

Tiina Iivanainen

Noroviruksen analysointi Droplet Digital PCR -laitteella ja inhibition vaikutuksen vertaaminen Droplet Digital PCR:n ja reaaliaikaisen PCR:n välillä norovirusanalyysissä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

22.11.2016

Tekijä Otsikko	Tiina Iivanainen Noroviruksen analysointi Droplet Digital PCR -laitteella ja inhibition vaikutuksen vertaaminen Droplet Digital PCR:n ja reaaliaikaisen PCR:n välillä norovirusanalyysissä
Sivumäärä Aika	30 sivua + 1 liite 22.11.2016
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	laboratorioala
Ohjaajat	yliopistonlehtori dos. Leena Maunula lehtori Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyössä testattiin norovirusanalyysin toimivuutta uudella Droplet Digital PCR -laitteella (ddPCR), joka soveltuu nukleinihappojen kvantitatiiviseen määrittämiseen. Analyysin toimivuutta testattiin noroviruksen genoryhmillä GI ja GII. Työn tavoitteena oli selvittää, toimii analyysi riittävän hyvin ddPCR-laitteella vai onko menetelmää optimoitava ja kuinka herkkä ddPCR-menetelmä on ennestään käytössä olleeseen reaaliaikaiseen PCR-menetelmään (qPCR) verrattuna. Lisäksi työssä tutkittiin, onko näytematriisin aiheuttamalla inhibitiolla vähemmän vaikutusta ddPCR-analyysiin kuin qPCR-analyysiin.</p> <p>Analyysin toimivuutta ddPCR-laitteella testattiin analysoimalla noroviruksen genoryhmien GI ja GII RNA- ja DNA-näytteitä. ddPCR-analyysi suunniteltiin käytössä olleiden noroviruksen qPCR-analyysien pohjalta. ddPCR-menetelmän herkkyyttä ja inhibition vaikutusta tuloksiin arvioitiin analysoimalla samoja näytteitä ddPCR:llä ja qPCR:llä sekä vertaamalla ddPCR-tuloksia aiemmin samoista näytteistä mitattuihin qPCR-tuloksiin.</p> <p>Tulosten perusteella ddPCR-analyysi toimi hyvin noroviruksen genoryhmällä GII. Menetelmän herkkyys oli dsDNA-laimennossarjan perusteella arvioituna yhtä hyvä kuin qPCR:llä. Menetelmä toimi myös genoryhmällä GI, mutta suhteellinen herkkyys qPCR:ään verrattuna oli 88 %, eikä ddPCR:llä saatu positiivista tulosta yhtä heikosta dsDNA-laimennoksesta kuin qPCR:llä, joten GI-analyysin optimointi todettiin tarpeelliseksi.</p> <p>PCR-inhibiittoreilla havaittiin olevan vähemmän vaikutusta ddPCR:llä kuin qPCR:llä määritettyyn NoV GII -pitoisuuteen eli ddPCR oli vähemmän herkkä näytematriisin aiheuttamalle inhibitiolle kuin qPCR, mikä oli odotettua muilla viruksilla aiemmin tehtyjen tutkimusten perusteella.</p> <p>Noroviruksen analysoinnista ddPCR-laitteella ei ollut ennestään juurikaan tietoa. Työssä saatiin selvitettyä, että ddPCR:ää voidaan tarvittaessa käyttää qPCR:n sijaan ainakin noroviruksen genoryhmän GII analysoinnissa ja että menetelmä toimii myös genoryhmällä GI, mutta halutun herkkyyden saavuttamiseksi NoV GI -menetelmää on syytä optimoida. ddPCR:ää voidaan hyödyntää jatkossa esimerkiksi inhibitorisia näytematriiseja tutkittaessa tai noroviruksen ja referenssimateriaalien kvantitatiivisessa määrittämisessä.</p>	
Avainsanat	ddPCR, Droplet Digital PCR, inhibitio, norovirus, qPCR

Author Title Number of Pages Date	Tiina Iivanainen Analysis of Norovirus Using Droplet Digital PCR and Comparison of Inhibition in Norovirus Assay Using Droplet Digital PCR and Real-Time PCR 30 pages + 1 appendix 22 November 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Leena Maunula, University Lecturer Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>In this study, norovirus assay was tested using Droplet Digital PCR (ddPCR) which is a new method for quantifying nucleic acids. The assay was tested with norovirus genogroups GI and GII. The aim of the study was to determine whether the assay worked well or needed optimizing, and to determine relative sensitivity of the assay using ddPCR compared to real-time PCR (qPCR) which has been used in norovirus assays previously. It was also studied if sample matrix related inhibition affected the assay less on ddPCR than qPCR.</p> <p>The assay was tested by analyzing RNA and DNA samples of norovirus genogroups GI and GII using ddPCR. ddPCR assay was designed based on previously performed norovirus qPCR assays. Sensitivity of the assay and effects of inhibition on the results were estimated by analyzing samples using ddPCR and qPCR and by comparing ddPCR results to previously obtained qPCR results.</p> <p>The results indicated that ddPCR assay worked well with norovirus genogroup GII. Sensitivity of the assay was as good as with qPCR, based on dsDNA dilution series. The assay worked also with genogroup GI but relative sensitivity was 88 % compared to qPCR and weaker dilution of dsDNA was detected positive using qPCR than ddPCR. Therefore further optimization of GI assay is recommended.</p> <p>The results showed that PCR inhibitors affected the measured concentration of NoV GII less when analyzed by ddPCR than by qPCR. Thus, ddPCR was less sensitive to inhibition caused by sample matrix than qPCR, which was expected based on previous studies of other viruses.</p> <p>Prior to this study there was not much information of analyzing norovirus by ddPCR. It was discovered that ddPCR can be used in norovirus assay instead of qPCR, at least with genogroup GII, and that the assay works also with genogroup GI but needs to be optimized to obtain the eligible sensitivity. In the future ddPCR may be used for instance to examine inhibitory samples or to quantify norovirus samples or reference materials.</p>	
Keywords	ddPCR, Droplet Digital PCR, inhibition, norovirus, qPCR

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Norovirus	2
2.1.1	Rakenne ja luokittelu	2
2.1.2	Norovirus taudinaiheuttajana	3
2.1.3	Analysointimenetelmiä	4
2.2	QX200 Droplet Digital PCR System	5
2.2.1	Menetelmän toimintaperiaate	6
2.2.2	Vertailu qPCR:ään ja käyttökohteita	10
3	Aineisto ja menetelmät	12
4	Työn suoritus	13
4.1	PCR-reaktioseokset ja PCR-ohjelmat	13
4.2	Noroviruksen genoryhmällä GI suoritettut analyysit	16
4.3	Noroviruksen genoryhmällä GII suoritettut analyysit	16
5	Tulokset	18
5.1	Noroviruksen genoryhmän GI tulokset	18
5.2	Noroviruksen genoryhmän GII tulokset	20
6	Tulosten tarkastelu	24
7	Yhteenveto	27
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. Mittaustulokset ja aiemmin mitatut qPCR-tulokset	

Lyhenteet

ddPCR	Droplet Digital polymerase chain reaction. Nukleiinihapposekvenssin kvantitatiivinen määrittäminen menetelmä.
dsDNA	Double-stranded deoxyribonucleic acid eli kaksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo.
EC RNA	External control ribonucleic acid eli ulkopuolinen kontrolli-RNA. Esim. plasmideissa tuotettu RNA, jota voidaan käyttää kontrollina PCR-reaktiossa.
NoV GI	Noroviruksen genoryhmä GI.
NoV GII	Noroviruksen genoryhmä GII.
PCR	Polymerase chain reaction eli polymeerasiketjureaktio. Menetelmä, jolla monistetaan DNA:ta.
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction eli kvantitatiivinen PCR. Toiselta nimeltä reaaliaikainen PCR. Menetelmä, jolla monistetaan DNA:ta ja mitataan DNA:n monistumista jokaisella syklillä, mikä mahdollistaa kvantitatiivisen määrittäksen.
RT	Reverse transcriptase eli käänteiskopiointi. Reaktio, jossa RNA käännetään DNA:ksi.

