

Henri Moisanen

Hevosarteriitti viruksen Real Time RT-PCR - menetelmän käyttöönotto ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Koulutusohjelman nimi

Opinnäytetyö

18.11.2016

Tekijä(t) Otsikko	Henri Moisanen Hevosarteriitti viruksen Real Time RT-PCR -menetelmän käyttöönotto ja validointi
Sivumäärä Aika	33 sivua 18.11.2016
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Riikka Holopainen Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Eläintautivirologian tutkimusyksikössä Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön ja validoida reaali-aikainen RT-PCR-menetelmä (rRT-PCR) hevosen arteriittivirukselle (equine arteritis virus, EAV) käytössä olevan perinteisen RT-PCR-menetelmän tilalle. Nykyaikainen rRT-PCR-menetelmä vähentäisi työvaiheita ja nopeuttaisi diagnostiikkaa.</p> <p>Validointia varten valmistettiin laimennossarjoja arteriittiviruskannoista Arvac ja Bucyrus eri matriiseihin. Lisäksi validoinnissa käytettiin vuosien 2009, 2013 ja 2016 EU-referenssilaboratorion toimittamia vertailumittausnäytteitä. Ensimmäiseksi testattiin menetelmän toimivuus CFX-96™ Real Time PCR -laitteella, sekä varmistettiin DNA-sekvensointitekniikalla, että monistettava kohta on oikeaa viruksen genomista aluetta.</p> <p>Laimennossarjoista saatiin laskettua variaatiokerroin (CV), joka kertoo tulosten uusittavuudesta ja toistettavuudesta. Vuosien 2009, 2013 ja 2016 vertailumittausnäytteistä menetelmällä saatiin yhtenevät tulokset referenssilaboratorion tulosten kanssa.</p> <p>Sekvensoinnin tulokset olivat selkeitä vaikkakin PCR-tuotteen pituus on vain 204 emäsparin mittainen, mikä voi aiheuttaa ongelmia sekvensoinnissa. Menetelmällä saadaan monistettua oikeaa kohtaa viruksen genomista (ORF7). Laimennossarjojen avulla laskettu variaatiokerroin oli hyvä. Suurilla laimennoksilla tulos heikkeni, sillä viruksen RNA:n vähentyessä näytteessä myös todennäköisyys PCR-reaktion onnistumiselle pienenee.</p> <p>Evira on FINAS-akkreditoitu testauslaboratorio ja tässä työssä validoitu menetelmä tullaan liittämään osaksi Eläintautivirologian tutkimusyksikössä käytössä olevia akkreditoituja diagnostisia PCR-menetelmiä.</p>	
Avainsanat	EAV, real time, RT-PCR, virus, solukasvatus

Author Title	Henri Moisanen The Introduction and Validation of Real-Time RT-PCR Method for Equine Arteritis Virus
Number of Pages Date	33 pages 18 November 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructors	Riikka Holopainen, Senior Researcher Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>The aim of the project was to implement and validate a diagnostic real-time RT-PCR method (rRT-PCR) for equine arteritis virus (EAV). The project was carried out at the Veterinary Virology Research Unit of the Finnish Food Safety Authority Evira.</p> <p>The method was qualitative rRT-PCR which means the results are either positive or negative. Validation parameters were sensitivity, specificity and accuracy, which were determined using samples received from the European Union Reference Laboratory for proficiency testing. Two EAV strains Arvac and Bucyrus, were used in the validation. The viruses were diluted in four different matrices, including organ suspension, nasal discharge, cell culture medium and semen.</p> <p>The new rRT-PCR method for EAV was successfully implemented and validated with excellent results from the dilution series, different matrices and proficiency test samples. The coefficient of variation (CV) was calculated from the cycle threshold (Ct) – values. The CV-values ranged from 0.5 to 4.5 %, which is acceptable for a PCR method. Based on the results obtained, the EAV rRT-PCR -method is repeatable within and between runs.</p> <p>Evira is a testing laboratory accredited by the Finnish Accreditation Service FINAS (ISO/IEC 17025 standard). The validated EAV rRT-PCR -method will be included to the accredited diagnostic PCR-methods used in the Veterinary Virology Research Unit and the rRT-PCR method is going to replace the traditional RT-PCR method in EAV diagnostics. Compared to traditional RT-PCR, rRT-PCR is faster, there is no need for gel electrophoresis in the visualization of results, and the risk of contamination is lower.</p>	
Keywords	EAV, virus, Real-Time RT-PCR, cell culture, RK-13

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Hevosen arteriittivirus	2
2.2	Viruksen kasvatus soluviljelmissä	3
2.2.1	Virusmäärän määrittäminen titraatiomenettelyllä	4
2.3	Näytteiden esikäsittely	4
2.3.1	RNA-eristys	4
2.4	PCR	5
2.4.1	RT-PCR	6
2.4.2	Reaaliaikainen RT-PCR	6
2.5	Agarosegeelelektroforeesi	8
2.6	Sanger-sekvensointi	9
3	Materiaalit ja menetelmät	10
3.1	EAV reaaliaikainen RT-PCR	10
3.2	Validoinnissa käytetty materiaali	13
3.3	Näytteiden esikäsittely	15
3.4	Laitteet ja reagenssit	16
3.5	Viruksen kasvatus soluviljelmissä	18
3.6	Virusmäärän määrittäminen titraatiomenettelyllä	18
3.7	Sekvensointi	18
3.8	Validoinnin parametrit	21
3.8.1	Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus	21
3.8.2	Uusittavuus ja toistettavuus	22
4	Tulokset	22
4.1	PCR-menetelmän optimointi	22
4.2	Titrauksen tulokset	24
4.3	Sekvensointi	26
4.4	Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys, tarkkuus	27
4.5	Menetelmän uusittavuus ja toistettavuus	28

5 Loppuyhteenveto/päätelmät

31

Lähteet

32

Lyhenteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool.
bp	Base pair. Emäspari.
cDNA	Complementary DNA. Komplementaarinen DNA.
CPE	Cytopathic effect. Soluviljelmän muutokset.
Ct-arvo	Cycle threshold -arvo.
CV	Coefficient of Variation. Variaatiokerroin.
ddNTP	Dideoksidinukleotidi.
DNA	Deoxyribonucleic acid. Deoksiribonukleiinihappo.
EAV	Equine arteritis virus. Hevosen arteriittivirus.
EHV	Hevosen herpesvirus.
EIAV	Hevosen näivetystauti.
EURL	European Union Reference Laboratory. Euroopan Unionin referenssi laboratorio.
FBS	Fetal Bovine Serum.
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry.
MEM	Minimum Essential Medium.

NCBI	National Center for Biotechnology Information.
NEAA	Non-Essential Amino Acids.
OIE	World Organisation for Animal Health.
ORF	Open reading frame. Avoin lukukehys.
PCR	Polymerase chain reaction. Polymeerasiketjureaktio.
PS-liuos	Penisilliini-streptomysiini -liuos.
RNA	Ribonucleic acid. Ribonukleiinihappo.
rRT-PCR	Real time reverse transcription polymerase chain reaction. Reaaliaikainen käänteistranskriptiopolymeraasiaketjureaktio.
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction. Käänteistranskriptiopolymeraasiaketjureaktio.
ssRNA	Single stranded ribonucleic acid. Yksijuosteinen RNA.
TBE	Tris-borate-EDTA buffer. Ajopuskuri.
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose ₅₀ .
WNV	West Nile Virus.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Eläintautivirologian tutkimusyksikössä (VIRT) Elintarviketurvallisuusvirastossa (Evira) Helsingissä. Suomen kansallinen akkreditointielin (FINAS) on myöntänyt Eviralle ISO/IEC 17025 -standardin mukaisen akkreditointistatuksen. Eläintautivirologian tutkimusyksikössä tehdään tautivalvontaa ja virologisia tutkimuksia tuotanto- ja harraste-eläinten sekä luonnonvaraisten eläinten osalta.

Hevosarteriittivirus on yleisesti hevosilla hengitystieoireita aiheuttava positiivissäikeinen yksijuosteinen RNA-virus. Ori voi jäädä loppuelämäkseen taudinkantajaksi ja levittää virusta eteenpäin siemennesteen mukana, mikä on suuri ongelma astuttamisessa ja keinohedelmöityksessä, sillä pahimmillaan virus voi aiheuttaa luomisia eli abortteja tiineillä tammoilla.

Työn tarkoituksena oli ottaa käyttöön ja validoida reaaliaikainen RT-PCR (rRT-PCR) -menetelmä hevosen arteriittiviruksen osoittamiseksi. Suurin osa VIRT:ssä käytettävistä diagnostisista PCR-menetelmistä kuuluu akkreditoinnin alaisuuteen. Kaikki uudet ja käyttöön otettavat menetelmät pyritään myös liittämään akkreditoinnin piiriin, mikä vaatii menetelmän validointia Eviran sisäisen ohjeistuksen mukaisesti. Menetelmän käyttöönotossa hyödynnettiin alkuperäisjulkaisussa ja Euroopan Unionin referenssi-laboratorion (EURL) Anses-Dozulé (Goustrainville, Ranska) ohjeistuksessa kuvattuja PCR-olosuhteita, joita testaamalla ja muokkaamalla saatiin menetelmä toimimaan. Näytteen esikäsittely tapahtuu samaan tapaan kuin muidenkin VIRT:ssä käytössä olevien PCR-menetelmien kohdalla. Näytteitä tutkittiin sekä perinteiselle RT-PCR-menetelmällä että rRT-PCR-menetelmällä, mikä auttoi tulosten tulkinnassa.

