunologinen menetelmä, joka perustuu kiinteällä alustalla tapahtuviin antigeenien ja vasta-aineiden vuorovaikutuksiin. Määritettävä antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen, joka tunnistaa sen spesifisesti. (Burmester & Pezzutto 2003, 82–83; Dimmock, Easton & Leppard 2007, 26–27.) Vasta-aineksi kutsutaan proteiinia, joka reagoi spesifisesti oman kohdemolekyyliinsä, anti-geeninsa, kanssa (Crowther 2009, 10).

ELISA-menetelmää voidaan käyttää vasta-aineiden, proteiinien, peptidien ja hormonien määrittämiseen biologisista näytteistä (Thermo Scientific 2014). Kiinteä pinta, kuten kuoppalevy, käsitellään antigeenilla tai vasta-aineella, johon myöhemmin lisättävä spesifinen antigeeni tai vasta-aine sitoutuu. Substraatin lisäyksen jälkeen vasta-aineessa kemiallisilla sidoksilla kiinni oleva entsyymi katalysoi värireaktion. (Burmester & Pezzutto 2003, 82–83; Gillespie 1994, 257.) Reaktion lopputuotteena muodostuneen värin intensiteetti mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella (Crowther 2009, 14).

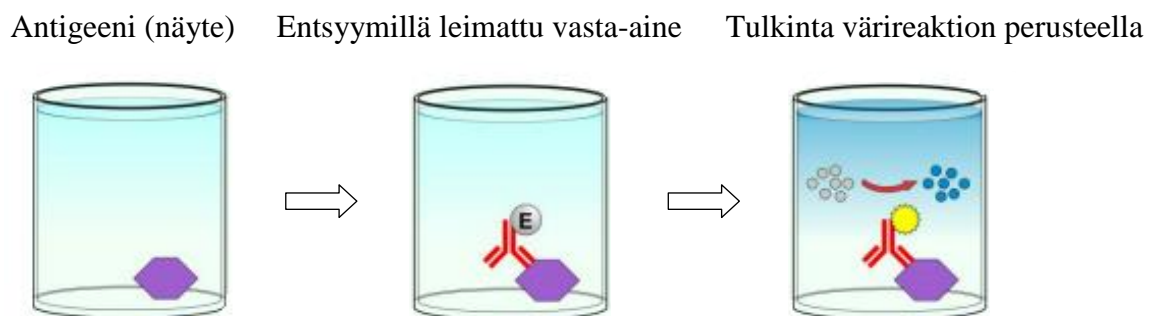
Menetelmän suosio perustuu sen helppouteen, tarkkuuteen ja alhaisiin kustannuksiin. Lisäksi se mahdollistaa usean näytteen samanaikaisen määrittämisen nopeasti, eikä testin suorittamiseen vaadita erikoisvälineistöä. (Adelberg, Jawetz & Melnick 1982, 169; Kem-En-Tec Diagnostics 2013, 2.) ELISA voidaan jakaa kolmeen ryhmään: suoraan ja epäsuoraan menetelmään sekä sandwich-ELISA:an. Kyseiset menetelmät voidaan suorittaa kilpailevana tai inhiboivana. (Crowther 2009, 10.)

2.3.1 Suora ja epäsuora menetelmä

Suora menetelmä on ELISA-menetelmistä yksinkertaisin. Antigeeni laimennetaan korkean pH:n puskuriin, joka ei saa sisältää antigeenin sitoutumista häiritseviä proteiineja. Puskurina käytetään yleensä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS) tai karbonaatti- tai bikarbonaattipuskuria. Laimennettua näytettä pipetoidaan kuoppalevyn pohjalle, johon antigeenit sitoutuvat passiivisesti inkubaation aikana. (Crowther 2009, 12–13.)

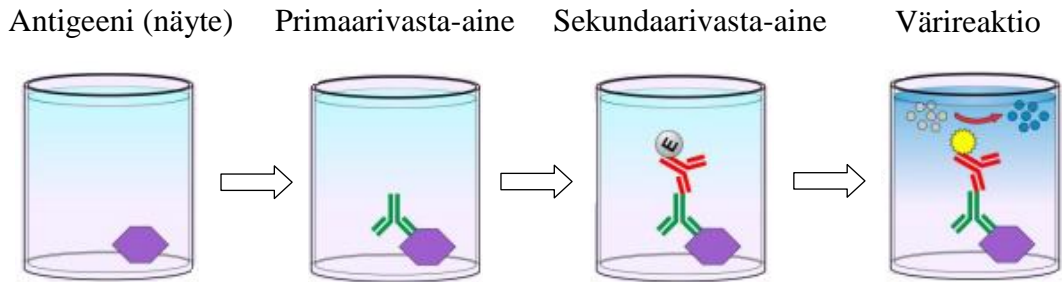
Inkubaation jälkeen sitoutumattomat yhdisteet pestään pois pesupuskurilla. Levylle lisätään entsyymillä leimattu vasta-aine, joka on määritettävälle antigeenille spesifinen. Vasta-aine laimennetaan blokkausyhdistettä sisältävällä puskuriliuoksella. Blokkausyhdisteet voivat olla proteiineja tai detergentejä, jotka estävät epäspesifistä sitoutumista sallien kuitenkin vasta-aineen spesifisen sitoutumisen antigeeniinsa. Inkubaation aikana vasta-aineet sitoutuvat antigeeneihin. (Crowther 2009, 13–14.)

Sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois ja levylle lisätään substraatti. Substraatti kiinnittyy vasta-aineessa olevaan entsyymiin, joka katalysoi värireaktion. Entsyymi toimii leimana, jonka avulla antigeenin tai vasta-aineen määrä mitataan. Värireaktion annetaan jatkua määritetyn ajan, minkä jälkeen värin voimakkuus mitataan. Vaihtoehtoisesti reaktio voidaan pysäyttää ennen mittausta muuttamalla pH:ta tai käyttämällä sopivaa reagenssia, joka inhiboi reaktiota. Muodostuneen värin intensiteetti mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella. (Burmester & Pezzutto 2003, 82–83; Crowther 2009, 14.) Kuviossa 2 on esitetty suoran ELISA -menetelmän periaate.



KUVIO 2. Suoran ELISA -menetelmän periaate (Kem-En-Tec Diagnostics 2013, muokattu).

Kuviossa 3 on esitetty epäsuoran ELISA -menetelmän periaate, jossa antigeenin sitoutuminen tapahtuu samalla periaatteella kuin suorassa menetelmässä. Sitoutumisen jälkeen levylle lisätään primaarivasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin inkubaation aikana. Ylimääräinen vasta-aine pestään pois, ja levylle lisätään primaarivasta-aineen tunnistava sekundaarivasta-aine. Vasta-aineet sitoutuvat toisiinsa inkubaation aikana. Sitoutumaton sekundaarivasta-aine pestään pois, ja määrittystä jatketaan substraatin lisäyksellä, kuten suorassa menetelmässä. (Crowther 2009, 14–16.)

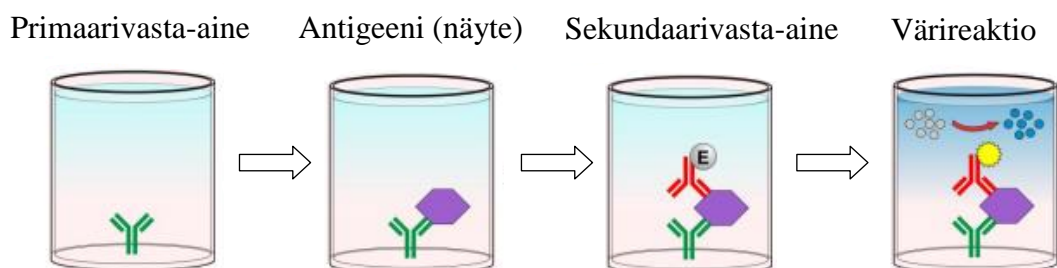


KUVIO 3. Epäsuoran ELISA -menetelmän periaate (Kem-En-Tec Diagnostics 2013, muokattu).

2.3.2 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISA voidaan jakaa suoraan ja epäsuoraan sandwich-ELISA:an. Suorassa sandwich-ELISA:ssa levyille lisättävä primaarivasta-aine kiinnittyy kuopan pohjaan inkubaation aikana, minkä jälkeen sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois. Levyille voidaan lisätä blokkauksuskuria, joka estää epäspesifiset sitoutumiset. Blokkauksen jälkeen toistetaan pesu. (Crowther 2009, 16–17.)

Määritettävät näytteet laimennetaan blokkauksuskuriin. Antigeenit sitoutuvat primaarivasta-aineeseen, ja inkubaation sekä pesun jälkeen levyille lisätään antigeenin tunnistava sekundaarivasta-aine. Substraatin lisäys aiheuttaa värireaktion, joka voidaan pysäyttää pH:ta muuttamalla tai sopivalla reaktiota inhiboivalla reagenssilla. Väriin intensiteetti mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella. (Crowther 2009, 17–18.) Kuviossa 4 on esitetty suoran sandwich-ELISA -menetelmän periaate.



KUVIO 4. Suoran sandwich-ELISA -menetelmän periaate (Kem-En-Tec Diagnostics 2013, muokattu).

Epäsuorassa sandwich-ELISA:ssa sekundaarivasta-aine ei ole entsyymillä leimattu, vaan sen kiinnittyä antigeneihin levyille lisätään kolmas vasta-aine. Kolmas, detektion mahdollistava vasta-aine kiinnittyy sekundaarivasta-aineeseen. Inkubaation ja pesun jälkeen levyille lisätään substraatti, minkä jälkeen värillisen reaktiotuotteen intensiteetti mitataan spektrofotometrisesti. (Crowther 2009, 17–21.)

2.3.3 Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät

Kilpailevat ja inhiboivat ELISA -menetelmät pohjautuvat aineiden kykyyn kilpailla samasta sitoutumispaikasta tai sitoutumisen häirinnästä. Menetelmän avulla voidaan mitata määritettävän analyytin, vasta-aineen tai antigenin määrää. Kilpailevien ja inhiboivien menetelmien perustana voidaan käyttää joko suoraa, epäsuoraa tai sandwich-ELISA -menetelmää. (Crowther 2009, 21.)

Tuntemattoman analyytin pitoisuus saadaan määritettyä lisäämällä tunnettu määrä häiritsevää tai kilpailevaa komponenttia. Menetelmissä määritettävä analyytti on leimaamaton, kun taas kilpaileva vasta-aine tai antigeeni on leimattu. Leimaamattoman analyytin sitoutuminen vasta-aineeseen estää leimatun vasta-aineen sitoutumista, koska spesifinen sitoutumiskohta vasta-aineessa on jo varattu. Näytteessä on paljon tutkittavaa antigeenia, mikäli leiman määrä on vähäinen. Antigeenin määrä näytteessä on kääntäen verrannollinen mitatun leiman määrään. (Goldsby, Kindt, Kuby & Osborne 2003, 148–150; Crowther 2009, 21–42.)