1 Johdanto

Opinnäytetyössä testattiin norovirusanalyysin toimivuutta uudella Droplet Digital PCR -laitteella (ddPCR). Työn tavoitteena oli arvioida norovirusanalyysin herkkyyttä uudella laitteella suhteessa ennestään käytössä olleeseen reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (qPCR). Lisäksi työssä tutkittiin PCR-inhibiittorien vaikutusta noroviruksen analysointiin ddPCR- ja qPCR-laitteilla.

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolla. Työ tehtiin osaston elintarvike- ja ympäristövirologian ryhmässä, joka tutkii muun muassa elintarvikkeissa ja vesissä esiintyviä enterisiä viruksia. Ryhmän tärkeimpiä tutkimuskohteita on norovirus, joka on maailmanlaajuisesti merkittävä vatsataudin aiheuttaja sekä lapsilla että aikuisilla [1].

Tutkimusryhmässä on rutiinikäytössä noroviruksen analysoinnissa elintarvike-, vesi- ja pintanäytteistä qPCR-menetelmä, jolla voidaan määrittää noroviruksen esiintyminen näytteessä kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti, jos analyysiin sisällytetään standardisuora. Joissakin näytematriiseissa esiintyvät inhibiittorit, joita ei saada täysin poistettua näytteenkäsittelyllä, haittaavat analyysiä ja heikentävät sen luotettavuutta. Uudenaikaiseen tekniikkaan perustuvan ddPCR-laitteen on todettu olevan vähemmän herkkä qPCR:ää haittaaville inhibiittoreille [2], joten tutkimusryhmässä oltiin kiinnostuneita ddPCR-laitteen käyttömahdollisuuksista qPCR-menetelmän rinnalla erityisesti vaikeita näytematriiseja tutkittaessa. Toinen syy tutkia analyysin toimivuutta ddPCR-laitteella oli se, että laite mahdollistaa näytteiden kvantitatiivisen analysoinnin ilman standardisuoran käyttöä. Kvantitatiivisessa analyysissä ddPCR:n etuna on myös sen riippumattomuus reaktiotehokkuudesta, jolla voi olla merkittävä vaikutus qPCR-analyysin tuloksiin. [3.]

Norovirusanalyysin toimivuutta ddPCR-laitteella testattiin analysoimalla erilaisia noroviruksen genoryhmän GI ja GII RNA- ja DNA-näytteitä. Analyysin suunnittelussa hyödynnettiin ennestään käytössä olleita noroviruksen qPCR-analyyskejä, joihin tehtiin tarvittavia muutoksia ddPCR-kitin ohjeiden perusteella. ddPCR-menetelmän herkkyyttä ja inhibition vaikutusta tuloksiin arvioitiin analysoimalla samoja näytteitä ddPCR:llä ja qPCR:llä. Tulosten perusteella pyrittiin selvittämään, toimiiko analyysi riittävän hyvin ddPCR-laitteella vai kaipaako menetelmä enemmän optimointia, kuinka herkkä ddPCR-menetelmä on

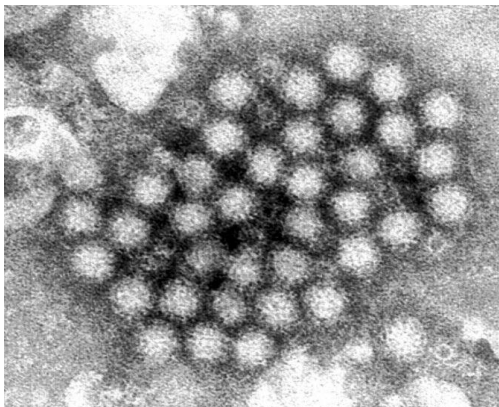
qPCR:ään verrattuna ja onko näytematriisin aiheuttamalla inhibitiolla vähemmän vaikutusta ddPCR-analyysiin kuin qPCR-analyysiin.

2 Teoria

2.1 Norovirus

2.1.1 Rakenne ja luokittelu

Norovirus kuuluu kalikiviruksiin (*Caliciviridae*). Sen aikaisempia nimityksiä ovat morfologiaan viittaava pieni pyöreä virus (kuva 1) ja Norwalkin kaltainen virus, joka viittaa ensimmäisenä löydettyyn Norwalkissa vatsatautiepidemian aiheuttaneeseen noroviruksen tyyppiin. [1.] Noroviruksen genomi on positiivinen yksijuosteinen RNA-molekyylä, jonka koko on genotyypistä riippuen 7,3–7,6 kb [4]. Genomia ympäröi vaipaton proteiinikuori, jossa on monille kalikiviruksille tyypillisiä kuppimaisia muodostelmia [5].



Kuva 1. Norovirusia elektronimikroskoopilla kuvattuna [6].

Norovirukset jaetaan genomien sekvenssin perusteella ainakin viiteen eri genoryhmään: GI, GII, GIII, GIV ja GV [4]. Genoryhmät on edelleen jaettu genotyypeiksi, joita on yhteensä yli 30. Genotyyppi ilmaistaan numerolla genoryhmän perässä. Esimerkiksi Norwalkin virusta nimitetään nykyään genotyypin GI.1 prototyyppikannaksi. Eniten erilaisia genotyyppejä on löydetty ryhmistä GI ja GII ja ryhmän GII virukset ovat maailmanlaajuisesti yleisimpiä kantoja. [5.] Genoryhmiin GI, GII ja GIV kuuluvat virukset voivat infektoida ihmisiä aiheuttaen vatsatautia. Ryhmään GIII kuuluvia viruksia on löydetty nautakarjasta ja lampaista ja ryhmään GV kuuluvia viruksia hiiristä. Vaikka ryhmän GII viruksia

on löydetty myös sioista, niin zoonoottisia infektiotapauksia ei ole tähän mennessä havaittu. [4.]

2.1.2 Norovirus taudinaiheuttajana

Norovirus aiheuttaa ihmisille vatsatautia, jonka oireita ovat äkillinen ripuli ja oksentaminen sekä usein myös kuume tai kuumeinen olo [7]. Oireet alkavat yleensä 10–51 tuntia tartunnan saamisesta ja kestävät 1–3 vuorokautta. Noin kolmasosalla infektion saaneista ei esiinny lainkaan oireita. [5.]

Norovirus tartuttaa sekä lapsia että aikuisia. Tauti ei ole yleensä vakava, mutta voi olla vaarallinen erityisesti pienillä lapsilla, vanhuksilla tai ihmisillä, joilla on heikentynyt immuuniteetti. Norovirusta vastaan ei ole erityistä lääkettä tai rokotetta, vaan tautia hoidetaan oireiden mukaan lähinnä huolehtimalla nesteytyksestä. Vakavimmat tapaukset voivat vaatia sairaalahoitoa. [5; 7.]

Norovirus tarttuu ihmisestä toiseen ulosteen tai oksennuksen välityksellä. Sairastuneen henkilön ulosteessa voi olla miljoonia viruksia grammaa kohti ja tartunnan saamiseen riittää alle 100 virusta, joten virus leviää herkästi ihmiseltä toiselle. Virus säilyy tartuntakykyisenä pinnoilla ja elintarvikkeissa, joten tartunnan voi saada sairastuneen henkilön käsittelemästä ruoasta tai koskettamalla pintaa, jota sairastunut henkilö on koskenut aiemmin. Norovirusepidemioita esiintyy usein paikoissa, joissa ihmiset ovat tiiviisti yhdessä, kuten kouluissa, sairaaloissa tai risteilyaluksilla. Noroviruksen voi saada myös ulosteilla saastuneesta vedestä tai saastuneen veden kontaminoimista raakana syötävistä elintarvikkeista, joita ovat tyypillisesti osterit tai marjat. Norovirus kestää pakastamisen ja kuumentamisen yli 60 °C:seen, joten se säilyy hyvin monissa elintarvikkeissa. [5; 7.]