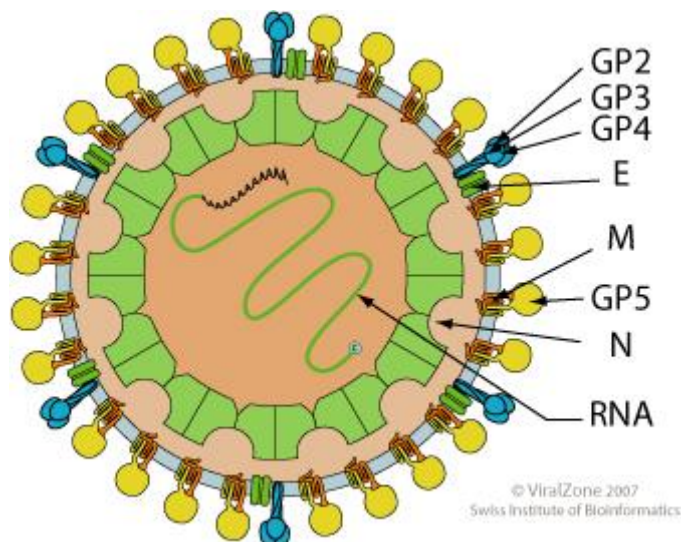
Validoinnissa tulosten oikeellisuutta mitattiin kolmen vuoden vertailumittausnäytteiden avulla. Laimennossarjojen avulla saatiin laskettua variaatiokerroin testauskertakohtaisesti sekä testauskertojen välille. Parametreina validoinnissa käytettiin spesifisyyttä, tarkkuutta, sensitiivisyyttä, toistettavuutta sekä uusittavuutta.

2 Teoria

2.1 Hevosen arteriittivirus

Arteriittivirus (EAV) kuuluu heimoon *Arteriviridae* ja sukuun *Arterivirus*. Arteri-viruskuun kuuluu muun muassa PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus) ja SHFV (Simian Haemorrhagic Fever Virus). [Andrew M. Q. King et al. 2011.]

Genomiltaan arteriittivirus on positiivissäikeinen (5'-3') yksijuosteinen RNA-virus, joka käyttäytyy kuin lähetti-RNA (mRNA). Genomin pituus vaihtelee 12 700 – 15 700 nukleotidin välillä. Viruksen genomi sisältää seitsemän lukukehystä (ORF), jotka voidaan kääntää proteiineiksi. Arteriittivirus-partikkeli (kuva 1) koostuu seitsemästä rakenneproteiinista. Näistä proteiineista kuusi vaippaproteiinia muodostavat viruksen vaipan. Osana vaipparakennetta ovat heterotrimeeri, jonka muodostavat kolme pienempää glykoproteiinia GP2, GP3 ja GP4, ja heterodimeeri, jonka muodostavat kaksi suurempaa glykoproteiinia M ja GP5. Vaippaproteiini E toimii ionikanavana. Nukleokapsidiproteiini N muodostaa kapsidin, joka pitää sisällään viruksen genomia. [Andrew M. Q. King et al. 2011.]



Kuva 1. Arteriittiviruspartikkelin rakenne. [ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, lainattu kuva 7.9.2016.]

Hevosen arteriittivirustartunta eli virusarteriitti ei ole tunnistettavissa pelkästään oireista, sillä ne ovat hyvin samankaltaisia kuin hevosinfluenssassa, näivetystaudissa, hengitystie- ja herpesvirustartunnoissa. Yleisiä oireita ovat hengitystieoireet, turvotukset ja pahimmassa tapauksessa tiineellä tammalla abortti. Sairastunut ori voi olla viruksen kantaja loppuikänsä ja levittää virusta spermassaan siittämisen yhteydessä. Taudin tunnistaminen tapahtuu seerumin vasta-ainemäärityksillä sekä viruksen osoituksella RT-PCR:llä. Vasta-ainemäärityksiä tehdessä on tunnettava eläimen rokotushistoria, sillä rokotukset nostavat vasta-aine tasoja. Ihmiselle viruksesta ei ole haittaa. [OIE-manuaali: Equine Viral Arteritis, 2013.]

Hevosen arteriittiviruksen aiheuttamaa tautia esiintyy maailmanlaajuisesti ja tautia on myös todettu Suomessa. Tauti kuuluu ilmoitettavaan eläintauteihin, jotka kunnaneläinlääkäri on velvoitettu ilmoittamaan kuukausittain aluehallintavirastolle maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 1010/2013 mukaisesti. [Evira, Virusarteriitti, 2016.] Ranskassa sijaitsevan EURL Anses-Dozulé hevostautien laboratorion saapuvat vertailumittausnäytteet, joilla ylläpidetään ja valvotaan jäsenmaiden kansallisten laboratoriodien diagnostisten menetelmien laatua.

2.2 Viruksen kasvatus soluviljelmissä

Soluviljelmän kasvattaminen onnistuneesti tarvitsee oikeat työtavat, jotta kontaminaatioita ei tapahdu ja tulokset eivät ole virheellisiä. Tärkeimpänä puhtaiden solulinjojen ylläpidossa on aseptinen toiminta, jolloin soluviljelmiä käsitellään omassa puhtaassa tilassa välttämällä virusten, bakteerien, sienien ja mykoplasmojen pääsyä soluviljelmiin, sekä ristikontaminaatioita muiden solulinjojen välillä.

Viruksen kasvattamista varten solulinjan on sovellettava viruksen isännäksi. Eläinsoluviljelmiä käytetään yleisesti muun muassa virusten eristämiseen ja kasvattamiseen. Olosuhteet ja elatusaineen komponentit valitaan jokaiselle soluviljelmällä soveltuvaksi. Kun soluviljelelmä kasvaa onnistuneesti, voidaan se altistaa virukselle. Virusdiagnostiikassa käytetään usein soluviljelypullon tai -levyn pohjaan kiinnittyviä niin sanottuja adherentteja soluja, joita ovat esimerkiksi epiteelisolut tai fibroblastit. Infektiota varten on tärkeää, että solut ovat hyvässä kunnossa ja elatusaine on uusittu ennen infektiota. Solukasvatusastias- tiassa ei saa myöskään olla liikaa soluja ennen infektiota. Täyteen kasvaneessa pullossa

soluilla ei ole enää tilaa jakaantua, eivätkä solut kykene vastaanottamaan virusta parhaalla mahdollisella tavalla.

Solut infektoidaan tunnetulla viruskannalla, minkä jälkeen solukasvatusta tarkkaillaan päivittäin mikroskoopilla. Virusinfektio ja virusten lisääntyminen todetaan soluviljelmässä havaittavien muutosten (CPE, *cytopathic effect*), kuten solurakenteen muutosten tai solukuoleman, perusteella.

2.2.1 Virusmäärän määrittäminen titraatiomenettelyllä

Tutkittavasta viruksesta voidaan selvittää virusmäärä titrauksen avulla. Titraus perustuu viruksesta tehtävään laimennossarjaan, jonka annetaan kasvaa solulevyllä 3-5 päivää. Solulevytä tarkastellaan mikroskoopin avulla soluvaurioita, jotka kertovat viruksen lisääntymisestä soluviljelmässä. Titrauksen loppupiste on suurin laimennos eli laimein näyte, jossa virus vielä infektoi 50 % solukuopista. Numeraalisen arvon laskemiseksi käytetään Spearman-Kärberin kaavaa (Kuvio 1). [Brian WJ Mahy et al. 1996.]

$$\log_{10}(50\% \text{ kuopista infektoivan laimennoksen päätepiste}) = \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right)$$

Kuva 2. Spearman-Kärberin kaava. Kirjain selitteet: x_0 = suurin laimennos, jossa kaikki kaivot positiivisia. d = laimennoskerroin. r_i = rinnakkaisten lukumäärä. n_i = positiivisten kaivojen lukumäärä.

2.3 Näytteiden esikäsittely

Polymeraasiketjureaktioanalyysiä eli PCR-analyysiä ei voi tehdä suoraan näytteistä, vaan niistä on ensin eristettävä DNA tai RNA, riippuen monistettavasta kohteesta. Tässä työssä PCR-analyysin kohteena oli EAV, joka on RNA-virus. PCR-analyysiä varten näytteet esikäsitellään, jonka jälkeen niistä voidaan eristää RNA ja suorittaa mittaus.

2.3.1 RNA-eristys

Näytteet sisältävät tutkittavan kohteen eli virus-RNA:n lisäksi paljon muita molekyyliä, kuten isäntäsolun DNA:ta, RNA:ta, proteiineja, nukleaasi-entsyymejä, inhibiittoreita ja

muita kontaminantteja. PCR-analyysin onnistumisen kannalta on tärkeää, että reaktiossa käytetään templaattina mahdollisimman puhdasta RNA:ta. RNA-eristykseen on olemassa valmiita kaupallisia kittejä sekä puhdistuslaitteita, jotka vähentävät työvaiheita ja tekijästä johtuvaa virhettä. Tässä työssä käytettiin Qiagenin QIAamp® Viral Mini -kittiä, jota voidaan käyttää sekä manuaalisesti että puoliautomaattisen eristyslaitteen avulla. Toimintaperiaate on sama sekä laitteella että kitillä.

QIAamp® Viral RNA Mini -kitti soveltuu virus-RNA:n eristämiseen plasmasta, seerumista ja soluvapaista ruumiinnesteistä. Eristyksessä on neljä vaihetta: lyysaus, kiinnittyminen, pesu ja eluointi. Näytteen lyysaus tapahtuu denaturoivissa olosuhteissa, jossa näytteen rakenne hajoaa ja RNA-molekyylejä hajottavat RNAasi-entsyymit inaktivoituvat. Virus-RNA:n kiinnittyminen tapahtuu QIAamp-pylvään membraaniin, johon sitoutumista edesauttaa kantaja-RNA:n lisäys. Pesuja suoritetaan kaksi kertaa. Pesujen tarkoituksena on poistaa ylimääräinen aines näytteestä ja jäljelle jää korkealaatuinen RNA. Viimeinen vaihe eli eluointi tapahtuu RNAasi-vapaalla puskurilla, jonka avulla puhdas RNA liuotetaan membraanista steriiliin putkeen. Eristetty RNA on vapaa proteiineista, nukleasientsyymeistä, muista kontaminanteista ja inhibiittoreista.