2.4 Menetelmien vertailu

Menetelmien vertailu kuuluu validointiprosessiin. Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jolla osoitetaan laitteen tai menetelmän sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Se on tarpeen muun muassa kahden eri mittausmenetelmän antamien tulosten yhtäpitävyyden osoittamisessa tai uuden menetelmän kehittämisessä tiettyyn tarkoitukseen. Mittausmenetelmän suorituskykyä voidaan määrittää erilaisten parametrien avulla, jolloin tarkastellaan esimerkiksi selektiivisyyttä ja spesifisyyttä, lineaarisuutta ja mittausaluetta, poikkeamaa, tarkkuutta, toteamis- ja määrittämissrajaa sekä toistettavuutta ja uusittavuutta. (Ehder 2005, 26–37.)

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää tarkasti määritettävää analyyyttia, kun näytematriisissa esiintyy muita komponentteja. Vastaavasti spesifisyys kuvastaa kykyä mitata vain tarkoitettua analyyyttia. Harvat menetelmät ovat täysin spesifisiä, jolloin ne ovat täysin selektiivisiä analysoitavalle aineelle tai aineryhmälle. (Ehder 2005, 27–28.)

Lineaarisuutta tarkastellessa tutkitaan menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella lineaarinen korrelaatio tulosten ja näytteiden tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Mittausalue on mittaussuureen arvojen joukko, jolla mittauslaitteen virheen tulisi pysyä spesifioituissa rajoissa. Tarkkuus kuvastaa mitatun arvon ja todellisen arvon välistä yhteensopivuutta. Mittauslaitteen tarkkuus on mittauslaitteen kykyä antaa vasteita, jotka ovat lähellä tosiarvoa. (Ehder 2005, 28–36; Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

Mittaustuloksen toistettavuudella tarkoitetaan saman mitattavan suureen peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaukset suoritetaan samoissa mittausolosuhteissa (Ehder 2005, 36). Se kuvastaa täsmällisyyttä, joka saavutetaan, kun määrittäminen tehdään toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä, samaa menetelmää ja laitteistoa käyttäen sekä saman tekijän toimesta (Jaarinen & Niiranen 2005, 12).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena on saada nykyisin Eviran Kasvintuhoojajaostossa käytössä olevan kaupallisen ELISA-kitin rinnalle toinen, palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämiseen sopiva kaupallinen testikitti. Kittiä voitaisiin käyttää epäselvien tai heikkojen positiivisten tulosten varmistamisessa. Opinnäytetyössä saatuja tuloksia tullaan hyödyntämään jaostossa rutiinidiagnostiikassa.

Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla kaupallisia ELISA-testejä palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämisessä. Työssä tutkittiin neljää erilaista testikittiä, joiden valmistajat olivat Loewe, Agdia, DSMZ ja PRI. Kasvintuhoojajaostossa on nykyisin käytössä Loewen ELISA-testi, ja muista vertailuissa olleista testeistä valittiin yksi varmistuskäyttöön.

4 TYÖN SUORITUS

4.1 Kasvimateriaali

Testikasveina käytettiin kasvatushuoneessa terveistä siemenistä kasvatettuja tupakkalajeja ja itulehtiä. Negatiiviset kasvikkontrollit valmistettiin *Nicotiana benthamiana* -tupakkalajista ja positiiviset kontrollit *Kalanchoë daigremontiana* -itulehtilajista, johon oli siirrostettu palsamin kuoliolaikkuvirus. Näytteinä käytettiin sekä kasvatushuoneen kasveja että asiakkaiden näytteitä, jotka olivat pääasiassa eri koristekasvilajeja, kuten begoniaa ja sinerariaa. Lisäksi tutkittiin kaupallisia INSV-positiivisia ja -negatiivisia kontrollinäytteitä. Taulukossa 2 on esitetty tutkimuksessa käytetyt kasvisuvut ja -lajit.

TAULUKKO 2. Tutkimuksessa käytettyjen kasvien suvut ja lajit.

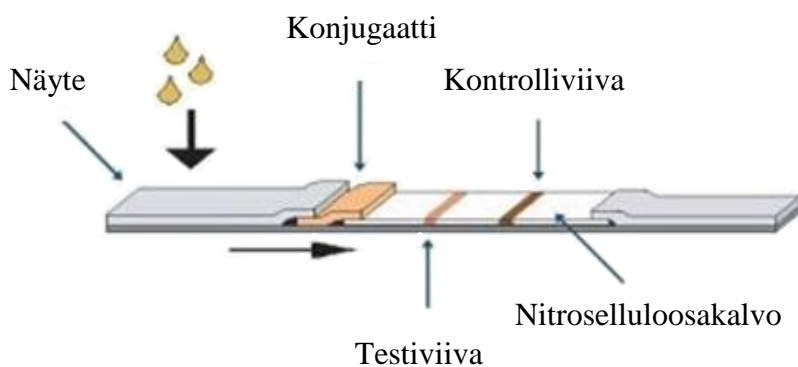
Kasvisuku	Kasvilaji, -lajit
Begoniat (<i>Begonia</i>)	<i>Begonia spp.</i>
Esikot (<i>Primula</i>)	<i>Primula sp.</i>
Itulehdet (<i>Kalanchoë</i>)	<i>K. daigremontiana, K. blossfeldiana</i>
Koisot (<i>Solanum</i>)	<i>S. lycopersicum</i>
Krysanteemit (<i>Chrysanthemum</i>)	<i>Chrysanthemum sp.</i>
Kurkut (<i>Cucumis</i>)	<i>Cucumis sativus</i>
Lobeliat (<i>Lobelia</i>)	<i>Lobelia sp.</i>
Marketat (<i>Argyranthemum</i>)	<i>Argyranthemum sp.</i>
Palsamit (<i>Impatiens</i>)	<i>I. hawkeri</i>
Pelargonit (<i>Pelargonium</i>)	<i>Pelargonium sp.</i>
Petunia (<i>Petunia</i>)	<i>Petunia sp.</i>
Sineraria (<i>Cineraria</i>)	<i>Cineraria sp.</i>
Tupakat (<i>Nicotiana</i>)	<i>N. benthamiana, N. rustica</i>
Tähtisilmä (<i>Osteospermum</i>)	<i>Osteospermum sp.</i>

4.2 Kasvinäytteiden esikäsittely

Kasvinäytteestä valittiin lehden kohtia, joissa esiintyi palsamin kuoliolaikkuvirukselle tyypillisiä oireita, kuten kellertäviä renkaita sekä nekroottisia raitoja ja läiskiä. Näytettä punnittiin 0,5 g Bioreban valmistamaan jauhatuspussiin. Näytteen homogenisointi tehtiin kuulajauhimmella (Bioreba Homex 6). Homogenisoinnin jälkeen jauhatuspussiin lisättiin 5 ml näytepuskuria. Puskuri voitiin lisätä myös ennen homogenisointia. Näytteet oli mahdollista säilyttää myöhempää käyttöä varten jakamalla ne eppendorf-putkiin ja laittamalla -80 °C:een syväjäähän.

4.3 Bioreban INSV AgriStrip -pikatesti

INSV Agristrip -testi on Bioreban valmistama yksivaiheinen pikatesti palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämiseksi. Testi perustuu lateraaliseen virtausimmunokromatografiaan (kuvio 5). Testiliuskojen toiminta pohjautuu kapillaari-ilmiöön. Näyte kulkeutuu testiliuskaa pitkin ylöspäin, jolloin näytteen ollessa positiivinen testiliuskaan muodostuu kontrolliviiva sekä testiviiva. Negatiivinen näyte muodostaa liuskaan ainoastaan kontrolliviivan. Testikitti sisältää näytepuskurin (Agristrip extraction buffer, 500 ml) ja 100 kpl testiliuskoja (INSV, lot. 221031). Testikittiä myy sveitsiläinen yritys, Bioreba, joka valmistaa lisäksi ELISA-testiin tarkoitettuja reagensseja, puskureita, kemikaaleja ja kontrolleja sekä laboratoriolaitteita. (Bioreba 2014a; Bioreba 2014b.)



KUVIO 5. Lateraaliseen virtausimmunokromatografiaan perustuva pikatestiliuska (Creative Diagnostics 2014, muokattu).

Näytteet testattiin ennen ELISA-testin suorittamista pikatestillä. Pikatesti ei ole riittävän luotettava käytettäväksi yksinomaisena testinä, mutta sen avulla voitiin varmistaa, että näytteet ELISA-testeihin otettiin oikeista, viroottisista kasvinosista. Oireellista kasvimateriaalia punnittiin 0,1 g jauhuspussiin, jonne lisättiin 3 ml näytepuskuria kertakäyttöpipetillä. Näyte homogenisoitiin kuulajauhimmella, minkä jälkeen muoviseen kyvettiin pipetoitiin 2 pisaraa näytettä (noin 75 µl) ja 2 pisaraa näytepuskuria. Testiliuska asetettiin kyvettiin pyöräyttämällä näytelaimennosta. Tulokset oli luettavissa 10 minuutin kuluessa. INSV-positiivinen kasvinäyte aiheutti testiliuskaan kaksi punaista viivaa ja negatiivinen yhden viivan.

4.4 Loewen ELISA-testi

Loewe valmistaa suoraan sandwich-ELISA -menetelmään perustuvaa testikittiä (Impatiens necrotic spot virus set / 500, Cat. No. 07505S/500) palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämiseksi kasvinäytteistä. Loewe on saksalainen yritys, joka kehittää ja tuottaa diagnostisia reagensseja kasvipatogeenien määrittämiseksi. (Loewe 2012.) Testikitti sisältää kiinnittävän vasta-aineen, niin sanotun primaarivasta-aineen (anti-INSV-IgG), tunnistavan vasta-ainekonjugaatin eli sekundaarivasta-aineen (anti-INSV-AP-conjugate) ja positiivisia kontrollinäytteitä. Kittiin sisältyviä positiivisia kontrolleja ei käytetty, vaan kontrollit valmistettiin kasvatushuoneen INSV-positiivisista kasveista. Testeissä käytettyjen puskuriliuosten valmistusohjeet on esitetty liitteessä 1.