Noroviruksen yleisyys vatsataudin aiheuttajana on ymmärretty viimeisten vuosikymmenten aikana, kun molekyylibiologiaan perustuvat diagnosointimenetelmät ovat kehittyneet [8]. Nykyään norovirusta pidetään maailmanlaajuisesti merkittävimpänä virusvälitteisenä vatsatautiepidemioiden aiheuttajana [5] ja noroviruksen aiheuttamaa vatsatautia merkittävimpänä ruoan välityksellä leviävänä sairautena [8]. Noroviruksen on vuonna 2010 arvioitu aiheuttaneen 685 miljoonaa ripulitautitapausta, joista noin 200 000 johti kuolemaan. Suurin osa tapauksista oli kehitysmaissa, mutta myös kehittyneissä maissa tauti-

tapauksia oli lähes 100 miljoonaa ja kuolemantapauksia yli 2 000. [9.] Yli puolet Suomessa esiintyvistä äkillisistä ripulitaudeista johtuu arvioiden mukaan noroviruksesta ainakin niinä vuosina, joina esiintyy norovirusepidemioita [7].

2.1.3 Analysointimenetelmiä

Norovirusten kasvattamiseen soluviljelmissä ei ole käytössä rutiinimenetelmää, joten niiden analysointi perustuu virus-RNA:n tai antigeenien osoittamiseen näytteistä molekyylibiologisin menetelmin. Tärkein menetelmä noroviruksen analysoinnissa potilas-, elintarvike-, vesi- ja ympäristönäytteistä on RT-qPCR (real-time reverse transcription polymerase chain reaction). RT-qPCR on herkkä menetelmä, jolla voidaan tehdä sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia analyyseja. Norovirusten genotyyppityksessä käytetään konventionaalista RT-PCR-menetelmää, jolla monistetaan yleensä genomien kapsidiproteiinia koodaavaa osaa. Genotyyppi määritetään sekvensoimalla RT-PCR:llä tuotettu DNA. [10.] Koska norovirusten genomi on RNA:ta, PCR-analyyseissä on käytettävä RT-PCR:ää ja RT-qPCR:ää, joissa monistusvaihetta edeltää käänteiskopiointivaihe (reverse transcriptase, RT). Käänteiskopiointivaiheessa entsyymi kopioi RNA:n DNA:ksi, jota polymeerasientsyymi pystyy kopioimaan monistusvaiheessa.

Noroviruksen osoittamiseen potilasnäytteistä on kehitetty myös antigeenien tunnistamiseen perustuva immunologinen EIA-menetelmä (enzyme immunoassay). EIA-menetelmä on nopea, mutta sen herkkyys on vain noin 50 %, minkä takia sillä saadut negatiiviset tulokset on varmistettava toisella menetelmällä, esimerkiksi RT-qPCR:llä. [10.]

Norovirusten kasvattaminen soluviljelmässä on onnistunut tutkijoilta vasta aivan äskettäin. Amerikkalainen tutkimusryhmä on saanut kasvatettua ihmisen norovirusia suolen epiteelisoluista tehdyissä soluviljelmissä, mikä avaa uusia mahdollisuuksia norovirusten tutkimuksessa. Soluviljelmäkasvatuksen myötä voidaan saada parempi käsitys norovirusten biologiasta ja mahdollisesti kehittää menetelmiä tartuntojen ehkäisemiseksi ja hoitamiseksi. [11.]

Noroviruksen genoryhmien GI ja GII analysointiin elintarvikkeiden pinnoilta, pehmeistä hedelmistä, salaateista, ostereista ja pullovesistä on käytössä tekninen spesifikaatti ISO 15216, jonka osissa 1 ja 2 on kuvattu menetelmä norovirusten kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen analysointiin. Menetelmä perustuu virus-RNA:n osoittamiseen näytteistä RT-qPCR:llä. Näytteenkäsittelymenetelmät vaihtelevat näytetyypin mukaan, mutta niissä

kaikissa on tarkoituksena saada eristettyä virukset näytematriisista, jossa voi olla RT-qPCR-reaktiota inhiboivia aineita. Virusten eristämisen jälkeen niiden kapsidikuoret hajoetaan ja RNA eristetään RT-qPCR:ää varten. RT-qPCR:ssä kummallekin genoryhmälle käytetään omia spesifisiä alukkeita ja probeja. Menetelmässä käytetyt probet ovat sekvenssispesifisiä hydrolyysiprobeja (ks. luku 2.2.1), mikä lisää menetelmän herkkyyttä ja spesifisyyttä. Koska probet ovat sekvenssispesifisiä, qPCR:n jälkeen ei tarvitse tehdä RT-PCR:ssä käytettäviä jatkoanalyyskejä sen varmistamiseksi, että PCR:ssä on monistunut oikeaa tuotetta. RT-qPCR:ssä laite mittaa jokaisella lämpösyklillä probeista lähtevän fluoresenssin voimakkuutta, joka korreloi monistuneen DNA:n määrän kanssa. Mitä enemmän näytteessä on DNA:ta, sitä nopeammin fluoresenssi saavuttaa kynnysarvon eli määrätyn tason, joka eroaa riittävästi taustafloresenssista. Sykliä, jolla kynnysarvo ylittyy, nimitetään näytteen Ct-arvoksi. Kvantitatiivisessa menetelmässä näytteiden kanssa analysoidaan laimennossarja dsDNA-näytteitä, joiden pitoisuus on määritetty esimerkiksi spektrofotometrisesti tai digitaali-PCR:llä. dsDNA-näytteiden pitoisuuksista ja Ct-arvoista tehdään standardisuora, jonka avulla muiden näytteiden pitoisuudet määritetään niille mitattujen Ct-arvojen perusteella. Sekä kvalitatiivisessa että kvantitatiivisessa menetelmässä käytetään erilaisia kontrollinäytteitä, joilla varmistetaan analyysin toimivuus. Näytteenkäsittelystä huolimatta näytteisiin voi jäädä inhiboivia aineita, joiden vaikutusta RT-qPCR:n onnistumiseen seurataan lisäämällä näytteisiin tietty määrä EC RNA:ta (external control RNA) ja vertaamalla EC RNA:n monistumista näytteissä ja ei-inhiboivassa vesinäytteessä. [12.]

2.2 QX200 Droplet Digital PCR System

Bio-Radin QX200 Droplet Digital PCR System (ddPCR) on digitaalinen PCR-laitteisto, joka mahdollistaa halutun nukleinihapposekvenssin tarkan kvantitatiivisen määrityksen näytteestä ilman standardisuoraa. Laitteen toiminta perustuu näytteen jakamiseen tuhansiksi vesi-öljyemulsiosta koostuviksi pisaroiksi, joissa tapahtuu PCR-reaktio. Halutun nukleinihapposekvenssin pitoisuus näytteessä määritetään PCR:n jälkeen positiivisten ja negatiivisten pisaroiden suhteesta. ddPCR-analyysissä käytettävät reagenssit ja työvaiheet ovat samantyyppisiä kuin qPCR-analyyseissä, joissa käytetään TaqMan-hydrolyysiprobeja tai SYBR Green -väriainetta. Laitteelle on kehitetty useita sovelluksia sekä tutkimustarkoituksiin että klinisen diagnostiikan käyttöön. [13.]