2.4 PCR

DNA:ta voidaan monistaa PCR:llä, jossa monistettava DNA-jakso määritetään alukkeilla, joihin DNA-polymeraasi sitoutuu. Aluke on lyhyt muutaman kymmenen emäksen mittainen DNA- tai RNA-juoste, joka toimii DNA synteesin aloituskohtana. Alukkeen sekvenssi on komplementaarinen monistettavalle DNA:lle eikä sekvenssi saa sisältää itselleen komplementaarisia kohtia, jotka muodostaisivat alukkeeseen hiusneularakenteita. DNA-polymeraasi aloittaa vastinjuosteen syntetisoinnin alukkeen määrittämästä kohdasta.

PCR-reaktion vaiheet ovat:

- denaturaatio, DNA:n kaksoisjuosteet irtoavat toisistaan
- annealing, alukkeet sitoutuvat juosteeseen
- ekstensio, DNA-polymeraasientsyymi syntetisoi alukkeiden välistä DNA:ta.

Vaiheet tapahtuvat eri lämpötiloissa, jolloin tärkeänä osana PCR-alukkeiden suunnittelun lisäksi on myös ajo-ohjelma. PCR-laite säätelee lämpötiloja ajo-ohjelman perusteella. Monistuminen tapahtuu eksponentiaalisesti. Teoreettisesti jokaisella reaktion sykliä tuotteen määrä kaksinkertaistuu, joka tarkoittaa PCR-reaktion tehokkuuden olevan 100 %. PCR-tuote analysoidaan ja visualisoidaan agarosigeelielektroforeesilla, jossa lopputuotteet erottuvat sähkövirran avulla agarosigeelillä koon perusteella. [Kubista et al. 2006.]

PCR-reaktio on hyvin kontaminaatioherkkä, jonka vuoksi reaktiossa tulee aina olla mukana negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Työskentely tapahtuu steriileillä työvälineillä ja työtavoilla. Kontaminaatiot havaitaan virheellisinä positiivisina tuloksina ja epäspesifisenä monistumisena.

2.4.1 RT-PCR

Käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio eli RT-PCR (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) on PCR-reaktio, jossa templaattina käytetään DNA:n sijaan RNA:ta. RNA:ta monistettaessa on siitä valmistettava ennen varsinaista PCR-reaktiota komplementaarinen DNA (cDNA), käänteiskopioija-entsyymien ja alukkeiden avulla. Käänteiskopiointireaktion jälkeen cDNA:ta monistetaan DNA-polymeraasin avulla kuten tavallisessa PCR-reaktiossa. [Kubista et al. 2006.]

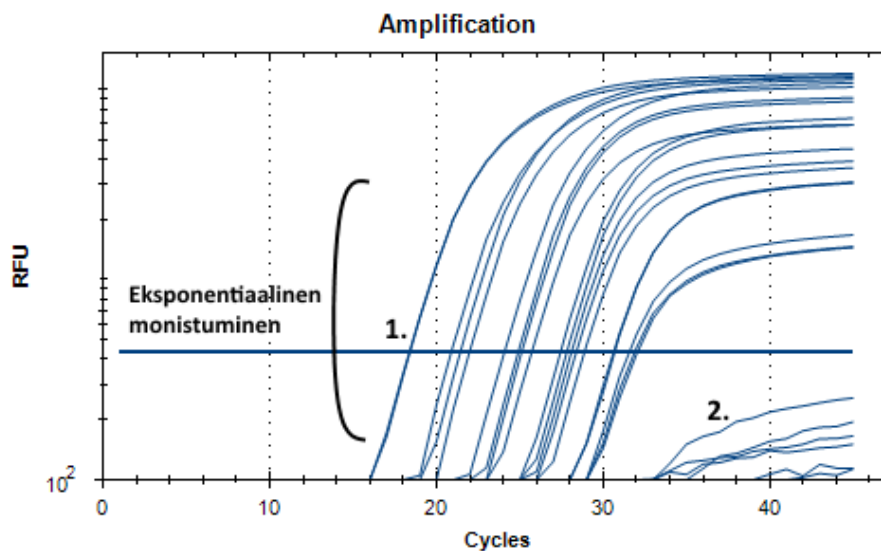
2.4.2 Reaaliaikainen RT-PCR

Nykyaikainen rRT-PCR on herkkä ja spesifinen menetelmä, jonka suurimpana etuna perinteiseen PCR-reaktioon verrattaessa on reaaliaikainen tulosten seuranta ja mahdollisuus monistettavan kohteen kvantitoimiseen. rRT-PCR-reaktiossa DNA:n monistuminen havaitaan reaktiossa mukana olevan fluoresoivan merkkiaineen avulla, eikä tuloksen toteamiseksi tarvita erillistä agarosigeelielektroforeesivaihetta, kuten perinteisessä PCR:ssä. [Kubista et al. 2006.]

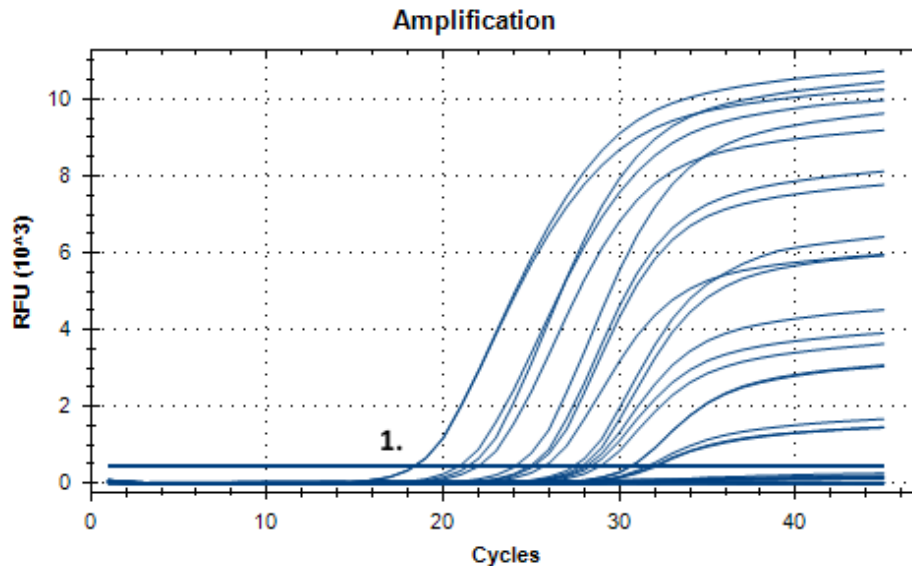
Reaaliaikainen PCR-laite koostuu PCR-laitteesta ja detektorista, joka mittaa fluoresenssia. Fluoresenssin syntyminen PCR-reaktiossa perustuu koettimeen, joka sitoutuu spesifisti kohdesekvenssiin. Koettimen 5'-päässä on fluoresoiva reportterileima ja 3'-päässä vaimennin. DNA-polymeraasin syntetisoidessa uutta DNA-juostetta monistettavaan DNA-juosteeseen sitoutunut koetin pilkkoutuu. Pilkkoutumisen seurauksena vaimennin

ei ole enää kytköksissä reportteriin ja reportteri alkaa fluoresoida. PCR-reaktion edessä kohde-DNA lisääntyy ja yhä useampi koetin sitoutuu DNA:han, pilkkoutuu ja fluoresoi. Tätä fluoresenssin lisääntymistä mitataan rRT-PCR -reaktiassa. Kohde-DNA:n puuttuessa koetin ei kykene kiinnittymään näytteeseen, vaan pysyy reaktiossa kokonaisuena, eikä aiheuta fluoresenssin syntyä. [Heid et al. 1996.]

Reaaliaikaisen PCR-reaktion kulkua seurataan monistumiskäyrän avulla, josta määritetään Ct-arvo (Cycle threshold), joka on syklien määrä, missä monistumiskäyrä ylittää määritetyn kynnysarvosuoran (*threshold line*). Kynnysarvo määritetään siten, että se sijoittuu eksponentiaalisen monistumisen alueelle monistumiskäyrälle ja rajaa pois mahdollisen taustafluoresenssin. Helpon kynnysarvon määrittäminen tapahtuu logaritmi- monistumiskäyrän avulla (kuva 3). Monistumista voidaan tarkkailla myös lineaarisen kuvaajan avulla (kuva 4). Ct-arvo on sitä korkeampi mitä vähemmän kohde-DNA:ta näyte sisältää. [Life Technologies. 2012.]



Kuva 3. Logaritminen kuvaaja reaaliaikaisessa PCR-reaktiassa tapahtuneesta monistumisesta. Eksponentiaalisen monistumisen alue on merkitty kaarisulkeella 1. Kynnysarvosuora, jonka avulla Ct-arvot määritetään. 2. Kynnysarvon alle jäävää epäspesifiä monistumista.



Kuva 4. Lineaarinen kuvaaja reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa tapahtuneesta monistumisesta.
1. Kynnysarvosuora, jonka avulla Ct-arvot määritetään.

PCR-reaktion tehokkuutta voidaan tutkia mittaamalla tunnetusta kohteesta tehty laimennossarja, jonka Ct-arvoista muodostetaan standardisuora. Suoran kulmakertoimen arvon ollessa välillä -3,6 ja -3,3 reaktiotehokkuus on 90 – 100 %. [Heid et al. 1996.]

2.5 Agarosigeelielektroforeesi

Perinteisen PCR-reaktion tulos todetaan silmämääräisesti siten, että PCR-tuotteet erotellaan kokonsa mukaan ajamalla niitä sähkövirran avulla agarosigeelissä. PCR-reaktiossa muodostuneet DNA-jaksot ovat negatiivisesti varautuneita ja ne liikkuvat sähkövirrassa kohti positiivisesti varautunutta napaa kokonsa mukaisessa järjestyksessä siten, että pienimmät tuotteet kulkeutuvat ensin. Geeli on upotettuna ajopuskuriin, jonka sisältämät ionit pitävät sähkövirran tasaisena. [Lee PY et al. 2012.]