Määrittämissä käytettiin 96-kuoppalevyjä (Thermo Fisher Scientific Microtiter Assembly breakable strip 1x8, Cat. No 65029390). Kuoppalevyn kaivot päällystettiin primaarivasta-aineella, joka laimennettiin suhteessa 1:200 kiinnityspuskuriin. Tarvittavan laimennoksen määrä laskettiin siten, että nollanäytettä varten tarvittiin neljä kaivoa, positiivista viruskontrollia varten neljä kaivoa, negatiivista viruskontrollia varten kahdeksan kaivoa ja jokaista näytettä varten kaksi kaivoa. Laimennettua vasta-ainetta pipetoitiin 200 µl/kaivo. Levyä inkuboitiin inkubaattorissa (Labsystems iEMS Incubator/Shaker) +37 °C:ssa neljän tunnin ajan.

Inkubaation jälkeen levy pestiin kuoppalevyille tarkoitetulla pesulaitteella (Thermo Fisher Scientific Wellwash AC), joka on esitetty kuvassa 4. Pesut suoritettiin kahdella ohjelmalla, joista ensimmäisessä kaivot tyhjennettiin ja täytettiin kaksi kertaa pesu-

kurilla (PBS + 0,05 % Tween 20). Puskuria ei seisotettu, vaan kaivot tyhjennettiin heti täytön jälkeen. Toisessa pesussa kaivot pestiin kaksi kertaa puskurilla, jonka annettiin vaikuttaa täyttöjen jälkeen viiden minuutin ajan. Lopuksi levyn kaivot tyhjennettiin ja niiden annettiin kuivua kahden minuutin ajan.



KUVA 4. ELISA-levyjen kuopat pestiin automaattisella pesurilla, joka tyhjentämisen jälkeen täytti kuopat pesupuskurilla.

Pesujen jälkeen kaivoihin lisättiin nollanäytteet, positiiviset ja negatiiviset kasvikkontrollit sekä varsinaiset näytteet. Taulukossa 3 on esitetty pipetointikaavio, jossa kuoppalevyn kaivot on kuvattu ruuduilla. Levyn reunoissa olevien merkintöjen A–H ja 1–12 avulla levy pysyy työskennellessä aina samoin päin. Merkinnät helpottavat myös näytteiden ja kontrollien pipetointia oikeisiin kuoppiin.

TAULUKKO 3. 96-kuoppalevyn pipetointikaavio, josta nähdään, mihin kuoppaan nollanäytteet, positiiviset ja negatiiviset kasvikkontrollit sekä näytteet pipetoidaan.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	-	N ₁	N ₅								
B	P	-	N ₁	N ₅								
C	P	-	N ₂									
D	P	-	N ₂									
E	+	-	N ₃									
F	+	-	N ₃									
G	+	-	N ₄									
H	+	-	N ₄									

Nollanäytteenä käytettiin näytekongugaattipuskuria, joka on merkitty kirjaimella P taulukkoon 3. Positiiviset kontrollit (+) pipetoitiin ensimmäisen rivin neljään viimeiseen kaivoon ja negatiiviset kontrollit (-) toisen rivin kahdeksaan kaivoon. Näytteet lisättiin kolmannesta pystyrivistä alkaen peräkkäisiin kaivoihin (N₁, N₂, N₃..). Jokaista näytettä ja kontrollia pipetoitiin 200 µl/kaivo. Levy suojattiin kuivumiselta peittämällä se parafilmillä ja foliolla. Levy laitettiin yöksi jääkaappiin +4 °C:seen.

Seuraavana päivänä kaivot pestiin, kuten edellä on kuvattu. Sekundaarivasta-aine laimennettiin suhteessa 1:200 näytekongugaattipuskuriin, joka sisälsi 2 %:a ELISA-kittiin sisältyvää maitojauhetta. Vasta-ainetta pipetoitiin 200 µl/kaivo, minkä jälkeen levyä inkuboitiin inkubaattorissa +37 °C:ssa neljän tunnin ajan. Inkubaation jälkeen levyn kaivot pestiin kuten edellä. Kaivojen annettiin kuivua kahden minuutin ajan.

Substraattiliuos valmistettiin juuri ennen käyttöä lisäämällä fosfataasisubstraatti-tabletteja (Sigma, phosphatase substrate) substraattipuskuriin. Tablettimuodossa oleva fosfataasisubstraatti säilytetään pakastimessa -20 °C:ssa. Tabletit liuotettiin huolellisesti suhteessa 1 kpl/5 ml kylmää substraattipuskuria, jolloin pitoisuudeksi saatiin noin 1 mg/ml. Liuosta pipetoitiin 200 µl/kaivo, minkä jälkeen levy peitettiin suojakalvolla.

Levy asetettiin ELISA-lukulaitteeseen (Thermo Fisher Scientific Multiscan EX), johon oli valmiiksi ohjelmoitu kaupallinen absorbanssin mittausohjelma (Ascent Software) Kasvintuhoojalaboratoriossa vuonna 2010. Mittauksessa käytettiin 405 nm suodatinta. Kontrollien ja näytteiden absorbanssit mitattiin manuaalisesti määrääjain 0-15-30-60-

120 minuutin välein. Ohjelmaan oli sijoitettu tulkintaparametrit, jonka perusteella näyte todettiin joko INSV-positiiviseksi tai -negatiiviseksi. Tartunnan voimakkuus luokiteltiin raja-arvojen perusteella (taulukko 4). Laboratorion rutiinitesteissä positiivisen ja negatiivisen näytteen raja-arvona oli absorbanssiarvo 0,100. Positiiviset tulokset havaittiin silmämääräisesti kaivoissa olevan substraattiliuoksen muuttuessa keltaiseksi. Mikäli tulos oli negatiivinen, substraattiliuos jäi värittömäksi.

TAULUKKO 4. Tartunnan voimakkuuksien luokittelu raja-arvojen perusteella.

Absorbanssiarvo	Tartunnan voimakkuus
< 0,100	-
0,100 – 0,500	+
0,500 – 1,000	++
>1,000	+++

4.5 Agdian ELISA-testi

Agdia on yhdysvaltalainen yritys, joka kehittää testejä kasvipatogeenien määrittämiseksi. Yritys tuottaa palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämiseksi suoraan sandwich-ELISA:an perustuvaa testikittiä (ELISA: reagent set, Impatiens necrotic spot virus, Cat. No. SRA 20500), joka sisältää primaarivasta-aineen (capture antibody anti-INSV) ja sekundaarivasta-aineen (alkaline phosphatase enzyme conjugate anti-INSV). (Agdia 2008.)

Kuoppalevyn kaivot käsiteltiin primaarivasta-aineella, joka laimennettiin kiinnityspuskuriin suhteessa 1:200. Laimennettua vasta-ainetta pipetoitiin 100 µl/kaivo. Levyä inkuboitiin neljän tunnin ajan huoneenlämmössä kosteassa inkubaatiolaatikossa, joka oli vuorattu märillä käsipapereilla vasta-aineen haihtumisen estämiseksi. Inkubaation jälkeen levyn kaivot pestiin pesulaitteella. Kaivot tyhjennettiin ja täytettiin kaksi kertaa pesupuskurilla (PBS + 0,05 % Tween 20). Puskuria ei seisotettu, vaan kaivot tyhjennettiin heti täyttöjen jälkeen. Lopuksi niiden annettiin kuivua kahden minuutin ajan.

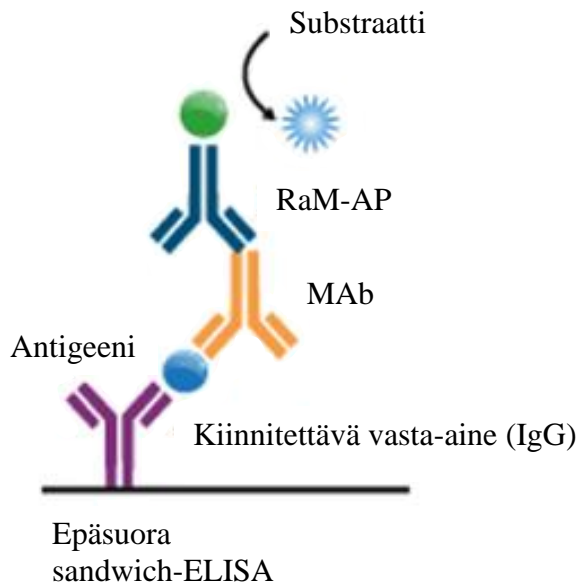
Nollanäytettä, positiivista ja negatiivista kontrollia sekä varsinaisia näytteitä pipetoitiin 100 µl/kaivo. Nollanäyte oli näytekuri (General Extract Buffer, GEB), jota käytettiin myös näytteiden laimentamiseen. Levy peitettiin huolellisesti parafilmillä ja laitettiin

tiin kosteaan inkubaatiolaatikkoon. Levyä inkuboitiin yön yli jääkaapissa +4 °C:ssa. Seuraavana päivänä levyn kaivot tyhjennettiin ja huuhdottiin seitsemän kertaa pesupuskurilla. Pesun jälkeen kaivot tyhjennettiin ja niiden annettiin kuivua kahden minuutin ajan. Primaarivasta-aine laimennettiin näytekonzugaattipuskuriin suhteessa 1:200. Liuosta pipetoitiin 100 µl/kaivo, minkä jälkeen levyä inkuboitiin huoneenlämmössä kosteassa inkubaatiolaatikossa kahden tunnin ajan. Inkubaation jälkeen levyn kaivot pestiin kuten edellä.

Substraattiliuos valmistettiin tablettimuodossa olevasta fosfataasisubstraatista. Tabletit liuotettiin kylmään substraattipuskuriin siten, että pitoisuudeksi saatiin 1 mg/ml. Liuosta pipetoitiin 100 µl/kaivo, minkä jälkeen levy peitettiin suojakalvolla. Näytteiden ja kontrollinäytteiden absorbanssit mitattiin manuaalisesti ELISA-lukulaitteella 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin jälkeen substraatin lisäyksestä. Näyte todettiin positiiviseksi, mikäli mitattu absorbanssiarvo oli yli 0,100.

4.6 DSMZ:n ELISA-testi

Saksalainen yritys, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), tuottaa epäsuoraan sandwich-ELISA:an perustuvaa testikittiä, jonka avulla palsamin kuoliolaikkuvirus voidaan määrittää kasvinäytteestä (DSMZ 2014). Testikitti sisältää kiinnittävän vasta-aineen (IgG), monoklonaalisen vasta-aineen (MAb) ja RaM-AP-konjugaatin sekä INSV-positiivisia kasvimateriaaleja. Kuviossa 6 on esitetty epäsuorassa sandwich-ELISA:ssa muodostuva kompleksi.



KUVIO 6. Epäsuorassa sandwich-ELISA -menetelmässä muodostuva kompleksi (Bio-cer 2014, muokattu).