2.2.1 Menetelmän toimintaperiaate

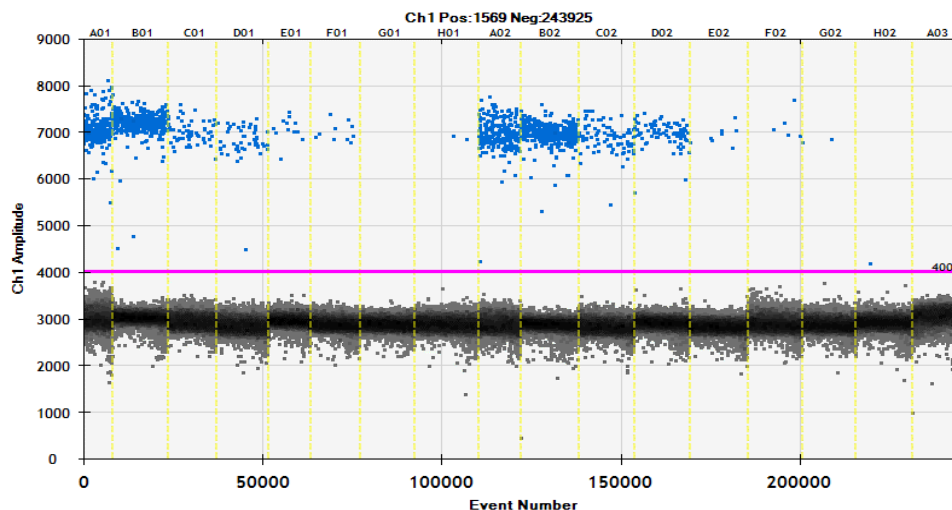
ddPCR-analyysillä tutkittava näyte voi olla joko DNA:ta tai RNA:ta. Näytteiden valmistus ja sekoitus reaktioseokseen ddPCR-analyysiä varten tapahtuu kuten qPCR:ssä, mutta ddPCR:ssä käytetään kittejä, jotka on suunniteltu ddPCR:ään sopiviksi. Kitit sisältävät kaikki muut PCR-reaktiossa tarvittavat reagenssit paitsi alukkeet ja proben. Jos tutkittava näyte on RNA:ta, käytetään käänteiskopioijaentsyymien sisältävää kittiä, jolloin ennen PCR-reaktiota haluttu RNA-sekvenssi kopioituu DNA:ksi kuten RT-qPCR:ssäkin. RNA voidaan myös kääntää DNA:ksi erillisessä reaktiossa ennen ddPCR:ää. Alukkeet valitaan siten, että monistettavan nukleinihapposekvenssin pituus on 60–200 bp ja GC-osuus 40–60 %. ddPCR-analyysissä voidaan käyttää FAM-, HEX- tai VIC-fluoroforilla leimattua TaqMan-hydrolyysiprobea tai kaksijuosteiseen DNA:han (dsDNA) sitoutuvaa EvaGreen-väriainetta, joka vastaa qPCR:ssä usein käytettävää SYBR Green -väriainetta. Hydrolyysiprobien etuna on muun muassa parempi spesifisyys ja parempi signaalin ja taustan suhde. [13.]

Näytteiden ja reaktioseoksen yhdistämisen jälkeen näytteet jaetaan vesi-öljyemulsiopisaroiiksi manuaalisella tai automaattisella Droplet Generator -laitteella. Laitte sekoittaa jokaisen näytteen öljyyn niin, että muodostuu noin 20 000 pisaraa, joiden tilavuus on noin 1 nl. Näyte jakautuu pisaroihin sattumanvaraisesti, joten osa pisaroista ei sisällä yhtään kohdenukleinihapposekvenssiä ja osa sisältää yhden tai useamman kopion. PCR:ssä tarvittavia reagensseja on näytteessä niin suuri pitoisuus, että niitä päätyy jokaiseen pisaraan riittävästi PCR-reaktiota varten. Pisaroiden muodostamisen jälkeen jokainen näyte siirretään yhteen kuoppaan 96-kuoppalevylle, joka laitetaan tavalliseen PCR-laitteeseen. [13.]

PCR-reaktio tapahtuu jokaisessa pisarassa itsenäisesti muista pisaroista erillään. ddPCR:ssä käytetään End-Point PCR -reaktiota eli halutun nukleinihapposekvenssin monistuminen mitataan vasta PCR:n jälkeen. PCR:ssä ajetaan noin 40–45 sykliä, minkä jälkeen 96-kuoppalevy siirretään QX200 Droplet Reader -laitteeseen. Laitte imee jokaisen näytteen ohueen putkistoon, jossa pisarat kulkevat yksi kerrallaan fluoresenssia mittaavan detektorin ohi. Laitte jakaa pisarat fluoresenssin voimakkuuden perusteella positiivisiin eli kohdesekvenssiä sisältäviin ja negatiivisiin, joissa ei ole kohdesekvenssiä. Näytteen 20 000 pisarasta detektoidaan yleensä noin 12 000–16 000 pisaraa, koska osa pisaroista jää pipetinkärkien ja kuoppalevyn seinämiin ja koska Droplet Reader -laitte hylkää väärän kokoiset pisarat. [13.]

Sekä TaqMan-hydrolyysiprobea että EvaGreen-väriainetta käytettäessä positiivisten pisaroiden fluoresenssi on voimakkaampi kuin negatiivisten. TaqMan-hydrolyysiprobea käytettäessä positiivisten pisaroiden voimakkaampi fluoresenssi johtuu proben pilkkoutumisesta kohdesekvenssin monistuessa. TaqMan-hydrolyysiprobet koostuvat kohdesekvenssille komplementaarista alle 30 emäksen pituisesta nukleinihappojuosteesta, jonka toisessa päässä on fluoresoiva molekyyli ja toisessa päässä fluoresenssia vaimentava molekyyli. Kun hydrolyysiprobe on ehjä, vaimentava molekyyli on niin lähellä fluoresoivaa molekyyliä, että se estää fluoresenssin. Annealing/ekstensio-vaiheessa hydrolyysiprobe sitoutuu monistettavaan DNA-juosteeseen ja polymeraasi pilkkoo proben nukleinihappojuosteen tieltään rakentaessaan uutta DNA-juostetta. Tällöin fluoresoiva molekyyli ja fluoresenssia vaimentava molekyyli irtoavat kauemmas toisistaan, jolloin vaimentava molekyyli ei enää estä fluoresenssia ja fluoresenssi kasvaa. EvaGreen-väriainetta käytettäessä fluoresenssin kasvu johtuu väriaineen sitoutumisesta dsDNA:han. EvaGreen-väriaine ei fluoresoi ollessaan vapaana liuoksessa, mutta PCR:ssä monistuneeseen dsDNA:han sitoutuminen aktivoi väriaineen fluoresenssin. [13.]

ddPCR-laitteella piirtää pisaroiden fluoresenssista kuvan 2 mukaisen kuvaajan, jonka avulla käyttäjä voi säätää fluoresenssin kynnysarvon sopivalle tasolle tai hyväksyä laitteen asettaman kynnysarvon. Pisarat, joiden fluoresenssi on kynnysarvoa heikompi, saavat negatiivisen arvon (0), ja pisarat, joiden fluoresenssi on kynnysarvoa suurempi, saavat positiivisen arvon (1). [13.]