Agarosigeeliin on lisätty UV-valossa fluoresoivaa etidumbromidia (EtBr) tai muuta väriainetta, kuten SYBR Green tai GelRed™, jotka sitoutuvat kaksijuosteiseen DNA:han. Näytteiden rinnalle geelillä ajetaan kokostandardia, jonka perusteella PCR-tuotteiden kooka voidaan arvioida ja verrata näytettä positiiviseen kontrolliin. PCR-tuote voidaan leikata irti geelistä ja puhdistaa DNA geelipalasta, jonka jälkeen voidaan jatkaa näytteen käsittelyä sekvensointia varten.

EtBr on mutageeni, jota käsitellessä tulee suojautua mahdolliselta ihokontaktilta sekä aineen höyrystymiseltä työskentelemällä vetokaapissa ja käyttämällä nitrilihansikkaita. EtBr on ongelmajätettä, mikä on otettava huomioon geelien hävityksessä. [VWR AM-RESCO® Life Science, Yhdysvallat, 2016.]

2.6 Sanger-sekvensointi

Dideoksisekvensoinnin eli Sanger-sekvensoinnin kehitti Frederick Sanger kollegojensa kanssa vuonna 1977. Tämä menetelmä toimi perustana kehitellyille nykyajan sekvensointiteknikoille. [Applied Biosystems, Yhdysvallat, 2009.] Nykyään on yleistymässä uuden sukupolven sekvensointimenetelmät (*next generation sequencing*, NGS), jotka ovat suorituskyvyltään ja nopeudeltaan kehittyneempiä.

Sekvensoinnilla tarkoitetaan kaksijuosteisen DNA:n emäsjärjestyksen selvittämistä. Yhteistä eri menetelmillä on fluoresoivien leimojen käyttäminen, joiden perusteella emäsjärjestys saadaan selville.

PCR-tuotteesta puhdistetaan ylimääräiset PCR-alukkeet ja epäpuhtaudet, kuten geelijäämät ja etidiumbromidi ennen syklistekvensointireaktiota. Puhdistaminen tapahtui tässä työssä kaupallisella QIAquick Gel Extraction -kitillä (Qiagen), jonka toiminta perustuu kolmeen eri vaiheeseen sitoutumiseen, pesuun ja eluointiin. Irta leikattu PCR-tuote liuotetaan ensin puskuriin, jonka korkea suolapitoisuus luo optimaaliset olosuhteet nukleihinappojen sitoutumiseen spinnauskolonin silikamembraaniin. Pesu tapahtuu etanolipitoisella pesupuskurilla. Puhdistettu näyte on kiinnittyneenä membraaniin, josta näyte irrotetaan eluointipuskurilla. Eluoinnin jälkeen puhdistettu näyte on valmis käytettäväksi syklistekvensointireaktioon.

Sangerin dideoksimenetelmässä keskeisenä osana on fluoresoivan leiman sisältävien dideoksinukleotidien (ddATP, ddGTP, ddCTP ja ddTTP) liittäminen juosteeseen syklistekvensoinnilla, jotka samalla pysäyttävät syntyvän DNA:n syntetisoimisen. Näin syklistekvensoinnissa syntyy erimittaisia DNA-fragmentteja, jotka erotellaan molekyylikoon perusteella kapillaarielektroforeesilla.

Kapillaarielektroforeesissa DNA-fragmentit saapuvat kokojärjestyksessä detektorille, jossa niihin suunnattu laservalo saa fluoresoivat leimat emittoimaan kunkin leiman tietyllä aallonpituudella. Sekvenssaattori kerää fluoresenssidatan ja muodostaa siitä elektroferogrammin, joka kertoo monistetun tuotteen nukleotidijärjestyksen eli sekvenssin.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 EAV reaaliaikainen RT-PCR

Menetelmän olosuhteiden suunnittelussa ja testaamisessa käytettiin hyväksi tietoja useasta eri lähteestä. OIE-manuaalissa mainitaan EAV rRT-PCR -menetelmän soveltuvuus diagnostiseen käyttöön [OIE-manuaali: Equine Viral Arteritis, 2013.]. PCR-reaktioseoksen (taulukko 2) koostumusta ja reaktio-olosuhteita (taulukko 1) muokattiin EU:n hevostautien referenssilaboratorion ohjeen [Anses, Ranska, 2011.] pohjalta. Menetelmässä käytettävät spesifiset alukkeet ja koetin on kuvattu tieteellisessä julkaisussa [Balasuriya et al., 2002.]

Taulukko 1. EU:n hevostautien referenssilaboratorion diagnostisen ohjeen mukaiset PCR-olosuhteet ajo-ohjelmaan

reaaliaikainen RT-PCR ohjelma		
+ 50 °C	20 min	1x
+ 95 °C	5 min	1x
+ 95 °C	15 s	45x
+ 60 °C	45 s	

Taulukko 2. Referenssilaboration PCR-reaktioseos

	Tilavuus per reaktio
H ₂ O	14,75 µl
Quantitect virus master mix 5 X	5 µl
Aluke-F 10 µM	1 µl
Aluke-R 10 µM	1 µl
Koetin 10 µM	0,5 µl
Quantitect virus RT mix	0,25 µl
RNA	2,5 µl
Quantitect virus -kitti (Qiagen)	

rRT-PCR menetelmällä tarkoituksena on monistaa EAV:n nukleokapsidiproteiinigeenistä (ORF7) 204 emäsparin mittaista aluetta. Alukkeiden ja koettimen sekvenssit olivat:

- aluke-F: EAVorf7-F: 5'-GGCGACAGCCTACAAGCTACA-3'
- aluke-R: EAVorf7-R: 5'-TCACTCACTGCAGATGCCG-3'
- koetin: EAVorf7-Pr: 5'-[FAM]TTGGTCAGATGCGGGTCCGCAA[BHQ1]-3'.

Koettimen sekvenssissä 5'-päässä [FAM] on reportteri ja 3'-päässä [BHQ1] vaimennin.

EAV rRT-PCR -menetelmän toimivuutta testattiin valmistamalla laimennossarjat Arvac- ja Bucyrus-viruskannoista välillä 10^{-1} - 10^{-7} . Taulukossa 3 on esitetty testaukseen käytetyt materiaalit. Käytettävään PCR-reaktioseokseen (taulukko 4) lisättiin referenssilaboration ohjeesta poiketen RNAasi-inhibiittoria estämään RNA-molekyylien hajoamista. rRT-PCR ajo-ohjelmassa käytettävät reaktio-olosuhteet on esitettyinä taulukossa 5. Ajo-ohjelmaan muokattiin käänteistranskriptiovaihe pidemmäksi komplementaarisen DNA-juosteen syntetisoinnin varmistamiseksi. Myös alkudenaturaatiovaihetta pidennettiin, jotta DNA-juosteet irtoavat varmuudella toisistaan ennen monistusreaktiota.

Taulukko 3. Menetelmän testaukseen käytettävät materiaalit. Soluviljelmissä kasvatetut viruskannat Arvac ja Bucyrus.

Menetelmän testaukseen näytemäärät	
Arvac	140 µl
Bucyrus	140 µl
Nukleaasivapaa vesi	630 µl

Taulukko 4. Menetelmän testauksen PCR-reaktioseos

Reagenssi	Lähtökonsentraatio	Lopullinen konsentraatio	1x Mastermix (µl)
2x QuantiFast Probe RT-PCR Master Mix	2x	1x	12,5
Aluke: EAVorf7-F	10 µM	400 nM	1,0
Aluke: EAVorf7-R	10 µM	400 nM	1,0
Koetin: EAVorf7-Pr	10 µM	200 nM	0,5
QuantiFast RT Mix			0,3
RNase inhibiittori	20 U/µl	0,16 U/µL	0,2
H ₂ O (Sigma)			4,5
Templaatti-RNA			5,0
		Tilavuus / reaktio	25 µl

Taulukko 5. Real Time RT-PCR EAV - ajo-ohjelma

Real Time RT-PCR EAV			
Vaihe	Lämpötila	Aika	Sykliden lukumäärä
Käänteistranskriptio	+ 50 °C	30 min	1
2-juosteisen DNA:n	+ 95 °C	15 min	1
Denaturaatio	+ 95 °C	15 s	39x
Ekstensio*	+ 60 °C	45 s	
Loppu/Jäähdytys	-/+ 10 °C	-/18 h	
*fluoresenssin mittausta			

3.2 Validoinnissa käytetty materiaali

Validointiin tarvittiin suuri määrä näytteitä, joita varten tarvittava materiaali (taulukko 6) valmistettiin käyttöä varten. Käytettävien matriisien tuli olla EAV-negatiivisia, minkä varmistamiseksi ne ensin testattiin perinteisellä RT-PCR-menetelmällä. Perinteisen EAV RT-PCR-menetelmän alukesekvenssit ja reaktio-olosuhteet ovat julkaisusta Belák et al. 2014.

Taulukko 6. Validointiin tarvittava näytemateriaali.