Liitteessä 2 on esitetty DSMZ:n ELISA-testin työohjeet. Kuoppalevyn kaivot päällystettiin kiinnittävällä IgG-vasta-aineella, joka laimennettiin kiinnityspuskuriin suhteessa 1:1000. Laimennettua vasta-ainetta pipetoitiin 200 µl/kaivo. Levyä inkuboitiin inkubaattorissa +37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Inkubaation jälkeen kaivot pestiin pesulaitteella. Kaivot tyhjennettiin ja täytettiin neljä kertaa pesupuskurilla (PBS + 0,05 % Tween 20), jonka annettiin vaikuttaa täyttöjen jälkeen kahden minuutin ajan. Lopuksi kaivot tyhjennettiin, ja niiden annettiin kuivua kahden minuutin ajan.

Kaivojen blokkauksessa eli epäspesifisten sitoutumispaikkojen täyttämiseksi kaivoihin lisättiin 200 µl 2 %:sta maitojauhe-pesupuskuria. Levy laitettiin inkuboitumaan +37 °C:seen 30 minuutin ajaksi, minkä jälkeen levy pestiin, kuten edellä. Kun kaivot olivat kuivuneet, näytteet ja kontrollinäytteet lisättiin levyille. Kuoppalevy peitettiin parafilmillä ja foliolla näytteiden haihtumisen estämiseksi. Levyä inkuboitiin yön yli jääkaapissa +4 °C:ssa.

Seuraavana päivänä levyn kaivot pestiin kuten edellä. MAb-vasta-aine laimennettiin näytekongaattipuskuriin suhteessa 1:1000. Laimennettua MAb-vasta-ainetta pipetoitiin 200 µl/kaivo, minkä jälkeen levy laitettiin inkuboitumaan +37 °C:seen kahden tunnin ajaksi. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin ja niihin lisättiin RaM-AP-vasta-aine, jota

oli laimennettu näytekonjugaattipuskuriin suhteessa 1:1000. Levyä inkuboitiin inkubaattorissa +37 °C:ssa kahden tunnin ajan.

Inkubaation ja pesun jälkeen levyille lisättiin substraattiliuos. Substraattiliuos valmistettiin tablettimuodossa olevasta fosfataasisubstraatista. Tabletit liuotettiin suhteessa 1 kpl/5 ml kylmään substraattipuskuriin, jolloin pitoisuudeksi saatiin 1 mg/ml. Liuosta pipetoitiin 200 µl/kaivo. Levy peitettiin suojakalvolla ja asetettiin ELISA-lukulaitteeseen. Kontrollien ja näytteiden absorbanssit mitattiin manuaalisesti 0-15-30-60-120 minuutin välein. Näyte todettiin positiiviseksi, mikäli absorbanssiarvo ylitti arvon 0,100.

4.7 PRI:n ELISA-testi

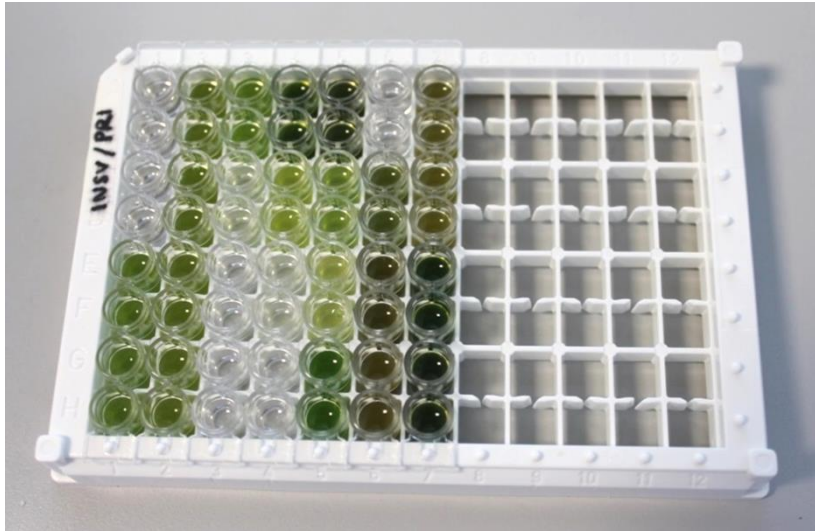
PRI (Plant Research International) on kehittänyt suoraan sandwich-ELISA:an perustuvan testikitin palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämiseksi. PRI on osa Wageningen yliopiston ja DLO-säätiön tutkimuslaitosta, Wageningen UR:ää. Testikittiä tuottaa ja jälleenmyy Prime Diagnostics. (Wageningen 2014.) Testikitti sisältää primaarivasta-aineen (INSV-CO-s) ja sekundaarivasta-aineen (INSV-AP-s-conjugate).

Loewen ja PRI:n ELISA-testissä käytettyjen puskuriliuosten ainemäärissä oli eroja. Puskurien erot olivat hyvin pieniä, joten testeissä päätettiin käyttää samoja liuoksia, koska erojen ei arveltu vaikuttavan lopulliseen testitulokseen. Jos testeissä olisi havaittu poikkeavia arvoja, ja niiden olisi päätelty johtuvan puskurien eroista, testit olisi uusittu kunkin valmistajan suosituksen mukaisella puskurilla.

Kuoppalevyn kaivot käsiteltiin primaarivasta-aineella, joka laimennettiin kiinnityspuskuriin suhteessa 1:1000. Laimennettua vasta-ainetta pipetoitiin 200 µl/kaivo. Levy peitettiin parafilmillä ja laitettiin kosteaan inkubaatiolaatikkoon. Levyä inkuboitiin jääkaapissa +4 °C:ssa yön yli.

Seuraavana päivänä levyn kaivot pestiin pesulaitteella. Kaivot tyhjennettiin ja täytettiin neljä kertaa pesupuskurilla (PBS + 0,05 % Tween 20). Kaivojen täytön jälkeen puskurin annettiin vaikuttaa 15 sekunnin ajan ennen tyhjennystä. Lopuksi kaivot tyhjennettiin ja niiden annettiin kuivua kahden minuutin ajan. Nollanäytteet, kontrollit ja varsinaiset

näytteet lisättiin levyille (kuva 5), joka peitettiin parafilmillä ja laitettiin kosteassa inkubaatiolaatikossa jääkaappiin +4 °C:seen. Inkubaatiota jatkettiin yön yli.



KUVA 5. PRI:n suoraan sandwich-ELISA -menetelmään perustuvan testin kuoppalevy kontrollien ja näytteiden lisäämisen jälkeen.

Testin kolmantena päivänä levyn kaivot pestiin kuten edellä on kuvattu. Lopuksi levyn kaivot tyhjennettiin ja niiden annettiin kuivua kahden minuutin ajan. Entsyymikonjugaattiliuos valmistettiin laimentamalla sekundaarivasta-aine näytekongugaattipuskuriin suhteessa 1:1000. Laimennettua vasta-ainetta pipetoitiin 200 µl/kaivo. Levy peitettiin parafilmillä ja laitettiin kosteaan inkubaatiolaatikkoon, jossa inkubaatiota jatkettiin yön yli +4 °C:ssa.

Testin viimeisenä päivänä inkubaation ja pesun jälkeen valmistettiin substraattiliuos fosfataasisubstraatista. Fosfataasisubstraatti-tabletit liuotettiin kylmään substraattipuskuriin siten, että pitoisuudeksi saatiin 0,75 mg/ml. Liuosta pipetoitiin 200 µl/kaivo, minkä jälkeen levyn kaivot peitettiin suojakalvolla. Näytteiden ja kontrollien absorbanssit mitattiin manuaalisesti ELISA-lukulaitteella 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin jälkeen substraatin lisäyksestä. Mikäli mitattu absorbanssi oli yli 0,100, näyte todettiin positiiviseksi.

4.8 Testien vertailu

Ennen vertailujen aloittamista ELISA-testikitit todettiin toimiviksi esikokeilla. Esikokeissa testattiin positiivisia ja negatiivisia kontrollinäytteitä. INSV-positiivisten näytteiden absorbanssiarvojen tuli ylittää arvo 0,100. Vastaavasti negatiivisten näytteiden arvojen tuli jäädä alle 0,100. Nollanäytteet eivät saaneet reagoida, ja mitattujen arvojen tuli jäädä alhaisiksi, lähelle arvoa 0,000.

ELISA-testien vertailuja suoritettiin samanaikaisesti siten, että näytteet saatiin lisättyä kuoppalevyille samana päivänä. Vertailuissa otettiin huomioon testin käytettävyys, nopeus ja kitin saatavuus. Käytettävyyttä tarkastellessa pohdittiin testin helppoutta ja yksinkertaisuutta sekä eri työvaiheita. Loewen ELISA-testissä käytettyjä puskuriliuoksia pyrittiin hyödyntämään myös valitussa testissä, koska esimerkiksi eri pesupuskurin käyttö hidastaisi testien tekemistä. Yksi tärkeistä kriteereistä oli myös testin suorittamiseen ja tulosten saamiseen kulunut aika sekä työmäärän suhde nopeuteen. Kittien saatavuutta tarkastellessa otettiin huomioon uuden kitin toimittamiseen kuluva aika ja mahdolliset kuljetusongelmat.

Tulosten tarkastelussa kiinnitettiin huomiota muun muassa testikittien toimivuuteen, luotettavuuteen, sensitiivisyyteen eli herkkyyteen sekä spesifisyyteen. Sensitiivisyyttä määritettiin laimennossarjojen avulla. Testeissä käytettiin INSV-positiivisina koekasveina sinerariaa, itulehteä ja tupakkaa. Ensimmäisessä vertailussa näytteiden laimennossuhteiksi valittiin 1:10, 1:50, 1:100 ja 1:500. Seuraaviin vertailuihin valmistettiin laimennokset, joiden suhteet olivat 1:10, 1:100, 1:1000 ja 1:5000, koska edelliset laimennokset eivät antaneet toivottuja, lineaarisia tuloksia.

Jotta tuloksia voitiin pitää luotettavina, jokaisessa mittauksessa käytettiin positiivista ja negatiivista kasvikkontrollia. Positiivisina kontrolleina käytettiin samaa pakastettua *Kalanchoë daigremontiana* -lajia ja negatiivisina kontrolleina *Nicotiana benthamiana* tai *Nicotiana glutinosa* -lajeja. Lisäksi tutkittiin terveiden testikasvilajien vaikutusta taustakohinaan. Yhdeksästä INSV-negatiivisesta koekasvista tehtiin määritykset, jotta saataisiin selville oliko eri kasvisukujen aiheuttamissa tausta-arvoissa eroa.