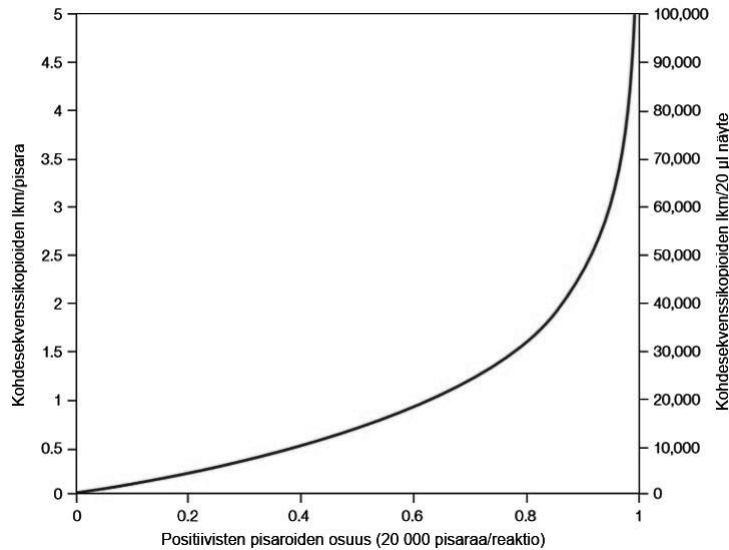


Kuva 2. ddPCR-laitteella mitattu fluoresenssin voimakkuus (y-akseli) näytteiden A01–A03 pisaroissa. Kynnysarvoksi on säädetty 4000, mitä voimakkaammin fluoresoivat pisarat on tulkittu positiivisiksi ja heikommin fluoresoivat negatiivisiksi.

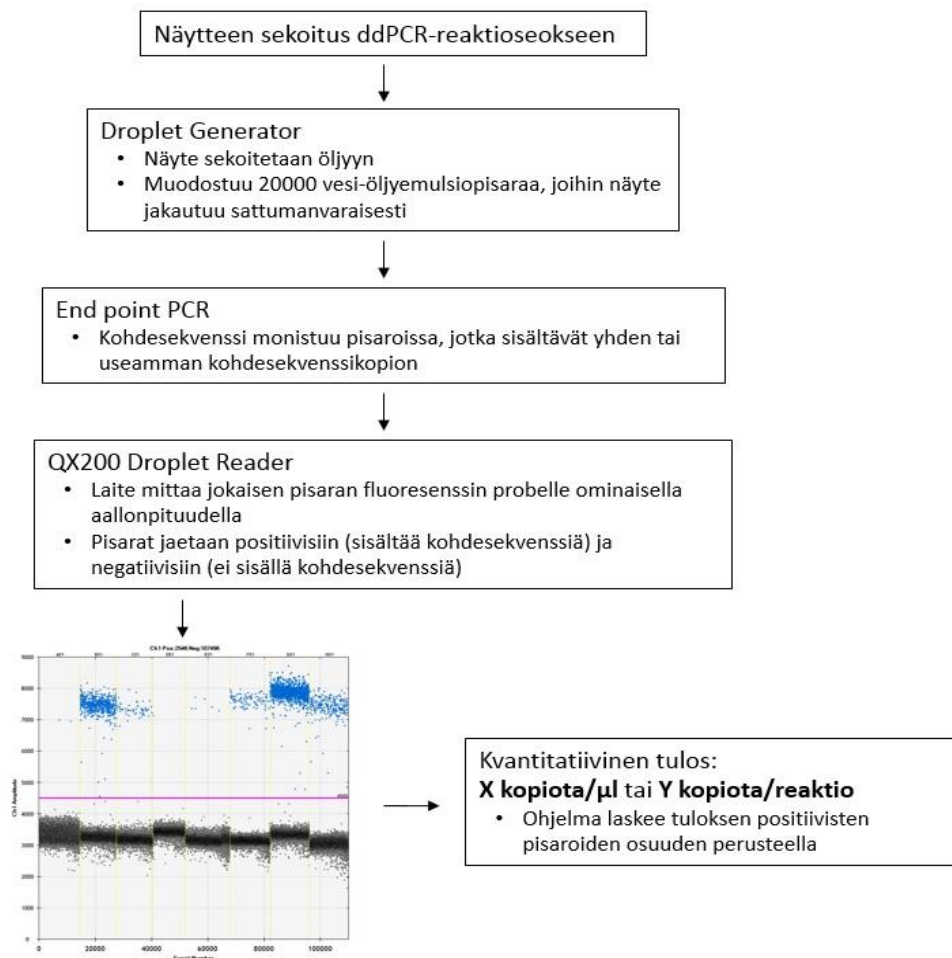
ddPCR-laite laskee kohdesekvenssin alkuperäisen pitoisuuden näytteessä positiivisten pisaroiden osuuden perusteella. Jotta pitoisuus voidaan laskea, näytteessä on siis oltava sekä positiivisia että negatiivisia pisaroita, mikä rajoittaa laitteen dynaamisen alueen 1–120 000 kohdesekvenssin kopiaan/reaktio. Tätä suuremmalla kopiomäärällä on todennäköistä, että kaikki pisarat sisältävät kohdesekvenssiä. End-Point PCR:ssä fluoresenssin voimakkuuteen ei vaikuta se, kuinka paljon reaktiossa oli lähtömateriaalia eli kohdesekvenssiä, koska PCR-reaktio ehtii saavuttaa loppupisteen, jossa DNA:n määrä ei enää kasva. Tämän takia positiivisista pisaroista ei voida erottaa, oliko niissä alun perin yksi vai useampi kopio kohdesekvenssiä, mikä huomioidaan soveltamalla aineistoon Poisson-jakaumaa. [13.]

Poisson-jakauma on tilastollinen malli, jonka avulla voidaan ennustaa kohdesekvenssikopioiden keskimääräinen jakautuminen pisaroihin. Malli olettaa jakautumisen tapahtuvan täysin satunnaisesti eikä huomioi esimerkiksi molekyylien välisiä vuorovaikutuksia. Kun kohdesekvenssikopioita on näytteessä vain vähän, esimerkiksi alle kymmenen kappaletta, on todennäköistä, että kaikki kopiot päätyvät eri pisaroihin. Kun kopioita on riittävän paljon enemmän, on todennäköistä, että joissakin pisaroissa on useampia kopioita. Esimerkiksi 20 000 sekvenssikopiota eivät jakaudu 20 000 pisaraan niin, että kaikissa pisaroissa olisi 1 kopio. Poisson-jakauman avulla voidaan ennustaa jokaisella sekvenssikopiomäärällä, kuinka moneen pisaraan päätyy 0, 1, 2, 3, 4,... kopiota. ddPCR:llä analysoidun näytteen positiivisten pisaroiden osuudesta voidaan Poisson-jakauman perusteella laskea kohdesekvenssikopioiden keskimääräinen lukumäärä kaikissa pisaroissa ja kokonaismäärä näytteessä. [13; 14.]

Kuvassa 3 on havainnollistettu Poisson-jakauman käyttöä pitoisuuden määrittämisessä, kun pisaroiden kokonaismäärä on 20 000. ddPCR-analyysin tärkeimmät vaiheet näytteen sekoituksesta tulosten luentaan on esitetty kaaviossa kuvassa 4.



Kuva 3. Poisson-jakauman positiivisten pisaroiden osuuden perusteella ennustama kohdesekvenssikopioiden keskimääräinen lukumäärä pisaraa kohti ja kokonaismäärä näytteessä. Kuva muokattu [13].



Kuva 4. ddPCR-analyysin päävaiheet.