Validoinnin näytemateriaalit	
Matriisi	Määrä
Solukasvatuselatusaine	12,74 ml
Elinsuspensio	12,74 ml
Sperma	12,74 ml
Sierainlima	12,74 ml
Jälkeiset	12,74 ml
Virus	Määrä
Arvac	500 µl
Bucyrus	400 µl

Validoinnissa tutkitut näytteet, eli laimennossarjat eri matriiseissa molemmille viruskannoille, vertailumittaustenäytteet sekä muut virukset on kuvattu taulukossa 7. Matriiseiksi valittiin yleisimmät näytemateriaalit hevosen EAV-tutkimuksista eli sierainlima, sperma ja elimet kuten maksa ja perna. Viruskannoista valmistettiin 10^{-1} - 10^{-7} laimennossarjat eri matriiseihin. Laimennossarjat valmistettiin kymmenkertaisina laimennoksina, jossa ensimmäinen laimennos sisälsi 0,1 ml:ä kasvatettua virusta ja 0,9 ml:ä matriisia. Seuraa-

vissa laimennoksissa käytettiin 0,1 ml:ä aiempaa laimennosta ja 0,9 ml:ä matriisia. Laimennoksia jatkettiin samalla tavalla laimennossarjan loppuun asti siten, että jokaisesta matriisista saatiin seitsemän laimennosta kahdella eri viruskannalla. Yhteensä laimennossarjoja valmistettiin validointiin viisi kappaletta sierainlimasta, spermasta, elinsuspensiosta ja solukasvatuselatusaineesta. Lisäksi valmistettiin yksi laimennossarja jälkeisistä, jonka tarkoituksena oli testata sen soveltuvuus mittauksiin.

Vuoden 2009 vertailumittausnäytteistä neljä olivat negatiivisiksi todettuja orin siemennesteitä, kaksi positiivista näytettä luonnollisesti infektoituneesta orista ja seitsemän siemennestenäytettä, joihin oli lisätty arteriittivirusta laimennoksilla 10^{-2} - 10^{-6} . Vuoden 2013 vertailumittausnäytteistä seitsemän oli negatiivisia hevosen siemennesteitä ja 13 siemennestenäytettä, joihin oli lisätty kolmea eri arteriittiviruskantaa. Vuoden 2016 vertailumittausnäytteistä negatiivisia ja positiivisia siemennestenäytteitä oli kumpiakin kymmenen. Vertailumittausnäytteiden avulla laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys sekä tarkkuus.

EAV rRT-PCR-menetelmän spesifisyyttä testattiin myös muilla hevosilla tautia aiheuttavilla viruksilla (hevosen herpesvirus (EHV), West Nile virus (WNV) sekä hevosen näivetystaudin (EIAV) aiheuttajalla).

Taulukko 7. Validointinäytteet

Näytteet validointia varten	
Arvac 10⁻¹-10⁻⁷ -laimennossarjat	
Solukasvatuselatusaine	7 näytettä / sarja
Elinsuspensio	7 näytettä / sarja
Sperma	7 näytettä / sarja
Sierainlima	7 näytettä / sarja
Jälkeiset	7 näytettä / sarja
Bucyrus 10⁻¹-10⁻⁷ -laimennossarjat	
Solukasvatuselatusaine	7 näytettä / sarja
Elinsuspensio	7 näytettä / sarja
Sperma	7 näytettä / sarja
Sierainlima	7 näytettä /sarja
Vertailumittausnäytteet	
Vuosi 2009	13 kpl
Vuosi 2013	20 kpl
Vuosi 2016	20 kpl
Muut virukset	
EIAV	1 kpl
EHV	1 kpl
WNV	1 kpl
WNV-vertailumittausnäytteet	15 kpl

3.3 Näytteiden esikäsittely

Elimet homogenisoitiin ennen RNA-eristystä. Saapuneesta elimestä otettiin 0,5 – 1 g steriiliin 10 ml:n putkeen, johon lisättiin Hanks'-elatusainetta siten, että muodostui 10 % suspensio. Näyte hienonnettiin tasaiseksi steriilillä poralla, jonka jälkeen näytettä sentrifugoitiin 30 min +4 °C:ssa 2500 kierrosta/minuutti. Supernatantti siirrettiin steriiliin korkilliseen muoviputkeen, johon lisättiin 10 %:a tilavuudesta streptomysiini-penisilliini-liuosta (PS-liuosta).

Sierainlimanäyte otettiin hevosen sieraimesta pumpulipuikolla, jonka jälkeen se suljettiin steriiliin säilytysputkeen. Tikku liuotettiin 2 ml:ssä elatusainetta jäällä 1-2 tuntia. Seisotuksen jälkeen putkea sekoitettiin huolellisesti ja pumpulipuikko puristeltiin mahdollisimman kuivaksi steriileillä pinseteillä. Liuos sentrifugoitiin 10 min + 4 °C:ssa 2500 kierrosta/minuutti, jotta saatiin ylimääräinen materiaali sedimentoitua näytteestä pois. Fuugauksen

jälkeen supernatantti siirrettiin steriiliin korkilliseen muoviputkeen, johon lisättiin 10 % näytetilavuudesta PS-liuosta.

Spermanäyte sentrifugoitiin +4 °C:ssa 30 minuuttia 2500 kierrosta/minuutti. Supernatantti siirrettiin steriiliin korkilliseen muoviputkeen, johon lisättiin 10 % näytetilavuudesta PS-liuosta.

3.4 Laitteet ja reagenssit

Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit on kuvattu taulukossa 8.

Taulukko 8. Reagenssit ja laitteet taulukoituna käyttötarkoituksen mukaisesti.

RNA-eristys	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
QIAcube	DNA-/RNA-eristyslaite	QIAGEN	-
QIAamp® Viral RNA Mini QIAcube Kit (240)	Reagenssit RNA-eristykseen	QIAGEN	52926
PCR-laitteet ja sentrifuugi	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Real-Time ajo-laite	Bio-Rad	-
PTC-100™ Programmable Thermal Controller	PCR -ajolaite	Bio-Rad	-
PTC-200™ Peltier Thermal Cycler	PCR -ajolaite	Bio-Rad	-
Eppendorf Centrifuge 5810	96-levyn fuugaus	Bio-Rad	-
PCR-reaktio seos:	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
EAVorf7-F (100 µM, 123 µg, TM:61,8)	Forward-aluke	Oligomer	160226RT1F01
EAVorf7-R (100 µM, 203 µg, TM: 58,8)	Reverse-aluke	Oligomer	160226RT1B02
EAVorf7-Pr (100 µM, 166 µg, TM:64,0)	Koetin	Oligomer	160229F2A06
Rnase Inhibitor (20 U/µl)	Reaktion RNAasi-inhibiittori	AB	100021540
Probe RT-PCR Kit	PCR-kitti	QuantiFast®	204454

Geelielektroforeesiajo ja kuvantaminen:	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
Power Pac Universal™	Geeliajon virtalähde	Bio-Rad	-
Electronic Balance FY-2000	vaaka	A&D Weighing	-
Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software	Geelinkuvauslaite	Bio-Rad	-
NuSieve™ 3:1 Agarose	agaroosijauhe geeliä varten	Lonza	50094
1x TBE-puskuri	ajopuskuri	elatusainelaboratoriosta tilaus	-
Ethidium Bromide (EtBr)	Etidiumbromidi	Amresco	E406-5ml
100 bp DNA Ladder	DNA-kokostandardi	Invitrogen™	15628
Gel loading solution	Näytepuskuri	Sigma-Aldrich	G2526-5ml
Sekvensointi:	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
PTC-100™ Peltier Thermal Cycler	PCR -ajolaite	Bio-Rad	-
ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer	Sekvensointilaite	Applied Biosystems™	-
Vortex Genie 2	sekoittaja	Scientific Industries	-
Zentrifugen Mikro 185	eppendorf fuugi	Hettich	-
TB1Thermoblock	lämpöblokki	Biometra®	-
QIAquick® Gel extraction kit	Geelieristys kitti	QIAGEN	28706
DyeEx® 2.0 SpinKit	tuotteen puhdistaminen	QIAGEN	63206
BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	Syklisekvensointireaktion kitti	Applied Biosystems™	4336774
Viruksen kasvatus:	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
MEM (1x), Minimum Essential Medium	elatusaineen reagenssi	gibco® by life technologies™	21090-022
FBS, Fetal Bovine Serum	elatusaineen reagenssi	gibco® by life technologies™	10270-106
L-Glutamine 200 mM (100x)	elatusaineen reagenssi	gibco® by life technologies™	25030-024
MEM NEAA (100x)	elatusaineen reagenssi	gibco® by life technologies™	11140-035
PS-liuos	elatusaineen reagenssi	elatusainelaboratoriosta tilaus	-
RK-13 (rabbit kidney) CCL37, 165 p.	solulinja	solulaboratoriosta tilaus	-

3.5 Viruksen kasvatus soluviljelmissä

EAV:n kasvatukseen soveltuva solulinja on kaniinin (*Oryctolagus cuniculus*) munuaiskudoksesta eristettyjä epiteelisoluja eli RK-13 soluja. Solut viljeltiin +37 °C:ssä. Kasvatukseen käytetty elatusaine koostui 100 ml:stä MEM:iä (Minium Essential Medium), 10 ml:stä FBS:ää (Fetal bovine serum), 1 ml:stä L-glutamiinia, 1 ml:stä MEM NEAA (MEM Non-Essential Amino Acids) (reagenssien valmistaja Gibco®, alkuperämaa Iso-Britannia poikkeuksena FBS:n alkuperämaa Etelä-Amerikka). Elatusaineeseen lisättiin myös 2 ml:ä PS-liuosta (valmistaja Eviran elatusainelaboratorio).

3.6 Virusmäärän määrittäminen titraatiomenettelyllä

Arvac- ja Bucyrus-viruskantojen virusmäärän määrittäminen titraatiomenettelyllä suoritettiin tekemällä viruskasvatuksista 10^{-1} - 10^{-8} -laimennossarjat omille levyilleen. Laimennokset tehtiin samaan elatusaineeseen kuin virusten kasvatus. Laimennossarjat 10^{-1} - 10^{-8} tehtiin kymmenkertaisina (1:10) laimennoksina, jossa ensimmäinen laimennos oli 0,1 ml laimentamatonta virusta ja 0,9 ml elatusainetta. Seuraavissa laimennoksissa käytettiin aiempaa laimennosta 0,1 ml ja 0,9 ml elatusainetta. Laimennoksia jatkettiin samalla tavalla laimennossarjan loppuun siten, että saatiin kahdeksan laimennosta virusta kohden. Ennen levyille siirtoa kaikkiin käytettäviin kuoppiin lisättiin 50 µl elatusainetta ja kontrollikuoppiin 100 µl elatusainetta. Laimennoksia lisättiin levyille 50 µl neljänä rinnakkaisena vierekkäin. Tämän jälkeen levyjä inkuboitiin yksi tunti +37 °C:ssa, jonka jälkeen kaikkiin kuoppiin lisättiin 150 µl RK-13 soluja. Lopuksi levyt siirrettiin inkuboitumaan +37°C:een kolmeksi vuorokaudeksi.