5 TULOKSET

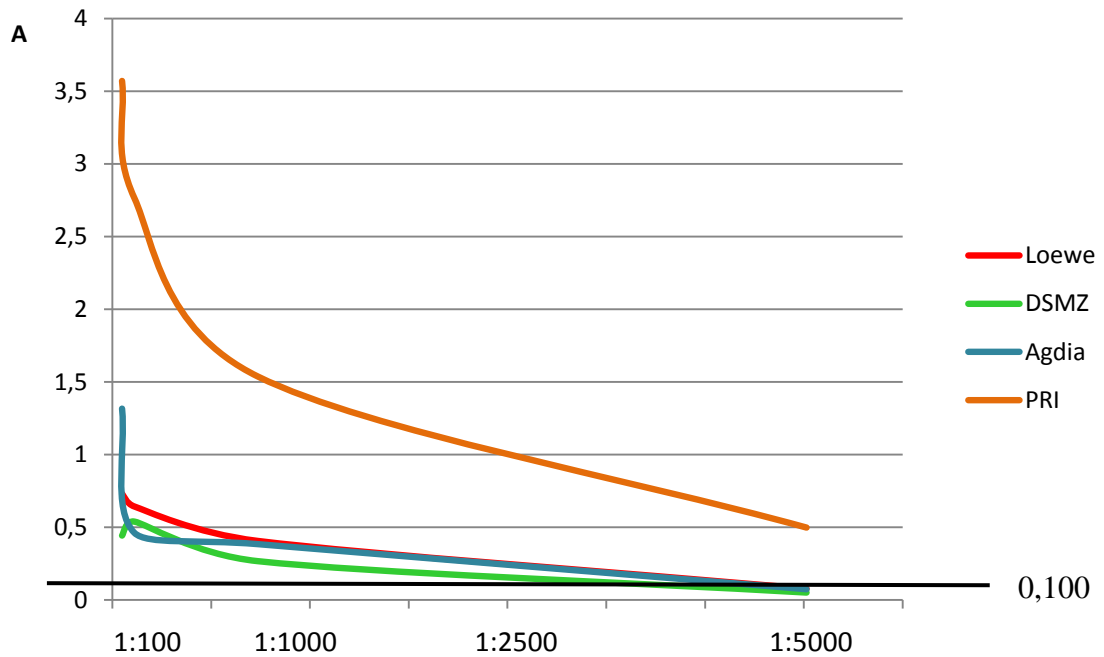
5.1 Neljän testin vertailu

Alustavissa kokeissa vertailtiin eri valmistajien testikittien toimivuutta, jotta saataisiin käsitys kittien eroista työn jatkosuunnittelua varten. Testeissä tutkittiin samoja näytteitä yhteneväisissä olosuhteissa. Näytelaimennosten suhteiksi valittiin ensimmäisessä kokeessa 1:10, 1:50, 1:100 ja 1:500 (koekasvina sineraria). Eri valmistajien testikiteissä havaittiin olevan eroa. Tulokset eivät kuitenkaan olleet yksittäisen kitin kohdalla säännönmukaisesti lineaarisia, kuten oletettiin. Tämä voidaan todeta esimerkiksi Loewen tuloksista, jossa näytelaimennoksen kasvaessa absorbanssiarvo ei laskenut, vaan jopa suureni. Seuraavissa kokeissa (koekasveina itulehti ja tupakka) käytettiin suurempia laimennoksia, ja tulokset olivat lineaarisia. Poikkeuksena DSMZ:n testillä määritetyn itulehden tulokset, jossa 1:100 -laimennoksen mitattu absorbanssiarvo oli korkeampi kuin 1:10 -laimennoksen (taulukko 5).

TAULUKKO 5. Näytelaimennosten absorbanssiarvot eri valmistajien testikiteillä. Koekasveina käytettiin sinerariaa, itulehteä ja tupakkaa, ja tulokset mitattiin 120 minuutin inkuboinnin jälkeen.

Kasvisuku	Näyte-laimennos	Loewe	DSMZ	Agdia	PRI
Sineraria	1:10	1,193	1,699	2,855	3,372
	1:50	1,480	1,115	2,657	3,384
	1:100	1,614	0,865	2,664	3,459
	1:500	0,941	0,236	1,767	3,679
Itulehti	1:10	0,731	0,443	1,316	3,570
	1:100	0,643	0,539	0,462	2,764
	1:1000	0,406	0,267	0,384	1,537
	1:5000	0,078	0,051	0,074	0,498
Tupakka	1:10	1,856	3,101	3,194	3,466
	1:100	1,569	1,106	2,613	3,204
	1:1000	0,664	0,476	1,373	2,426
	1:5000	0,154	0,151	0,403	0,898

Ensimmäisten tulosten perusteella työtä jatkettiin tutkimalla testikittien sensitiivisyyttä laimennossarjojen avulla. ELISA-testien määrittämissarjana oli absorbanssiarvo 0,100, joka on merkitty kuvioon 7 tummennetulla viivalla. Sen mukaan alhaisin positiiviseksi tulokittavan näytteen absorbanssiarvo on 0,100. PRI:n testikitillä saatiin itulehden 1:5000 -näytelaimennoksen absorbanssiarvoksi 0,498, kun muilla kiteillä saman laimennoksen arvot jäivät määrittämissarjan alapuolelle (kuvio 7).



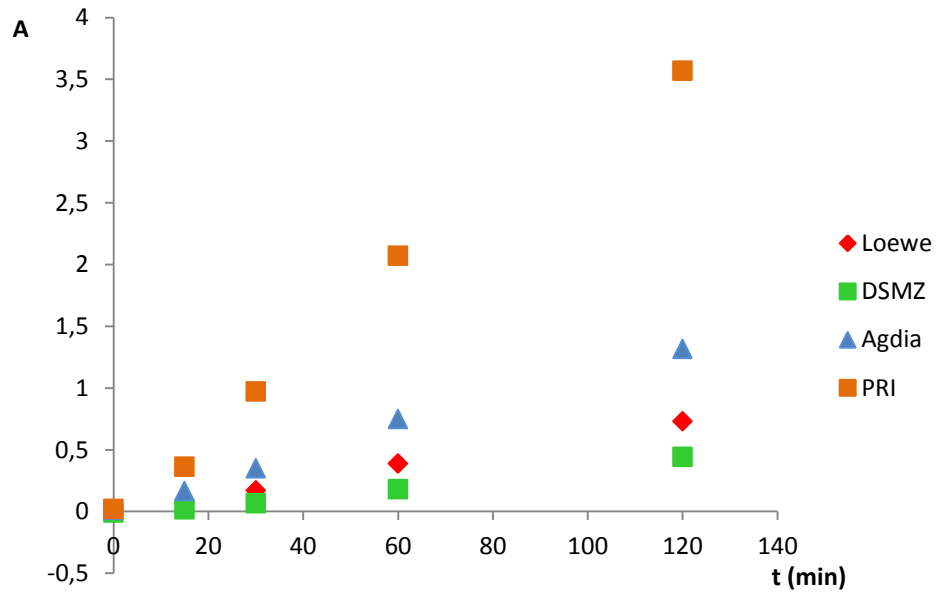
KUVIO 7. Testikittien sensitiivisyyttä tutkittiin laimennossarjojen avulla. Koekasvina käytettiin itulehteä, ja tulokset luettiin 120 minuutin inkuboinnin jälkeen.

Vertailuissa tutkittiin myös substraatin lisäyksen jälkeisen inkubaatioajan vaikutusta absorbanssiarvoihin. Koekasveina käytettiin itulehteä ja tupakkaa. Tulokset luettiin substraatin lisäyksen jälkeen 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin väliajoin. Yksittäisen kitin kohdalla absorbanssiarvot nousivat tasaisesti inkubaatioajan kasvaessa (taulukko 6).

TAULUKKO 6. Itulehti- ja tupakka-näytteiden absorbanssiarvot eri valmistajien kiteillä, kun tuloksia luettiin 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin inkuboinnin jälkeen.

Kasvisuku	Inkubaatio- aika (min)	Loewe	DSMZ	Agdia	PRI
Itulehti	0	0,005	-0,007	0,014	0,021
	15	0,071	0,017	0,165	0,363
	30	0,172	0,066	0,351	0,973
	60	0,389	0,180	0,749	2,070
	120	0,731	0,443	1,316	3,570
Tupakka	0	0,003	-0,002	0,069	0,059
	15	0,076	0,308	0,633	0,526
	30	0,315	1,178	1,167	1,477
	60	0,737	2,321	2,533	2,707
	120	1,569	3,101	3,194	3,466

Inkubaatioajan vaikutusta absorbanssiarvoihin on havainnollistettu myös kuviossa 8, jossa nähdään näytteiden absorbanssiarvot 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin kohdalla. Jokaisen kitin kohdalla absorbanssiarvot olivat lineaarisesti riippuvia inkubaatioajoista.



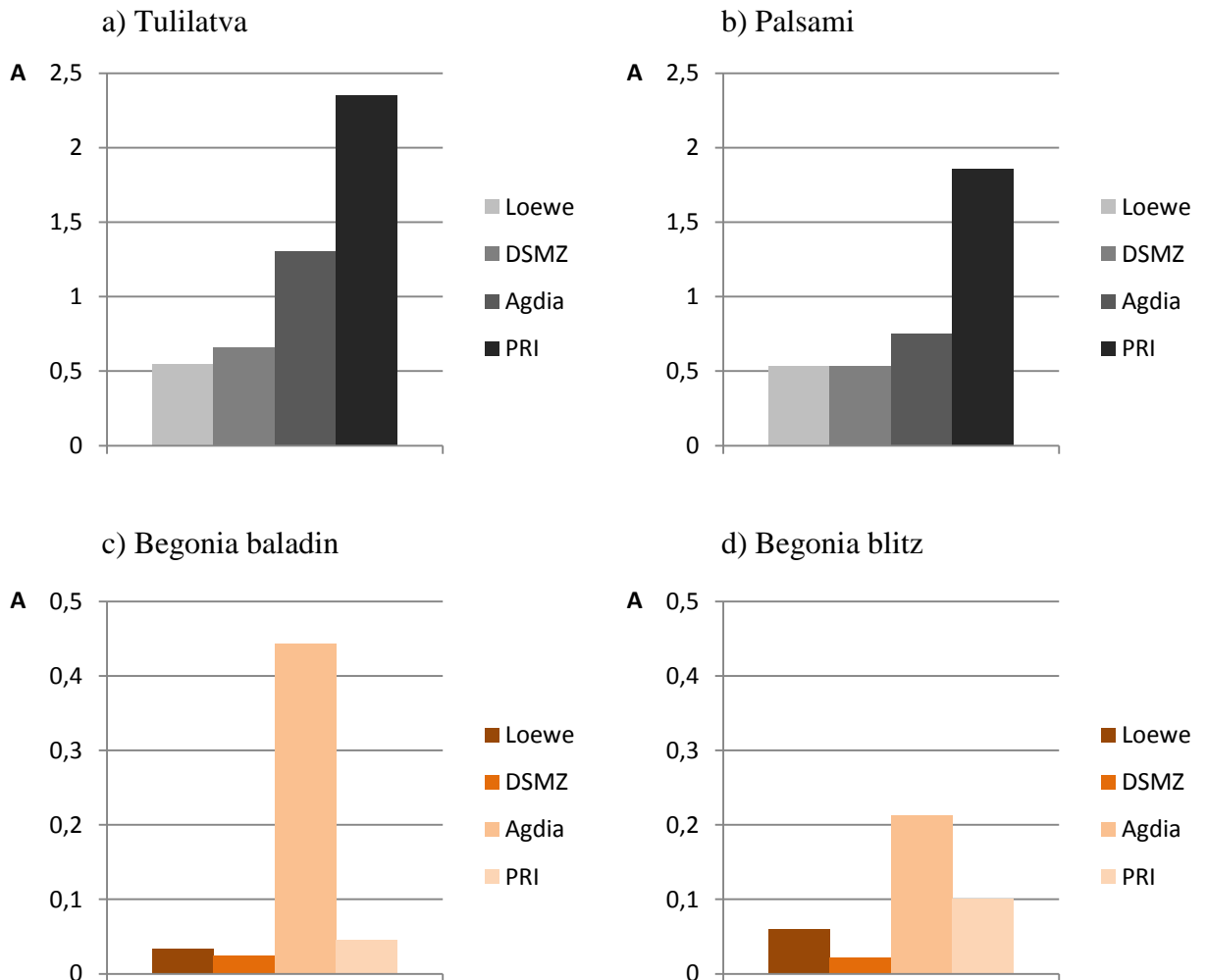
KUVIO 8. Itulehti-näytteiden absorbanssiarvot eri valmistajien testikiteillä, kun tulokset luettiin 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin inkuboinnin jälkeen.