2.2.2 Vertailu qPCR:ään ja käyttökohteita

Toisin kuin qPCR:llä, ddPCR:llä voidaan määrittää kohdesekvenssin absoluuttinen pitoisuus näytteessä ilman standardisuoraa, mikä tekee kvantitoinnista yksinkertaisempaa. qPCR:ssä reaktiotehokkuuden vaihtelu voi vaikuttaa kvantitatiivisen analyysin tuloksiin, koska Ct-arvo riippuu siitä, kuinka nopeasti kohdesekvenssi monistuu. Reaktiotehokkuuteen voivat vaikuttaa esimerkiksi reaktioseoksen koostumus ja inhiboivat yhdisteet. ddPCR:ssä reaktiotehokkuudella ei ole merkitystä, koska menetelmässä lasketaan kohdesekvenssiä sisältävät pisarat käyttämällä End-Point PCR:ää, jossa kohdesekvenssin monistumisnopeus ei vaikuta siihen, tulkitaanko pisara positiiviseksi vai negatiiviseksi. [3.]

ddPCR:llä pystytään määrittämään näytteiden välillä pienempiä kohdesekvenssien pitoisuuksia kuin qPCR:llä [3]. qPCR:ssä pystytään erottamaan toisistaan kaksinkertaisia tai sitä suurempia pitoisuuksia, koska ennen Ct-arvon saavuttamista näyte monistuu eksponentiaalisesti eli sekvenssikopioiden määrä kaksinkertaistuu jokaisella syklillä [15]. ddPCR:ssä näytteen jakaminen tuhansiin osiin ja reaktiotehokkuuden vaikutuksen poistuminen mahdollistavat 1,2-kertaisten pitoisuuksien mittaamisen [3].

ddPCR:ssä tapahtuva näytteen jakaminen vähentää harvinaisen kohdesekvenssin kilpailua runsaamman tausta-DNA:n kanssa. Jos kilpailevaa sekvenssiä on runsaammin kuin kohdesekvenssiä, niin näytteen jakautuessa kilpailevan sekvenssin määrä suhteessa kohdesekvenssiin pienenee alkuperäiseen näytteeseen verrattuna niissä pisaroissa, joihin päätyy kohdesekvenssiä, eli kohdesekvenssi rikastuu positiivisissa pisaroissa. Näytteen jakautuessa tausta-DNA:n lisäksi myös näytteessä mahdollisesti olevat PCR-reaktiota inhiboivat aineet laimenevat suhteessa kohdesekvenssiin. Kohdesekvenssin rikastuminen mahdollistaa harvinaistenkin kohdesekvenssien herkän tunnistamisen ja tarkan kvantitatiivisen määrittämisen. [3.]

ddPCR-laitteisto ja ddPCR-kitit ovat kalliimpia kuin qPCR-laite ja -kitit, mikä voi rajoittaa menetelmän käyttöä tutkimustyössä ja kliinisessä diagnostiikassa. Joissakin tapauksissa ddPCR:n käyttökustannukset voivat kuitenkin olla kvantitatiivisessa määrittämisessä pienemmät kuin qPCR:n, koska näytteitä saadaan analysoidua paljon kerralla ja standardisuoran näytteitä ei tarvita [16].

Yhden DNA- tai RNA-kohdesekvenssin tunnistamisen tai kvantitatiivisen määrityksen lisäksi ddPCR:llä on mahdollista tehdä multiplex-analyysyjä eli mitata näytteestä samanaikaisesti kahden tai useamman kohdesekvenssin pitoisuudet. Multipleksaaminen tapahtuu lisäämällä reaktioseokseen useammat alukeparit ja probet. Koska ddPCR-laitte pystyy mittaamaan fluoresenssia FAM-fluoroforin aallonpituudelta sekä HEX- ja VIC-fluoroforien aallonpituudelta, kahden kohdesekvenssin samanaikainen määrittäminen onnistuu käyttämällä toisessa probessa FAM-leimaa ja toisessa HEX- tai VIC-leimaa. Useamman kuin kahden kohdesekvenssin määrittäminen perustuu siihen, että samalla aallonpituudella fluoresoivat probet erotetaan toisistaan fluoresenssin voimakkuuden mukaan. Alukkeiden ja probien pitoisuutta vaihtelemalla voidaan etsiä kokeellisesti sellaiset reaktio-olosuhteet, joissa yhden kohdesekvenssin suhteen positiivisten pisaroiden fluoresenssi on niin paljon heikompaa kuin toisen kohdesekvenssin suhteen positiivisten pisaroiden, että positiivisten pisaroiden ryhmät erottuvat toisistaan. [13.]

EvaGreen-väriainetta käytettäessä multipleksaus perustuu aina fluoresenssin voimakkuuden vaihteluun eri kohdesekvensseillä. Fluoresenssin voimakkuuteen voidaan vaikuttaa kohdesekvenssin pituudella; pidempään amplikoniin mahtuu sitoutumaan enemmän väriainemolekyylejä, jolloin fluoresenssi on voimakkaampaa. Toinen tapa vaikuttaa fluoresenssin voimakkuuteen on käyttää jollekin kohdesekvenssille alukkeita, joiden optimaalinen kiinnitymlämpötila on matalampi kuin PCR-reaktiossa käytettävä annealing/ekstensio-lämpötila. Tällöin reaktiotehokkuus on heikompaa kyseisellä kohdesekvenssillä, mikä johtaa positiivisten pisaroiden heikompaan fluoresenssiin. [13.]

ddPCR:ssä näytteen jakamiseen liittyvästä kohdesekvenssin rikastumisesta seuraava kilpailun väheneminen parantaa mahdollisuutta erottaa vain yhden nukleotidin verran eroavia sekvenssejä toisistaan, mikä yhdessä ddPCR:n herkkyyden ja ilman standardisuoraa tapahtuvan kvantitatiivisen määrityksen kanssa mahdollistaa laitteen käytön monenlaisissa analyyseissä. ddPCR-laitteelle on kehitetty sovelluksia muun muassa genomisen vaihtelun kuten geenien kopioluvun vaihtelun määrittämiseen, jossa ddPCR:llä voidaan mitata pieniä eroja geenien kopioluvuissa, sekä harvinaisten mutaatioiden tai sekvenssien tunnistukseen runsaan tausta-DNA:n seasta. Laitetta voidaan käyttää myös tutkittaessa geeniekspressiota, jolloin ekspresiotasot saadaan määritettyä tarkasti ja kvantitatiivisesti, tai sekvensoinnissa, jossa ddPCR:ää hyödynnetään sekvenssikirjaston entistä tarkempaan kvantitatiiviseen määritykseen ennen sekvensointia. ddPCR soveltuu hyvin myös yhden solun analyyseihin, joissa hyödynnetään ddPCR:n kykyä määrittää kvantitatiivisesti pieniäkin kopiomääriä. [13.]

3 Aineisto ja menetelmät

Työssä analysoitiin noroviruksen genoryhmien GI ja GII näytteitä sekä noroviruksen suhteen negatiivisia näytteitä. Genoryhmien GI ja GII näytteet olivat viruksista eristettyä RNA:ta tai plasmidien avulla tuotettua dsDNA:ta tai EC RNA:ta. Näytteet GII 413, GII 5755 ja GI pk olivat potilasulosteista eristetyistä RNA:sta aiemmin tehtyjä laimennoksia, joita säilytettiin -70 °C:ssa. GII dsDNA, GII EC RNA ja GI dsDNA oli saatu alun perin CEFAS-referenssilaboratoriosta Waymouthista (UK) virusryhmän aikaisempia projekteja varten. Työssä käytettiin aiemmin tehtyjä laimennoksia, joita säilytettiin -70 °C:ssa.

Paprikoista otetut pintanäytteet (GI ja GII) ja vesinäytteet (GII) olivat projektista vuosilta 2013 ja 2014. RNA-näytteitä säilytettiin -20 °C:ssa. Jätevesinäytteet (GI ja GII) olivat toisen projektin näytteitä vuosilta 2014 ja 2015. Näytteet olivat jätevedenpuhdistamolta otettuja tai sikalietteestä tehtyjä laimennoksia, ja ne olivat luontaisesti noroviruksella kontaminoituneita. Vuoden 2014 RNA-näytteitä (jätevesi 1–7) säilytettiin -70 °C:ssa ja vuoden 2015 näytteitä (jätevesi 8–13) -20 °C:ssa.