3.7 Sekvensointi

Validoitavan PCR-menetelmän spesifisyys tarkistettiin sekvensoimalla, jotta voitiin varmistua siitä, että menetelmä monistaa haluttua aluetta EAV-viruksen genomista. rRT-PCR-ajon jälkeen näyte ajettiin agarosigeelille, josta PCR-tuote leikattiin irti UV-valossa steriiliin eppendorf-putkeen. PCR-tuote puhdistettiin sitoutumattomista alukkeista QIAquick Gel Extraction -kitillä (Qiagen, USA). PCR-tuotteesta valmistettiin kaksi syklistekvensointireaktiota, yksi molemmilla PCR-alukkeilla. Reaktion templaattina käytettiin puhdistettua PCR-tuotetta. Syklistekvensointireaktiota varten tehtävä reaktioseos on kuvattu

taulukossa 9. Näytteet ajettiin PCR-laitteella taulukossa 10 olevalla syklistekvensointiohjelman mukaisesti.

Syklisekvensointituotteet puhdistettiin sitoutumattomista alukkeista ja dideoksinukleotideista DyeEx-pylväillä (Qiagen, USA). Puhdistuksen jälkeen 10 µl jokaisesta tuotteesta ajettiin ABI 3130 -kapillaarisekvensaattorilla (Applied Biosystems). Sekvensointiajossa käytettiin 50 cm kapillaaria ja POP7-polymeerimatriisia (Applied Biosystems).

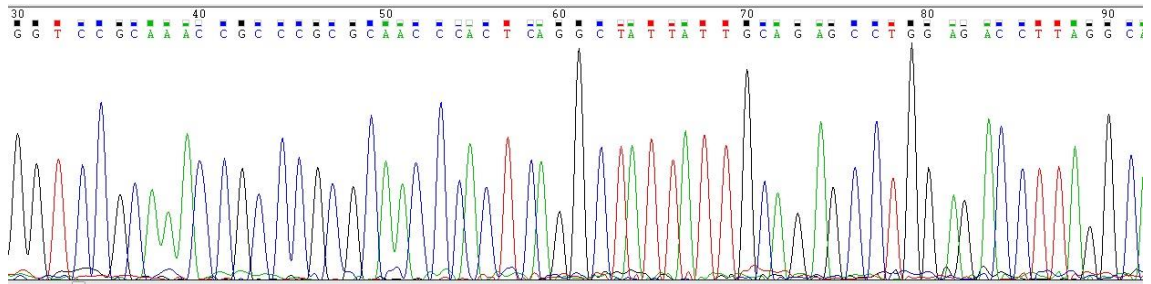
Taulukko 9. Syklisekvensointi reaktioon tarvittava reaktioseos

Syklisekvensointireaktioseos	
Reagenssi	Määrä
BigDye Terminator Ready Reaction Mix v1.1	2 µl
BigDye Terminator v1.1 5x sekvensointipuskuri	3 µl
Aluke 1 µM (F tai R)	3,2 µl
Vesi	6,8 µl
Näyte	5 µl

Taulukko 10. Syklisekvensoinnin ajo-ohjelma

Syklisekvensointiohjelma			
Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien lukumäärä
Alkudenaturaatio	+ 95 °C	4 min	1
Denaturaatio	+ 96 °C	30 s	30x
Annealing	+ 50 °C	30 s	
Ekstensio	+ 60 °C	4 min	
Loppujäähdytys	+ 4 °C	18 h	1

Sekvensoimalla varmistettiin monistaako rRT-PCR – menetelmä oikeaa kohtaa viruksen genomista. Elektroferogrammista (kuva 5) nähdään sekvensoinnin tulos ja sen luotettavuus. Eri nukleotidit (A, T, G, C) esitetään erivärisinä piikkeinä elektroferogrammissa, Onnistuneen sekvensointireaktion elektroferogrammissa piikit ovat selkeitä, eikä kuvajasssa ole nähtävissä piikkien tulkitsemista häiritsevää taustaa. Päällekkäisestä signaalista eli nukleotidikohdasta, jonka suhteen sekvensoitavassa näytteessä on useampia kuin yhdenlaisia DNA-juosteita käytetään kansainvälisen IUPAC:n (International Union of Pure and Applied Chemistry) nukleotidikoodeja (taulukko 11).



Kuva 5. Esimerkkielektroferogrammi. Eri nukleotidit on kuvattu eri värisillä piikeillä.

Taulukko 11. Nukleotidikoodit taulukoituna. [04.09.2016 muokattu lähteestä: INSDC, 2003.]

Nukleotidikoodi	Emäs
A	A, adeniini
C	C, sytosiini
G	G, guaniini
T	T, tymiini (tai U, urasiili)
M	A tai C
R	A tai G
W	A tai T
S	C tai G
Y	C tai T
K	G tai T
V	A, C tai G
H	A, C tai T
D	A, G tai T
B	C, G tai T
N	A, C, G tai T

Sekvensoinnilla saatua sekvenssidataa voidaan tarkastella vertaamalla sitä sekvenssi-tietokantoihin. Tässä työssä käytettiin NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -hakua, joka on yksi eniten käytetyistä tietokannasta. [NCBI BLAST, verkkotyökalu.]

3.8 Validoinnin parametrit

Validointia varten kasvatettiin hevosen arteriittiviruskantoja Arvacia ja Bucyrusta RK-13-soluissa. Virusmäärä määritettiin titraamalla viruskasvatus samalla kertaa, kun valmistettiin validoinnissa käytetyt laimennossarjat. Näin varmistuttiin siitä, että titraukseen ja laimennossarjoihin käytettävä virusmäärä oli keskenään vertailukelpoinen.

3.8.1 Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus

Vertailumittausnäytteistä laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus laskentataulukon avulla (taulukko 12). Sensitiivisyyttä määrittäessä verrataan validoitavalla menetelmällä saatuja positiivisia tuloksia tunnettuihin positiivisiin tuloksiin ja näin saadaan selville mahdolliset virhenegatiiviset. Spesifisyyttä määrittäessä verrattiin validoitavalla menetelmällä saatuja negatiivisia tuloksia tunnettuihin negatiivisiin tuloksiin ja näin saadaan selville mahdolliset virhepositiiviset. Spesifisyys kuvaa menetelmän kykyä tunnistaa monistettavaa kohdetta. Jos spesifisyys on huono, menetelmä tunnistaa tutkittavan kohteen lisäksi muitakin. Tarkkuudella tutkitaan, onko validoitavalla menetelmällä saaduilla tuloksilla ja tunnetuilla tuloksilla eroavaisuuksia. [OIE-manuaali: Principles and methods of validation diagnostic assays for infectious diseases, 2013.]

Taulukko 12. Laskentataulukko, jolla lasketaan sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus

	Referenssimenetelmän tulos / saatu tulos		Kirjaimen selitys
	+	-	
Validoitavan menetelmän tulos / odotettu tulos			a = näytteiden lkm., jotka ovat pos. molemmilla menetelmillä b = näytteiden lkm., jotka ovat pos. validoitavalla menetelmällä, mutta neg. referenssimenetelmällä. c = näytteiden lkm., jotka ovat neg. validoitavalla menetelmällä, mutta pos. referenssimenetelmällä. d = näytteiden lkm., jotka ovat neg. molemmilla menetelmillä
+	a	b	
-	c	d	
Sensitiivisyys SE = $a/(a+c) * 100 \%$			
Spesifisyys SP = $d/(b+d) * 100 \%$			
Tarkkuus AC = $(a + d)/(a+b+c+d) * 100 \%$			

3.8.2 Uusittavuus ja toistettavuus

Toistettavuudella tarkasteltiin identtisten näytteiden antamaa tulosta peräkkäisillä toistoilla. Tällä saatiin selville, ovatko tulokset riippuvaisia suorituskerrasta. Uusittavuudessa tarkasteltiin poikkeavuuksia tuloksista eri henkilöiden välillä. Uusittavuutta ja toistettavuutta tutkittiin Ct-arvoista lasketun variaatiokertoimen (Kuva 6) avulla.

$$\text{Keskiarvo, } \mu = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Otoshajonta, } \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \mu)^2}{n - 1}}$$

$$\text{Variaatiokerroin, } CV = \frac{\text{Otoshajonta, } \sigma}{\text{Keskiarvo, } \mu}$$

Kuva 6. Laskukaavat keskiarvon, otoshajonnan ja variaatiokertoimen laskemiseksi

4 Tulokset

4.1 PCR-menetelmän optimointi

Menetelmän alukkeet ja koetin todettiin toimiviksi Arvac- ja Bucyrus-viruskannoista valmistettujen laimennossarjojen avulla. PCR-reaktioseoksen koostumusta muunneltiin templaatti-RNA:n, alukkeiden ja koettimen konsentraatioita (taulukko 13).