Työtä jatkettiin tutkimalla kasvikontrollien (koekasveina palsami, sineraria, tulilatva ja tupakka) lisäksi asiakkaiden näytteitä (begoniat), joiden tulokset on esitetty taulukossa 7. PRI:n ELISA-kitillä saatiin positiivisten kasvikontrollien kohdalla toistuvasti suurimmat absorbanssiarvot. Asiakkaiden näytteiden kohdalla suurimmat absorbanssiarvot saatiin Agdian testikitillä, jolla suurin osa näytteistä todettiin positiivisiksi. Koska muilla testeillä asiakkaiden näytteet määritettiin INSV-negatiivisiksi, Agdian testin tulosten arveltiin olevan vääriä positiivisia tuloksia.

TAULUKKO 7. Kontrollinäytteiden (palsami, sineraria, tulilatva ja tupakka) sekä asiakkaiden näytteiden (begoniat) absorbanssiarvot neljän eri valmistajan kitillä.

Kasvisuku	Loewe	DSMZ	Agdia	PRI	Tulos
Begonia, pakaste	-0,003	0,013	0,545	0,047	-/+
Begonia, tuore	-0,017	-0,005	-0,004	0,004	-
Begonia baladin	0,033	0,024	0,443	0,046	-/+
Begonia blitz	0,060	0,021	0,212	0,099	-/+
Begonia lorraine	-0,007	0,004	0,126	0,054	-/+
Palsami	0,532	0,537	0,753	1,856	+
Sineraria	2,095	2,321	2,240	3,345	+
Tulilatva	0,548	0,660	1,304	2,350	+
Tupakka	2,276	2,222	2,770	3,153	+

Edellä esitettyjä tuloksia on vertailtu myös pylväsdiagrammien muodossa (kuvio 9). Diagrammit havainnollistavat tuloksien eroja eri testikittien välillä. PRI:n testikitillä saadut absorbanssiarvot olivat selvästi korkeimmat esimerkiksi tulilatvan ja palsamin kohdalla. Asiakkaiden näytteiden osalta Agdian testi antoi positiivisia tuloksia (begonia baladin ja begonia blitz), vaikka muilla testeillä näytteet määritettiin negatiivisiksi.



KUVIO 9. Eri valmistajien testikiteillä saatujen kontrollinäytteiden (tulilatva ja palsami) sekä asiakkaiden näytteiden (begonia baladin ja begonia blitz) absorbanssiarvot diagrammeissa a-d.

5.2 Kahden testin jatkovertailu

ELISA-testien jatkotutkimusta jatkettiin kahdella testillä, joista toinen oli Kasvintuhoojajaostossa nykyisin käytössä oleva Loewen testi. Loewen testikitin rinnalle valittiin epäsuoraan sandwich-ELISA:an perustuva DSMZ:n testi. Agdian testikittiä ei otettu jatkovertailuun, koska alustavissa kokeissa osa saaduista tuloksista oli mahdollisesti vääriä positiivisia tuloksia. PRI:n testin suorittamiseen ja tulosten saamiseen kuluva aika oli yksi syy, ettei testiä valittu jatkovertailuun.

Jatkovertailun alustavissa kokeissa vertailtiin kahden eri valmistajan testikittien toimivuutta, kun näytteinä käytettiin pakastettuja, INSV-negatiivisia kasvikontrolleja. Testeissä tutkittiin samoja kontrolleja yhteneväisissä olosuhteissa, jotta saataisiin selville terveiden kasvien vaikutus taustakohinaan. Koekasveina käytettiin begoniaa, krysanteemia, lobeliaa, lumihiuataletta, markettaa, pelargoniaa, petuniaa, tulilatvaa ja tupakkaa, joita määritettiin kolmella eri määrityskerralla (taulukko 8). Tuloksia luettiin 120 minuutin inkuboinnin jälkeen.

TAULUKKO 8. Loewen ja DSMZ:n testikiteillä saatujen INSV-negatiivisten kasvikontrollien absorbanssiarvot kolmella määrityskerralla.

Kasvisuku	1/3		2/3		3/3	
	Loewe	DSMZ	Loewe	DSMZ	Loewe	DSMZ
Begonia	-0,005	-0,012	-0,004	-0,004	0,028	0,040
Krysanteemi	-0,006	-0,012	0,005	0,039	0,013	-0,001
Lobelia	-0,003	-0,006	0,004	0,005	0,007	-0,001
Lumihiuatale	-0,004	-0,012	0,008	0,005	0,004	-0,001
Marketta	0,004	-0,011	0,000	0,009	0,004	-0,005
Pelargonia	0,001	-0,005	-0,003	0,001	0,002	0,001
Petunia	0,012	0,013	0,023	0,033	0,004	0,001
Tulilatva	-0,001	0,001	-0,004	-0,008	0,000	-0,005
Tupakka	0,001	-0,003	0,008	-0,004	0,004	0,001

Ensimmäisen jatkovertailun tulosten perusteella työtä jatkettiin tutkimalla pakastettuja, INSV-positiivisia kontrollinäytteitä yhteneväisissä olosuhteissa. Näytteitä tutkittiin neljällä eri määrityskerralla, jotta saataisiin selville miten saman näytteen absorbanssiarvot eroavat eri määrityskerroilla. Lisäksi eri testikiteillä saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa. Näytteestä riippumatta DSMZ:n testikitillä käyttämällä saatiin matalampia absorbanssiarvoja kuin Loewen kitillä (taulukot 9 ja 10).

TAULUKKO 9. Loewen kitillä saadut INSV-positiivisten kasvikontrollien absorbanssiarvot neljällä määrityskerralla sekä absorbanssiarvojen keskiarvot ja keskihajonnat.

ELISA-testi	Testikerta	Itulehti	Palsami	Tulilatva
Loewe	1	1,175	0,797	0,454
	2	1,107	0,566	0,630
	3	1,185	0,495	0,667
	4	1,217	0,455	0,643
	Keskiarvo	1,171	0,578	0,599
	Keskihajonta	0,046	0,153	0,098

TAULUKKO 10. DSMZ:n testikitillä saadut positiivisten kasvikontrollien absorbanssiarvot neljällä määrityskerralla sekä absorbanssiarvojen keskiarvot ja keskihajonnat.

ELISA-testi	Testikerta	Itulehti	Palsami	Tulilatva
DSMZ	1	0,504	0,305	0,166
	2	0,530	0,143	0,223
	3	0,352	0,213	0,207
	4	0,287	0,117	0,245
	Keskiarvo	0,426	0,195	0,210
	Keskihajonta	0,113	0,084	0,033

Jatkotutkimuksessa määritettiin myös asiakkaiden kasvinäytteitä. Koekasveina käytettiin begoniaa, esikkoa, kurkkua ja tomaattia, joiden absorbanssiarvot mitattiin 120 minuutin inkuboinnin jälkeen. Näytteet todettiin INSV-negatiivisiksi molemmilla testikeiteillä, mikä nähdään taulukosta 11.

TAULUKKO 11. Loewen ja DSMZ:n testeillä määritettyjen asiakkaiden kasvinäytteiden absorbanssiarvot.

Kasvisuku, -laji	Loewe	DSMZ	Tulos
Begonia	0,003	0,008	-
Esikko	0,006	0,015	-
Kurkku	0,014	0,031	-
Tomaatti	0,006	0,003	-

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön uusi ELISA-testi, jonka avulla olisi mahdollista määrittää palsamin kuoliolaikkuvirusta, ja jota voitaisiin käyttää epäselvien tai heikkojen positiivisten tulosten varmistamisessa. Työssä vertailtiin neljää ELISA-testikittiä, joiden valmistajat olivat Loewe, Agdia, DSMZ ja PRI. Virusta voitiin määrittää myös Bioreban INSV AgriStrip -pikatestin avulla. Tulosten perusteella pohdittiin muun muassa kittien toimivuutta, luotettavuutta, sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä. Vertailussa otettiin huomioon myös testien käytettävyys, suorittamiseen kulunut aika ja kittien saatavuus.

Varmistuskäyttöön otettavan testin toivottiin olevan käytännöllinen. Testin suorittamiseen ja tulosten saamiseen kulunut aika sekä työmäärän suhde nopeuteen vaikutti merkittävästi testin valintaan. Lisäksi pyrittiin hyödyntämään mahdollisuuksien mukaan samoja puskuriliuoksia kuin Loewen ELISA-testissä, ettei kaikkia puskuriliuoksia tarvitsisi tilata erikseen. Käyttöön otettavan testin tuli olla luotettava palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämiseen. Positiivisten näytteiden kohdalla toivottiin voimakkaita värireaktioita, ja negatiivisten näytteiden absorbanssiarvojen tuli jäädä alhaisiksi, koska lähellä määritysrajaa olevat tulokset eivät olleet toivottuja. Vertailuissa käytettyjen testikittien saatavuuksissa ei ollut huomattavia eroja. Kitit tilattiin ulkomailta, ja niiden toimitusaika vaihteli kahdesta vuorokaudesta viikkoon.