Pintanäytteet olivat keväällä 2016 qPCR-analyysillä NoV GII -positiivisiksi todettuja pintanäytteitä. RNA-näytteitä säilytettiin -20 °C:ssa. Osterinäytteet olivat projektista vuodelta 2015. Työhön valittiin osterista eristettyjä RNA-näytteitä, joiden molemmat rinnakkaiset näytteet oli todettu NoV GI -positiivisiksi qPCR-analyysillä. Näytteitä oli kolmesta eri osterierästä, joista yhdestä (erä 2) oli näytteet kolmella eri käsittelyllä. RNA-näytteitä säilytettiin -20 °C:ssa.

Näytteiden analysoinnissa käytettiin qPCR- ja ddPCR-menetelmiä. qPCR:ssä käytettiin Qiagenin QuantiTect Probe RT-PCR -kittiä ja Rotorgene-merkkistä qPCR-laitetta. ddPCR:ssä käytettiin Bio-Radin One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes -kittiä, Bio-Radin Automated Droplet Generator -laitetta, 96-kuoppalevyille sopivaa PCR-laitetta ja Bio-Radin QX200 Droplet Digital PCR System -laitetta.

4 Työn suoritus

Norovirusanalyysin toimivuutta ja herkkyyttä ddPCR-laitteella tutkittiin erikseen genoryhmillä GI ja GII. Myös näytematriisin aiheuttaman inhibition eroa qPCR:n ja ddPCR:n välillä tutkittiin erikseen näillä kahdella genoryhmällä. Näytteet, joita oli riittävästi jäljellä, analysoitiin sekä ddPCR:llä että qPCR:llä. Vain ddPCR:ään riittäneiden näytteiden tuloksia verrattiin näytteistä aiemmin saatuihin qPCR-analyysin tuloksiin.

Työssä käytetyt PCR-reaktioseosten konsentraatiot ja PCR-ohjelmat suunniteltiin aikaisemmin optimoitujen noroviruksen qPCR-analyysien sekä ddPCR-kitin ohjeiden perusteella. ddPCR:ssä käytettiin samoja alukkeita ja probeja kuin qPCR:ssä. Reaktioseosten pipetoinnit tehtiin puhtaslaboratorion laminaarissa ja näytteiden yhdistäminen reaktioseokseen RNA-laboratorion laminaarissa. qPCR-laite sijaitsi laboratoriossa, joka oli puhtaslaboratorion ja RNA-laboratorion kanssa samalla käytävällä, mutta ddPCR-laite oli toisessa rakennuksessa noin 15 minuutin kävelymatkan päässä. Näytteet pipetoiitiin valmiiksi RNA-laboratoriossa ja kuljetettiin kylmäblokkissa ddPCR-laitteelle.

Positiivisten pisaroiden kynnysarvo asetettiin ddPCR:ssä manuaalisesti jokaiseen ajoon. Saman ajon saman genotyypin näytteille käytettiin kaikille samaa kynnysarvoa, joka valittiin silmämääräisesti aineistoon sopivaksi.

4.1 PCR-reaktiosekset ja PCR-ohjelmat

ddPCR:ssä ja qPCR:ssä käytetyt alukkeet ja probet on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Työssä käytetyt alukkeet ja probet [12].

Virus	Tyyppi	Nimi	Emäsjärjestys (5' - 3')	Leima
NoV GI	Forward-aluke	QNIF4	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	
	Reverse-aluke	NV1LCR	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	
	Probe	TM9	TGG ACA GGA GAT CGC	FAM-MGBNFQ
NoV GII	Forward-aluke	QNIF2	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	
	Reverse-aluke	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
	Probe	QNIFS	AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG	FAM-TAMRA

Monistuvan sekvenssin pituus oli työssä käytetyillä NoV GI:n alukkeilla 86 bp ja NoV GII:n alukkeilla 89 bp [12].

Työssä käytetyt qPCR-reaktiosekset on esitetty taulukoissa 2 ja 3. Genoryhmille GI ja GII käytettiin eri aluke- ja probekonsentraatioita aikaisemmin tehdyn noroviruksen qPCR-analyysin optimoinnin perusteella.

ddPCR:ssä genoryhmällä GI käytettiin kahta eri reaktioseosta, jotka on esitetty taulukossa 4. Genoryhmällä GII käytettiin taulukossa 5 esitettyä reaktioseosta. Sekä qPCR:ssä että ddPCR:ssä näytemäärä oli kaikissa reaktioissa 5 μ l.

Taulukko 2. Reaktioseoksen koostumus NoV GI -analyysissä qPCR:llä.

	Pitoisuus reaktioseoksessa	1x (μl)
Master Mix	1x	10
QNIF4 (10 μ M)	0,9 μ M	1,8
NV1LCR (10 μ M)	0,9 μ M	1,8
TM9 (10 μ M)	0,3 μ M	0,6
RT-mix	0,2 μ l/reaktio	0,2
H2O	-	0,6
Yhteensä		15

Taulukko 3. Reaktioseoksen koostumus NoV GII -analyysissä qPCR:llä.

	Pitoisuus reaktioseoksessa	1x (μl)
Master Mix	1x	10
QNIF2 (10 μ M)	1,0 μ M	2,0
COG2R (10 μ M)	1,0 μ M	2,0
QNIFS (10 μ M)	0,2 μ M	0,4
RT-mix	0,2 μ l/reaktio	0,2
H2O	-	0,4
Yhteensä		15

Taulukko 4. Reaktioseosten koostumukset NoV GI -analyysissä ddPCR:llä.

	Reaktioseos 1		Reaktioseos 2	
	Pitoisuus reaktioseoksessa	1x (µl)	Pitoisuus reaktioseoksessa	1x (µl)
Supermix	1x	5,5	1x	5,5
Reverse transcriptase	20 U/µl	2,2	20 U/µl	2,2
300 mM DTT	15 mM	1,1	15 mM	1,1
QNIF4 (10 µM)	1,0 µM	2,2	0,9 µM	1,98
NV1 LCR (10 µM)	1,0 µM	2,2	0,9 µM	1,98
TM9 pro (10 µM)	0,2 µM	0,44	0,3 µM	0,66
H2O	-	3,36	-	3,58
Yhteensä		17		17

Taulukko 5. Reaktioseoksen koostumus NoV GII -analyysissä qPCR:llä.

	Pitoisuus reaktioseoksessa	1x (µl)
Supermix	1x	5,5
Reverse transcriptase	20 U/µl	2,2
300 mM DTT	15 mM	1,1
QNIF2 (10 µM)	1,0 µM	2,2
COG2R (10 µM)	1,0 µM	2,2
QNIFS (10 µM)	0,2 µM	0,44
H2O	-	3,36
Yhteensä		17

Kummallakin genoryhmällä käytettiin samoja PCR-ohjelmia. qPCR-ohjelma on esitetty taulukossa 6 ja ddPCR-ohjelma taulukossa 7.

Taulukko 6. Työssä käytetty qPCR-ohjelma.

	°C	t	
RT (käänteiskopiointi)	55	60 min	
Aktivaatio	95	15 min	
Denaturaatio	95	15 s	
Annealing	60	1 min	x 45
Ekstensio	65	1 min	

Taulukko 7. Työssä käytetty ddPCR-ohjelma.