Ensimmäisessä testissä nostettiin sekä alukkeen, että koettimen konsentraatiota; määrittävää muutosta ei havaittu. Toiseen testiin laskettiin templaatti-RNA:n määrää 2,5 µl:aan 5 µl:sta, jonka todettiin heikentävän tulosta eli nostavan Ct-arvoa alkuperäiseen verrattuna. Eri aluke- ja koetinpitoisuuksia testattiin testeillä 3-8 (taulukko 13) mittaamalla Arvac-laimennoksia 10^{-3} - 10^{-7} kahtena rinnakkaisena näytteenä. Testeissä 3-8 havaittiin koettimen määrän nostamisen parantavan tulosta eli Ct-arvojen pienenivät testeissä 4. Testissä 9 testattiin korkeampaa koettimen konsentraatiota. PCR-reaktioseoksen muutoksissa päädyttiin koettimen konsentraatioon 250 nM ja alukkeiden konsentraatioihin 400 nM, jotka on muokattu validoinnissa käytettävään PCR-reaktioseokseen taulukossa 14.

Taulukko 13. Konsentraatioiden muutokset PCR-reaktion optimoinnissa

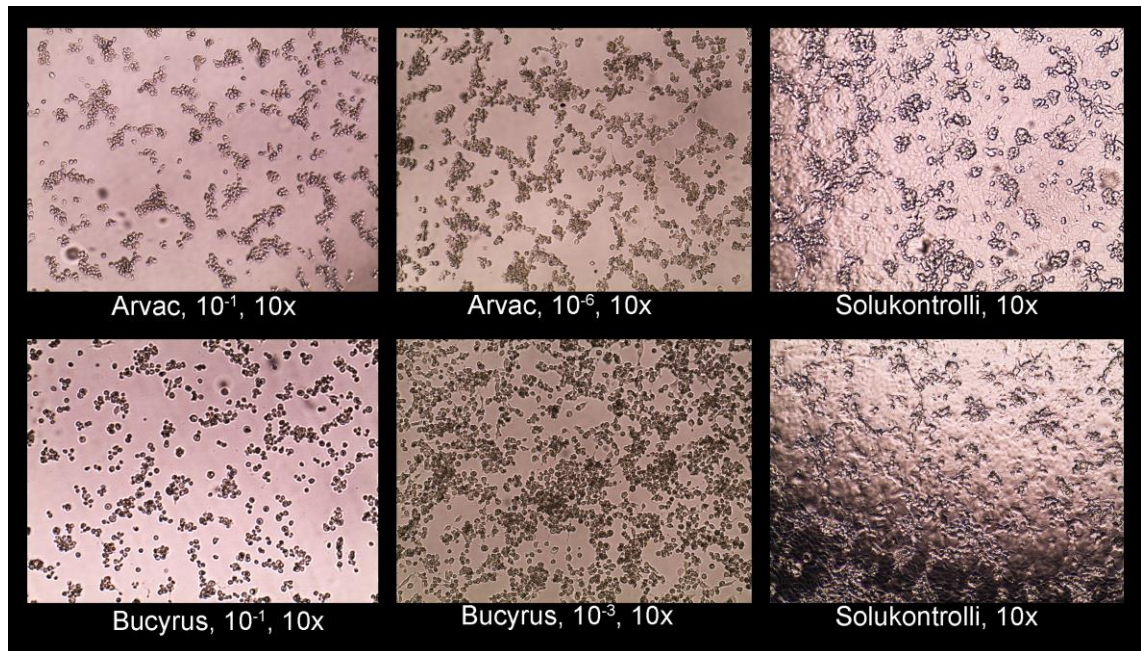
Testi #	Reagenssi	Konsentraatio	1x Mastermix (μl)
1	Aluke (F & R)	600 nM	1,5
	Koetin	300 nM	0,75
	H ₂ O	-	3,25
2	Templaatti RNA	-	2,5
	H ₂ O	-	7,0
3	Aluke (F & R)	400 nM	1,0
	Koetin	200 nM	0,5
	H ₂ O	-	4,5
4	Aluke (F & R)	400 nM	1,0
	Koetin	250 nM	0,625
	H ₂ O	-	4,375
5	Aluke (F & R)	500 nM	1,25
	Koetin	200 nM	0,5
	H ₂ O	-	4,0
6	Aluke (F & R)	500 nM	1,25
	Koetin	250 nM	0,625
	H ₂ O	-	3,875
7	Aluke (F & R)	300 nM	0,75
	Koetin	200 nM	0,5
	H ₂ O	-	5,0
8	Aluke (F & R)	300 nM	0,75
	Koetin	250 nM	0,625
	H ₂ O	-	4,875
9	Aluke (F & R)	400 nM	1,0
	Koetin	300 nM	0,625
	H ₂ O	-	4,25

Taulukko 14. PCR-reaktioseos, jota käytetään validoinnissa

Reagenssi	Lähtökonsentraatio	Lopullinen konsentraatio	1x Mastermix (µl)
2x QuantiFast Probe RT-PCR Master Mix	2x	1x	12,5
Aluke: EAVorf7-F	10 µM	400 nM	1,0
Aluke: EAVorf7-R	10 µM	400 nM	1,0
Koetin: EAVorf7-Pr	10 µM	250 nM	0,625
QuantiFast RT Mix			0,3
RNase inhibiittori	20 U/µl	0,16 U/µL	0,2
H ₂ O (Sigma)			4,375
Templaatti-RNA			5,0
		Tilavuus / reaktio	25 µl

4.2 Titrauksen tulokset

Virusmäärä laskettiin kolmen päivän jälkeen solujen infektoimisesta. Kuvassa 7 havainnollistetaan viruksen aiheuttamia soluvaurioita eri viruslaimennoksilla. Virusinfektio aiheuttaa solujen rakenteellisia muutoksia ja solukuolemaa, mikä havaitaan muun muassa solujen pyöristymisenä ja solumaton reikiintymisenä.



Kuva 7. Viruskantojen Arvac & Bucyrus kasvatus RK-13 soluissa, 10x suurennus

Taulukossa 15 on esitetty eri laimennoksissa havaittu solutuho. Arvac-viruskanta on huomattavasti vahvempaa kuin Bucyrus-viruskanta. TCID₅₀/ml arvoksi saatiin Arvacille $2,0 \cdot 10^8$ ja Bucyrukselle $3,6 \cdot 10^5$.

Taulukko 15. Titrauksen tulokset luettuna, O = ei solutuhoa, + = solutuhoa havaittavissa

Inf. 10.5.16 Luku 13.5.16	Arvac					Kontrolli	Bucyrus					Kontrolli
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 ⁻⁸	A	O	O	O	O		O	O	O	O		
10 ⁻⁷	B	O	O	+	+		O	O	O	O		
10 ⁻⁶	C	+	+	+	+		O	O	O	O		
10 ⁻⁵	D	+	+	+	+		O	O	O	O		
10 ⁻⁴	E	+	+	+	+		O	+	+	+		
10 ⁻³	F	+	+	+	+		+	+	+	+		
10 ⁻²	G	+	+	+	+		+	+	+	+		
10 ⁻¹	H	+	+	+	+		+	+	+	+		

4.3 Sekvensointi

Arvac- ja Bucyrus-näytteistä saatiin selkeät 204 emäksen mittaiset sekvenssit (kuva 8). BLAST-hausta saatiin lukuisia 100 %:n rinnastuksia tietokannassa oleviin hevosen arteriiviruksen genomisekvensseihin nukleokapsidiproteiinigeenin (ORF7) alueelle (kuva 9). Tämän perusteella todettiin rRT-PCR-menetelmän monistavan oikeaa kohtaa EAV:n genomista.

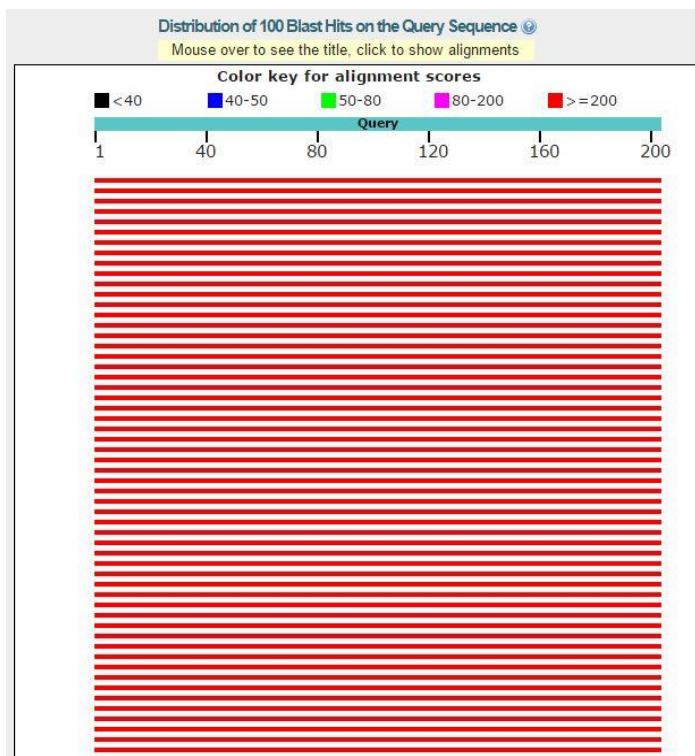
```

      *           20           *           40           *           60           *           80
Arvac  : GGGCAGCCTACAAGCTACAATGACCTACTGCGCATGTTGGTCAGATGCGGGTCCGCAAACCGCCCGCGCAACCCACT : 80
Bucyrus : GGGCAGCCTACAAGCTACAATGACCTACTGCGCATGTTGGTCAGATGCGGGTCCGCAAACCGCCCGCGCAACCCACT : 80
        GGGCAGCCTACAAGCTACAATGACCTACTGCGCATGTTGGTCAGATGCGGGTCCGCAAACCGCCCGCGCAACCCACT

      *           100          *           120          *           140          *           160
Arvac  : CAGGCTATCATTGCAGAGCCTGGAGACCTTAGGCATGATTTAAATCAACAGGAGCGCGCCACCCTTTCGTGGAACGTACA : 160
Bucyrus : CAGGCTATCATTGCAGAGCCTGGAGACCTTAGGCATGATTTAAATCAACAGGAGCGCGCCACCCTTTCGTGGAACGTACA : 160
        CAGGCTATCATTGCAGAGCCTGGAGACCTTAGGCATGATTTAAATCAACAGGAGCGCGCCACCCTTTCGTGGAACGTACA

      *           180          *           200
Arvac  : ACGGTTCTTCATGATTGGGCATGGTTCACCTCACTGCAGATGCCG : 204
Bucyrus : ACGGTTCTTCATGATTGGGCATGGTTCACCTCACTGCAGATGCCG : 204
        ACGGTTCTTCATGATTGGGCATGGTTCACCTCACTGCAGATGCCG
  
```

Kuva 8. EAV-kannat Arvac ja Bucyrus linjattuna ja niistä muodostettu konsensussekvenssi. Sekvenssien välillä olevat nukleotidierot näkyvät harmaalla ja valkoisella pohjalla.