Tuloksien perusteella voidaan todeta, että näytteille mitatut absorbanssiarvot vaihtelivat merkittävästi eri testikittien välillä. Paikoitellen huomattavaa absorbanssiarvojen vaihtelua havaittiin myös saman testin tuloksissa, jotka oli saatu eri mittauskerroilla määritettäessä samaa pakastettua näytettä yhteneväisissä olosuhteissa.

Eri valmistajien kittien sensitiivisyyttä tutkittiin laimennossarjojen avulla. Ensimmäisissä vertailuissa tulokset eivät olleet yksittäisen kitin kohdalla säännönmukaisesti lineaarisia, vaan näytelaimennoksen kasvaessa absorbanssiarvo saattoi suurentua, vaikka sen oletettiin pienenevän. Absorbanssiarvon kohoaminen näytelaimennoksen kasvaessa johtui luultavasti kasvimehussa olevista inhibiittoreista, joiden sitoutuminen entsyymiin aktiiviseen kohtaan estää substraatin kiinnittymisen siihen (Solunetti 2006). Inhibiittorit

laimenivat suhteellisesti enemmän kuin määritettävä analyytti, mikä johti korkeampiin absorbanssiarvoihin laimeampien näytelaimennosten kohdalla.

Seuraavissa kokeissa käytettiin suurempia laimennoksia, jolloin saatiin lineaarisia tuloksia. Vahvat INSV-positiiviset näytteet (absorbanssiarvo $>1,000$) todettiin usein vielä 1:5000 -laimennoksella positiivisiksi. Vertailuissa olisi ollut suotavaa käyttää laimeampia näytelaimennoksia, jotta oltaisiin saatu selville, millä laimennossuhteella absorbanssiarvo olisi ollut niin alhainen, että näyte oltaisiin käytetyllä raja-arvolla (absorbanssiarvo 0,100) todettu negatiiviseksi.

Vertailuja jatkettiin tutkimalla substraatin lisäyksen jälkeisen inkubaatioajan vaikutusta absorbanssiarvoihin. Näytteiden absorbanssiarvoja määritettiin substraatin lisäyksen jälkeen 0, 15, 30, 60 ja 120 minuutin väliajoin. Mitatut arvot nousivat tasaisesti lukuai-kaan nähden, joten yksittäisen kitin kohdalla absorbanssiarvot olivat lineaarisesti riippuvia inkubaatioajasta. Mikäli näyte oli INSV-positiivinen, voitiin se todeta usein jo 30 minuutin inkuboinnin jälkeen. Tämä johtui osittain siitä, että substraattina käytetty pNPP kehittyy 15–30 minuutissa (Kem-En-Tec Diagnostics 2013, 21). Esimerkiksi PRI:n kitillä määritettyjen näytteiden absorbanssiarvot olivat asetettua määritysrajaa korkeampia usein jo 15 minuutin jälkeen substraatin lisäyksestä. Luotettavien tulosten saamiseksi inkubointia jatkettiin kahteen tuntiin asti.

Suurimmat absorbanssiarvot mitattiin näytteille, jotka oli määritetty PRI:n testillä. Yhtenä syynä saattoi olla pitkät inkubaatioajat, jotka kestivät keskimäärin 20 tuntia, kun muiden kittien kohdalla inkubaatioajat olivat kahdesta tunnista neljään tuntiin. Absorbanssiarvojen eroihin vaikutti luultavasti myös se, mistä kohtaa kasvia näyte oli otettu. Virusta esiintyy usein erityisesti taudin alkuvaiheessa vain osassa kasvin lehdistä. Näytteenottokohdalla on täten suuri merkitys, varsinkin silloin, kun kasvissa ei havaita selkeitä oireita tai niitä ei ole muodostunut lainkaan (Moorman 2014). Viruspitoisuus kasvin eri lehdistä saattoi erota merkittävästi, mikä aiheutti vaihtelua eri kittien tulosten välille.

Kontrollinäytteiden lisäksi testeissä tutkittiin asiakkaiden näytteitä. Asiakkaiden näytteiden absorbanssiarvot vaihtelivat eri valmistajien kittien välillä. Näytteet todettiin Agdian testillä huomattavasti useammin INSV-positiivisiksi kuin muilla testeillä. Esimerkiksi taulukossa 7 (s. 36) esitetyistä tuloksista nähdään, että useat näytteet

todettiin INSV-positiivisiksi korkeiden absorbanssiarvojen vuoksi, vaikka muut tulokset olivat selkeitä negatiivisia tuloksia. Agdian kitin vasta-aineet eivät olleet luultavasti riittävän spesifisiä määrittämään virusta.

ELISA-testien jatkotutkimusta jatkettiin Loewen ja DSMZ:n testeillä. Alustavissa kokeissa vertailtiin eri kasvilajien antamia tausta-arvoja negatiivisten kasvikkontrollien avulla. Laboratoriossa oli todettu aikaisemmissa kokeissa, että negatiiviset kontrollit saattavat antaa tausta-arvoa kasvilajista riippuen absorbanssiarvoon 0,070 asti (Tegel 2014a, 10). Tehtyjen mittauksien perusteella terveiden kasvilajien antamat tausta-arvot eivät ylittäneet arvoa 0,040 ja jäivät siten huomattavasti alle absorbanssiarvon 0,070. Kasvilajien aiheuttamissa tausta-arvoissa ei havaittu merkittäviä eroja, ja korkeampia arvoja mitattiin satunnaisesti vain muutamalla mittauskerralla, esimerkiksi begonian ja petunian kohdalla.

Jatkovertailuissa tutkittiin myös positiivisia kasvikkontrolleja, joita testattiin neljällä eri määrityskerralla. Saman pakastetun näytteen absorbanssiarvot eivät eronneet toisistaan merkittävästi eri määrityskerroilla, kun tarkasteltiin yksittäisen kitin tuloksia. Eri testikiteillä saadut tulokset erosivat toisinaan merkittävästi. Näytteestä riippumatta DSMZ:n testikittiä käyttämällä saatiin tavallisesti matalampia absorbanssiarvoja.

Bioreban AgriStrip -pikatestillä oli mahdollista selvittää nopeasti oliko näyte INSV-positiivinen vai -negatiivinen. Tulokset olivat kuitenkin toisinaan epäselviä, minkä vuoksi ne olivat vain suuntaa-antavia. Pikatestiliuskaan muodostui välillä heikko kontrolliviiva, mikä viittasi positiiviseen tulokseen. ELISA-testin suorittaminen oli välttämätöntä, koska INSV-positiivisuuden lisäksi testin avulla saatiin selville tartunnan voimakkuus.

Agdian ELISA-testi oli käytännöllinen ja sen suorittamiseen kului vain vajaa kaksi vuorokautta lyhyiden inkubaatioaikojen vuoksi. Lisäksi entsyymien katalysoimat värireaktiot positiivisille näytteille olivat voimakkaita. Agdian kitillä osalle näytteistä mitattiin korkea absorbanssiarvo, vaikka muilla kiteillä saatiin selkeitä negatiivisia tuloksia. Agdian testiä ei voitu ottaa käyttöön, koska väärin positiivisten tulosten uskottiin johtuvan kitin vasta-aineista, jotka eivät olleet riittävän spesifisiä määrittämään INSV:tä.

PRI:n testin suorittamiseen kului pitkien inkubaatioaikojen vuoksi useampi vuorokausi, mikä oli merkittävin syy siihen, ettei testiä otettu käyttöön. Pitkät inkubaatioajat saattoivat olla kuitenkin yhtenä syynä voimakkaisiin värireaktioihin positiivisten näytteiden kohdalla. Vastaavasti liian lyhyt inkubaatioaika esimerkiksi kouttausvaiheessa vaikuttaa vasta-aineiden sitoutumiseen. Mikäli inkubaatioaika on liian lyhyt, vasta-ainetta ei välttämättä sitoudu levyn pintaan riittävästi, mikä vaikuttaa myös myöhemmin mitattavaan absorbanssiarvoon. (Kem-En-Tec Diagnostics 2013, 9.)

Uudeksi, varmistuskäyttöön tarkoitetuksi testiksi valittiin DSMZ:n testi. Koska Loewen testi perustui suoraan sandwich-ELISA:an, haluttiin käyttöön ottaa eri menetelmään perustuva testi. Epäsuoran menetelmän etuna on sen herkkyys, sillä sensitiivisyyden on todettu kasvavan, kun enemmän kuin yhden leimatun vasta-aineen sitoutuminen sekundaarivasta-aineeseen mahdollistuu. Suorassa menetelmässä enemmän kuin yhden leimatun vasta-aineen sitoutuminen ei ole mahdollista, koska leimattu vasta-aine ei sitoudu leimaamattomaan vasta-aineeseen, vaan antigeeniin. (AbD Serotec 2014.)

DSMZ:n testissä käytettävät monoklonaaliset vasta-aineet (MAb) ovat peräisin yhdestä B-solukloonista, jolloin niiden sitoutumiskohdat ovat kaikki samanlaisia ja tietyille anti-geenille spesifisiä (Goldsby, Kindt, Kuby & Osborne 2003, 99). Tämän uskottiin karsivan hyvin epäspesifistä kiinnittymistä ja estävän väärien positiivisten tulosten syntymistä. Polyklonaaliset vasta-aineet, joita Loewen kitti sisälsi, ovat yleensä spesifisiä, mutta ne voivat ristireagoida erityisesti alkuperäisen kaltaisten antigeenien kanssa. Ristireaktioiden mahdollisuus monoklonaalisia vasta-ainetta käytettäessä on murto-osa verrattuna polyklonaalisen vastaavasta. (Hedman 2011, 135.) Tämä saattoi olla yksi syy, miksi Loewen testillä saatiin tavallisesti korkeampia absorbanssiarvoja kuin DSMZ:n testillä.

Vaikka DSMZ:n testillä saatiin toisinaan alhaisempia absorbanssiarvoja, todettiin se luotettavaksi palsamin kuoliolaikkuviruksen määrittämisessä. Testi oli käytännöllinen, ja sen avulla tulokset saatiin kahdessa vuorokaudessa. Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella testi voitiin ottaa rutiinikäyttöön Kasvintuhoojajaostossa.