Kuva 9. Rinnastus tietokannan sekvenssejä vastaan. Rinnastusten vastaavuus on 100 %. Punainen viiva = tietokannan sekvenssi.

4.4 Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys, tarkkuus

Menetelmällä mitatut 53 vertailumittausnäytettä vuosilta 2009, 2013 ja 2016 (taulukko 16) todettiin kaikki oikein EAV-positiivisiksi tai -negatiivisiksi. Näiden perusteella sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus ovat erinomaiset.

Taulukko 16. Vuosien 2009, 2013 ja 2016 vertailumittausnäytteiden laskentataulukko

2016 vertailumittausnäytteet	Referenssimenetelmän tulos / saatu tulos	
Validoitavan menetelmän tulos / odotettu tulos	+	-
+	32	0
-	0	21
Sensitiivisyys (%)	100	
Spesifisyys (%)	100	
Tarkkuus (%)	100	

Menetelmä ei monistanut hevosen herpesvirusta (EHV) tai hevosen näivetystautivirusta (EIAV). West Nile virus (WNV) aiheutti epäspesifiä fluoresenssin muodostumista ensimmäisellä testauskerralla. Syntyneessä monistumiskuvaajassa ei havaittu selkeää eksponentiaalisen monistumisen vaihetta, mutta fluoresenssin kynnsarvo kuitenkin ylittyi. Menetelmällä tehtiin lisätutkimuksia WNV-vertailumittausnäytteistä, jotka sisälsivät useita WNV-positiivisia näytteitä. Menetelmä antoi negatiivisen tuloksen kaikista WNV-vertailumittausnäytteistä, eikä epäspesifiä fluoresenssin muodostumista havaittu uudelleen. Tulosten perusteella menetelmän selektiivisyys on hyvä, menetelmä monistaa ai-noastaan EAV:ta.

4.5 Menetelmän uusittavuus ja toistettavuus

Laimennossarjoista suoritettiin mittaukset siten, että näytteet mitattiin yhden testajan suorittamana kolmena rinnakkaisena, sekä kahden muun testajan suorittamana kahdena rinnakkaisena reaktiona. Arvac-viruskanta todettiin 10^{-1} – 10^{-6} laimennoksilla kaikista matriiseista. Bucyrus-viruskanta todettiin 10^{-1} – 10^{-4} laimennoksilla solukasvatus-, elinsuspensio- ja sierainlimamatriiseista, sekä 10^{-1} – 10^{-5} -laimennoksilla siemennestematriisista. Saaduista tuloksista on laskettu CV-arvot taulukossa 17 ja 18.

Toistettavuus määritettiin laskemalla variaatiokerroin yhden testajan rinnakkaisista näytteistä saamista Ct-arvoista. Variaatiokerroin oli Arvac-viruskannalla 0,13 – 3,06 % (taulukko 17) ja Bucyrus-viruskannalla 0,38 – 7,08 % (taulukko 18). Uusittavuus määritettiin kolmen testajan saamista Ct-arvoista lasketulla variaatiokertoimella, joka oli Arvac-viruskannalla 0,64 – 5,95 % (taulukko 17) ja Bucyrus-viruskannalla 0,82 – 4,81 % (taulukko 18).

Arvac-viruskannan 10^{-6} laimennosten Ct-arvot vaihtelivat välillä 31,77 – 39,48. Bucyrus-viruskannan 10^{-4} ja 10^{-5} laimennosten Ct-arvot vaihtelivat välillä 30,07 – 38,75. Ct-arvo 35 toimii raja-arvona diagnostiikassa, jonka ylittävää tulosta pidetään epäilyttävänä. Menetelmä soveltuu kaikille testatuille matriiseille. Uusittavuuden ja toistettavuuden perusteella tulokset eivät ole riippuvaisia tekijästä tai suorituskerrasta.

5 Loppuyhteenvedo/päätelmät

Opinnäytetyössä suoritettiin EAV rRT-PCR-menetelmän käyttöönotto ja validointi. Saatujen tulosten perusteella menetelmä soveltuu EAV:n toteamiseen sierainlimasta, spermasta, elinsuspensiosta sekä soluviljelyyn käytettävästä elatusaineesta. Menetelmällä saadut tulokset eivät myöskään ole riippuvaisia tekijästä tai suorituskerrasta. Menetelmän sensitiivisyys, spesifisyys ja tarkkuus todettiin erinomaisiksi vertailumittausnäytteiden avulla. Menetelmän selektiivisyys on hyvä: menetelmä ei monista muita hevosen viruksia kuin EAV:ta.

Validoinnissa saatujen tulosten perusteella määritettiin, että menetelmällä saatu tulos on negatiivinen, kun Ct-arvo on yli 35, eikä eksponentiaalista monistumista ei ole havaittavissa. Tulos on positiivinen, jos Ct-arvo on alle 35 ja monistuminen on eksponentiaalista. Tulos on epäilyttävä, jos Ct-arvo on yli 35 ja monistuminen on eksponentiaalista. Kaikki positiiviset ja epäilyttävät tulokset varmistetaan joko uusimalla testi tai testaamalla toisella PCR-menetelmällä. Tuloksen varmistaminen on mahdollista myös sekvensoimalla saatu PCR-tuote. Testissä on aina mukana positiivinen ja negatiivinen kontrolli, jotka varmistavat jokaisen mittauksen toimivuuden. Testi voidaan hyväksyä ainoastaan, kun molemmat kontrollit antavat odotetun tuloksen.

Menetelmästä tulee ensisijainen EAV:n toteamiseen käytettävä menetelmä Eviran eläintautivirologian tutkimusyksikössä (VIRT) ja se syrjäyttää aikaisemmin käytössä olleen perinteisen RT-PCR-menetelmän. Menetelmä liitetään tämän validoinnin perusteella VIRT:n FINAS-akkreditoituihin PCR-menetelmiin. Menetelmän laatua ja luotettavuutta ylläpidetään osallistumalla EURL:n säännöllisesti järjestämiin vertailumittauksiin. Menetelmää tullaan käyttämään taudinsyynselvityksissä, tautiseurannan toteuttamisessa sekä tautivapautta osoittaessa.

Lähteet

Andrew MQK, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, 2011, Virus Taxonomy: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of viruses, s. 796-805, ISBN: 978-0-12-384684-6

Anses, European Union Reference Laboratory for equine diseases, Ranska, 2011, Polymerase chain reaction for EAV and EHV diagnostic

Applied Biosystems, Yhdysvallat, 2009, Chemistry Guide, DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, 2nd Edition

Balasuriya UBR, Leutenegger CM, Topol JB, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ, 2002, Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay, Journal of Virological Methods

Belák S, Ballagi-Pordány A, Timoney PJ, McCollum WH, Little TV, Hyllseth B, Klingeborn B, 1994, Evaluation of a nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus, Luentokokokoomassa: The Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, Japan, s. 33-38.

Brian WJ, Hillar O, 1996, Virology Methods Manual, s. 374, ISBN:978-0-12-465330-6

Evira, Virusarteriitti, 2016, Virusarteriitti, Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/hevoset/virusarteriitti/>>. Luettu 2.9.2016.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996, Real Time Quantitative PCR, Genome Methods, s. 987-993, Verkkodokumentti. <<http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.full.pdf>>

INSDC, 2003, 04.09.2016 muokattu lähteestä: The DDBJ/ENA/GenBank Feature Table Definition, Nucleotide base codes (IUPAC), Verkkodokumentti. <http://www.insdc.org/documents/feature_table.html#7.5>.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N, 2006, The real-time polymerase chain reaction, Verkkodokumentti. <<http://www.gene-quantification.de/kubista-qpcr-review-mam-2006.pdf>> Luettu 9.9.2016.

Landers JP, Oda RP, Mazzeo JR, Guttman A, Wehr T, Zhu M, Levi V, Dittman MM, Rozing GP, Jones WR, Altria KD, Chakel J, Hancock W, Pritchett T, Robey FA; Olechno JD, Nolan JA, Ulfelder KJ, McCord BR, 1997, Handbook Of Capillary Electrophoresis, 2nd Edition

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH, 2012 Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments, PubMed Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546956>> Luettu 28.08.2016.

Life Technologies, 2012, Real-time PCR handbook, Verkkodokumentti. <<http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>> Luettu 17.09.2016.

NCBI BLAST, Verkkotyökalu. <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

OIE-manuaali: Equine Viral Arteritis, 2013, chapter 2.5.10., Verkkodokumentti. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.05.10_EVA.pdf>.

OIE -manuaali: Principles and methods of validation diagnostic assays for infectious diseases, 2013, chapter: 1.1.6., Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases Verkkodokumentti. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf>. Luettu 3.10.2016.

ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, Verkkodokumentti. <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/28.html> Lainattu kuva 7.9.2016.

VWR AMRESCO® Life Science, Yhdysvallat, 2016, EtBr käyttöturvallisuustiedote, Verkkodokumentti. <<http://www.amresco-inc.com/media.acux?path=/media/products/sds/MSDS-E406.pdf>>