LÄHTEET

- AbD Serotec®. 2014. An Introduction to ELISA. Luettu 23.11.2014.
<http://www.abdserotec.com/an-introduction-to-elisa.html#1>
- Adelberg, E.A., Jawetz, E. & Melnick, J.L. 1982. Review of Medical Microbiology. 15th edition. California: Lange Medical Publications.
- Agdia®. 2014. About Agdia. Luettu 1.9.2014.
<http://www.agdia.com/company/index.cfm>
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Burlington: Elsevier Academic Press.
- Ball, L.A., Desselberger, U., Fauquet, C.M., Maniloff, J. & Mayo, M.A. 2005. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st edition. London: Elsevier Academic Press.
- Biocer. 2014. ELISA kitler. [kuva]. Tulostettu 5.9.2014.
<http://biocersaglik.com/page/elisa-kitleri/283>
- Bioreba. 2014a. Product info: AgriStrip (on-site test). Tulostettu 24.8.2014.
<http://www.bioreba.ch/?idpage=28>.
- Bioreba. 2014b. Product information: AgriStrip Impatiens Necrotic Spot Virus (INSV). Tulostettu 7.8.2014.
http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/AgriStrip/INSV_AgriStrip.pdf
- Burmester, G-R. & Pezzutto, A. 2003. Color Atlas of Immunology. Germany: Georg Thieme Verlag.
- Creative Diagnostics®. 2014. Colloidal Gold Lateral Flow Strips Development. [kuva]. Tulostettu 13.8.2014. <http://www.creative-diagnostics.com/Colloidal-Gold-Lateral-Flow-Strips-Development.html>
- Crowther, J.R. 2009. Methods in molecular biology. The ELISA Guidebook. 2nd edition. New York: Humana Press.
- DeAngelis, J.D., Rossignol, P.A. & Sether, D.M. 1994. Transmission of Impatiens Necrotic Spot Virus in Peppermint by Western Flower Thrips. *Journal of Economic Entomology* 87 (1), 197–201.
- Dimmock, N.J., Easton, A.J. & Leppard, K.N. 2007. Introduction to Modern Virology. 6th edition. Malden: Blackwell.
- DSMZ. 2014. Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Luettu 27.8.2014. <http://www.dsmz.de/>
- Ehder, T. (toim.) 2005. Kemian metrologian opas. MIKES Mittatekniikan keskus. Julkaisu J6/2005. Helsinki.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. 2011. Palsamin kuoliolaikkuvirus. Tulostettu 12.6.2014. www.evira.fi/files/products/1315307144807_insv_fi.pdf

European and Mediterranean Plant Protection Organization EPPO. 2014. EPPO Data Sheets on Quarantine Pests: Impatiens Necrotic Spot Tospovirus. Tulostettu 20.8.2014. https://www.eppo.int/QUARANTINE/virus/Impatiens_necrotic_spot_virus/INSV00_ds.pdf

European food safety authority EFSA. 2012. Scientific Opinion on the Pest Categorisation of the Tospovirus. EFSA Journal 10 (7), 1–101.

German, T.L., Moyer, J.W. & Ullman, D.E. 1992. Tospoviruses: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships. Annual Review of Phytopathology 30, 315–348.

Gillespie, S. 1994. Medical Microbiology Illustrated. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Kuby, J. & Osborne, B.A. 2003. Immunology. 5th edition. New York: W. H. Freeman and Company.

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen A. & Vaara, M. 2011. Immunologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Howley, P.M. & Knipe, D.M. 2007. Fields Virology. 5th edition, volume two. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Business.

Hulshof, J., Jaaksi, S., Linnemäki, M. & Vänninen I. 2001. Kalifornianripsiäisen (*Frankliniella occidentalis*) hallinta torjunta-aineiden käytön minimoivassa leikkoruusutuotannossa (1997–99). Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. MTT:n julkaisuja. Sarja A 102, 1–127.

ICTV. 2014. Tospovirus. Tulostettu 9.6.2014.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Kem-En-Tec Diagnostics. 2013. Guide for Eco-sensible ELISA Development. Tuotekehitysopas. Julkaistu 13.3.2013. Tulostettu 31.8.2014. http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/pdf/ELISA_guide.pdf

Laki kasvinterveyden suojelemisesta 18.7.2003/702.

Lemmetty, A., Laamanen, J., Soukainen, M. & Tegel, J. 2011. Emerging virus and viroid pathogen species identified for the first time in horticultural plants in Finland in 1997–2010. Agricultural and food science (20), 29–41.

Loewe®. 2012. Solutions for Plant Disease Diagnosis. Luettu 1.9.2014. <http://www.loewe-info.com/>

Meinander, B. & Pohto, A. 2003. Riskiarviointi tomaatin pronssilaikkuviruksesta (TSWV) ja palsamin kuoliolaikkuviruksesta (INSV) sekä suoja-alueoikeuden kustannus- ja hyötylaskelmat. Kasvintarkastus 27.3.2003.

Moorman, G. 2014. Impatiens Necrotic Spot Virus. PennState College of Agricultural Sciences. <http://extension.psu.edu/pests/plant-diseases/all-fact-sheets/impatiens-necrotic-spot-virus>

Morris, J. 2011. Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organisms: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) and *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV). SMT Project SMT-4-CT-98-2252.

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes OEPP/ European and Mediterranean Plant Protection Organization EPPO. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests: *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) and *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV). EPPO Bulletin 7 (34), 271–279.

Solunetti. 2006. Solubiologia: Entsyymi-inhibiittorit. Luettu 24.11.2014. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymiaktiivisuuden_saately/2/

Tegel, J. 2014a. Virusten määrittäminen Loewen ELISA-testillä. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Kasvianalytiikka. Menetelmäohje Evira 7525/6. Julkaistu 29.1.2014. Tulostettu 1.4.2014.

Tegel, J. 2014b. Talvikaktus. [kuva]. Tulostettu 1.8.2014.

Thermo Scientific. 2014. Overview of ELISA. Tulostettu 22.9.2014. <http://www.piercenet.com/method/overview-elisa>

Viralzone. 2010. Tospovirus: Molecular Biology. [kuva]. Tulostettu 1.9.2014. http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/253.html

Vänninen, I. 2014. Koristekasvien ripsiäiset: Ripsiäisten tunnistaminen. Tulostettu 5.9.2014. Kauppapuutarhaliitto ry. [http://www.kauppapuutarhaliitto.fi/kauppapuutarhaliitto/kplry.nsf/532d131a1644d842c2256c08003342c4/3503a332f2476395c22575e100276e7f/\\$FILE/RipsiaistenTunnistaminen.pdf](http://www.kauppapuutarhaliitto.fi/kauppapuutarhaliitto/kplry.nsf/532d131a1644d842c2256c08003342c4/3503a332f2476395c22575e100276e7f/$FILE/RipsiaistenTunnistaminen.pdf)

Wageningen UR. 2013. Annual report 2013. Julkaistu 1.9.2013. Tulostettu 1.9.2014. http://www.wageningenur.nl/upload_mm/4/1/c/ac218658-b4a2-4f12-8161-9113da005145_Jaarverslag%202013%20ENG_web.pdf

Yang, C.-F., Chen, K.-C., Cheng, Y.-H., Chien, W.-C., Huang, Y.-L., Raja, J. & Yeh, S.-D. 2014. Generation of Marker-free Transgenic Plants Concurrently Resistant to a DNA Geminivirus and a RNA Tospovirus. *Science Reports* 4, 1–11.

LIITTEET

Liite 1. Puskureiden valmistusohjeet

Kiinnityspuskuri

- 1,59 g Na₂CO₃
- 2,93 g NaHCO₃
- Liuotus 900 ml:ksi UHP-vedellä, pH:n säätö 9,6 HCl:llä ja tilavuuden täyttö yhdeksi litraksi

Pesupuskuri

- 8,0 g NaCl
- 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,2 g KCl
- 0,5 ml Tween 20
- Liuotus 900 ml:ksi UHP-vedellä, pH:n säätö 7,2–7,4 NaOH:lla ja tilavuuden täyttö yhdeksi litraksi

Näytekonzugaattipuskuri

- Pesupuskurin ainesosat
- 20,0 g PVP (polyvinyylipyrrolidoni)
- 2,0 g BSA (bovine serum albumin)
- Liuotus 900 ml:ksi UHP-vedellä, pH:n säätö 7,4 NaOH:lla ja tilavuuden täyttö yhdeksi litraksi

Näytepuskuri (Agdia)

- Pesupuskurin ainesosat
- 1,3 g Na₂SO₄
- 20,0 g PVP
- 2,0 g chicken egg albumin
- 20,0 g Tween 20
- Liuotus 900 ml:ksi UHP-vedellä, pH:n säätö 7,4 NaOH:lla ja tilavuuden täyttö yhdeksi litraksi

Näytepuskuri (DSMZ)

- Pesupuskurin ainesosat
- 20,0 g PVP
- Liuotus 900 ml:ksi UHP-vedellä, pH:n säätö 7,4 NaOH:lla ja tilavuuden täyttö yhdeksi litraksi

Substraattipuskuri

- 97 ml $C_4H_{11}NO_2$ (dietanoliamiini)
- 0,2 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$
- Liuotus 900 ml:ksi UHP-vedellä, pH:n säätö 9,8 HCl:llä ja tilavuuden täyttö yhdeksi litraksi

Liite 2. DSMZ:n ELISA-testi

Työn suoritus:

1. Käsittele levyn kuopat kiinnittävällä vasta-aineella (IgG). Laimenna vasta-aine kiinnityspuskuriin suhteessa 1:1000. Pipetoi laimennettua vasta-ainetta 200 µl/kuoppa
2. Inkuboi levyä +37 °C:ssa 2-4 h
3. Pese levyn kuopat pesulaitteella 4x300 µl pesupuskurilla (PBS + 0,05 % Tween 20)
4. Blokkaa kuopat pesupuskurilla, joka sisältää 2 % maitojauhetta
5. Inkuboi +37 °C:ssa 30 minuutin ajan
6. Pese levy kuten kohdassa 3
7. Pipetoi 200 µl/kuoppa nollanäytettä, positiivista ja negatiivista kontrollia sekä varsinaisia näytteitä
8. Suojaa levy parafilmillä ja foliolla, inkuboi yön yli jääkaapissa +4 °C:ssa
9. Seuraavana päivänä pese levy (kts. kohta 3)
10. Laimenna MAb-vasta-aine näytekongugaattipuskuriin suhteessa 1:1000. Pipetoi laimennettua vasta-ainetta 200 µl/kuoppa
11. Inkuboi levyä +37 °C:ssa 2-4 h
12. Pese levy (kts. kohta 3)
13. Laimenna RaM-AP-vasta-aine näytekongugaattipuskuriin suhteessa 1:1000. Pipetoi laimennettua vasta-ainetta 200 µl/kuoppa
14. Inkuboi +37 °C:ssa 2 h
15. Pese levy (kts. kohta 3)
16. Valmista substraattiliuos tablettimuodossa olevasta fosfataasisubstraatista (1 kpl/ 5 ml → 1 mg/ml). Pipetoi liuosta 200 µl/kuoppa
17. Suojaa levy suojakalvolla
18. Lue tulokset ELISA-lukulaitteella 0-30-60-120 minuutin väliajoin