	°C	t	
RT (käänteiskopiointi)	50	60 min	
Aktivaatio	95	10 min	
Denaturaatio	95	30 s	x 43
Annealing/Ekstensio	60	1 min	
Deaktivaatio	98	10 min	
Säilytys	4	∞	

4.2 Noroviruksen genoryhmällä GI suoritettut analyysit

Genoryhmällä GI testattiin kahden eri PCR-reaktioseoksen aluke- ja probekonsentraation vaikutusta ddPCR:llä määritettyyn pitoisuuteen. Näytteinä käytettiin dsDNA-laimennossarjaa ja qPCR-analyyseissä rutiinikäytössä ollutta positiivista kontrollia (GI pk). Näytteet analysoitiin myös qPCR:llä, jotta voitiin arvioida ddPCR:n herkkyyttä suhteessa qPCR:ään. Reaktioseosten koostumukset on esitetty taulukossa 4. Muissa genoryhmän GI reaktioissa käytettiin reaktioseosta 1 (taulukko 4).

ddPCR-analyysin toimivuutta ja herkkyyttä suhteessa qPCR:ään genoryhmällä GI testattiin analysoimalla paprikoista otettuja pintanäytteitä ja jätevesinäytteitä, jotka oli analysoitu aiemmin qPCR:llä. Analyysin toimivuutta ja herkkyyttä arvioitiin sen perusteella, kuinka suuresta osasta qPCR:llä positiivisiksi todetuista näytteistä saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä.

Näytematriisin inhibition vaikutusta qPCR- ja ddPCR-analyyseihin genoryhmällä GI testattiin analysoimalla ostereista eristettyjä RNA-näytteitä kummallakin menetelmällä. qPCR:ssä käytettiin standardeina ddPCR:llä analysoituja GI dsDNA -laimennoksia, joille annettiin pitoisuudet ddPCR-tulosten perusteella. Näytteet pakastettiin ja sulatettiin ddPCR:n jälkeen ennen qPCR:ää.

4.3 Noroviruksen genoryhmällä GII suoritettut analyysit

ddPCR-analyysin toimivuutta genoryhmällä GII testattiin analysoimalla kahta eri virus-tyyppiä (413 ja 5755) sekä kaksi GII dsDNA:n laimennossarjaa.

ddPCR:n herkkyyttä suhteessa qPCR:ään testattiin analysoimalla molemmilla menetelmillä NoV GII 413 -laimennossarja rinnakkaisilla näytteillä. Herkkyyttä ja menetelmän toimivuutta arvioitiin myös analysoimalla ddPCR:llä pintanäytteitä, paprikoista otettuja pintanäytteitä, vesinäytteitä ja jätevesinäytteitä, jotka oli analysoitu aiemmin qPCR:llä. Analyysin toimivuutta ja herkkyyttä arvioitiin sen perusteella, kuinka suuresta osasta qPCR:llä positiivisiksi todetuista näytteistä saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä.

Osa jätevesinäytteistä analysoitiin sekä ddPCR:llä että qPCR:llä. qPCR:ssä käytettiin standardeina ddPCR:llä analysoituja GII dsDNA -laimennoksia, joille annettiin pitoisuudet ddPCR-tulosten perusteella. Tuloksista laskettiin, paljonko eri menetelmillä mitatut pitoisuudet erosivat toisistaan.

Näytematriisin inhibition vaikutusta qPCR- ja ddPCR-analyyseihin genoryhmällä GII testattiin valmistamalla inhibitorinen ja ei-inhibitorinen laimennossarja GII EC RNA:sta taulukon 8 mukaisesti ja analysoimalla näytteet rinnakkaisina kummallakin menetelmällä. qPCR:ssä käytettiin standardeina ddPCR:llä analysoituja GII dsDNA -laimennoksia, joille annettiin pitoisuudet ddPCR-tulosten perusteella. Inhibitorinen marjaseos tehtiin sekoittamalla keväällä 2016 noroviruksen suhteen negatiivisiksi todettuja marjoista eristettyjä RNA-näytteitä, joita oli säilytetty -20 °C:ssa. Ei-inhibitorinen TGBE-seos (tris-glysiini beef extract) tehtiin sekoittamalla keväällä 2016 marja-analyyseissä negatiivisina kontrolleina käytettyjä TGBE:stä eristettyjä RNA-näytteitä, jotka oli myös todettu noroviruksen suhteen negatiivisiksi ja säilytetty -20 °C:ssa.

Taulukko 8. ddPCR:n ja qPCR:n inhibiovertailun näytteiden valmistus ja GII EC RNA:n suhteellinen määrä näytteissä.

Inhibitorisuus	Näyte	Valmistus	GII EC RNA
Inhibitorinen	Marja+RNA 1	5 µl GII EC RNA + 25 µl marjaseos	1:1
	Marja+RNA 2	5 µl Marja+RNA 1 + 25 µl marjaseos	1:6
	Marja+RNA 3	5 µl Marja+RNA 2 + 25 µl marjaseos	1:36
	Marja+RNA 4	5 µl Marja+RNA 3 + 25 µl marjaseos	1:216
Ei-inhibitorinen	TGBE+RNA 1	5 µl GII EC RNA + 25 µl TGBE-seos	1:1
	TGBE+RNA 2	5 µl TGBE+RNA 1 + 25 µl TGBE-seos	1:6
	TGBE+RNA 3	5 µl TGBE+RNA 2 + 25 µl TGBE-seos	1:36
	TGBE+RNA 4	5 µl TGBE+RNA 3 + 25 µl TGBE-seos	1:216

5 Tulokset

Mittaustulokset ddPCR:stä ja qPCR:stä, pisaroiden lukumäärät ddPCR:ssä ja näytteistä aiemmin tehtyjen qPCR-analysien tulokset on esitetty liitteessä 1.

5.1 Noroviruksen genoryhmän GI tulokset

Tulokset testistä, jolla arvioitiin kahden eri PCR-reaktioseoksen aluke- ja probekonsentraation vaikutusta ddPCR:llä määritettyyn pitoisuuteen ja ddPCR:n herkkyttä suhteessa qPCR:ään, on esitetty taulukossa 9. ddPCR:llä määritetyt pitoisuudet olivat reaktioseoksella 1 yhtä näytettä lukuun ottamatta suurempia kuin reaktioseoksella 2. Heikoin GI dsDNA -laimennos jäi ddPCR:ssä negatiiviseksi kummallakin rinnakkaisella näytteellä, mutta saatiin positiiviseksi toisessa qPCR:n rinnakkaisista näytteistä.

Taulukko 9. ddPCR- ja qPCR-tulokset NoV GI dsDNA -laimennossarjasta ja NoV GI positiivisesta kontrollista, joilla testattiin kahden eri PCR-reaktioseoksen aluke- ja probekonsentraation vaikutusta ddPCR:llä määritettyyn pitoisuuteen ja ddPCR:n herkkyttä suhteessa qPCR:ään.

Näyte	ddPCR		qPCR	
	Reaktioseos 1 kopiota/reaktio	Reaktioseos 2 kopiota/reaktio	Ct	Ct
GI dsDNA 10 ⁻⁶	44660		21,2	
GI dsDNA 10 ⁻⁷	4642	4180	24,7	24,6
GI dsDNA 10 ⁻⁸	469	464	27,6	27,9
GI dsDNA 10 ⁻⁹	35	44	31,0	31,3
GI dsDNA 10 ⁻¹⁰	8	2	33,1	33,8
GI dsDNA 10 ⁻¹¹	0	0	35,9	neg
GI pk	79	73	32,4	32,7

Paprikoista otettujen pintanäytteiden ja jätevesinäytteiden genoryhmän GI tulokset ddPCR:stä on esitetty taulukossa 10. Tulokset on esitetty muodossa positiivinen (+) tai negatiivinen (-). Taulukossa on esitetty myös, onko näyte todettu aikaisemmin positiiviseksi vai negatiiviseksi qPCR:llä sekä positiivisten ja negatiivisten tulosten kokonaismäärät ja vastaavuus eri menetelmillä. qPCR:llä positiiviseksi todettuja näytteitä oli 8, joista 7:stä saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä eli ddPCR:n suhteellinen herkkyys qPCR:ään verrattuna oli 88 %. Molemmat qPCR:n perusteella negatiiviset näytteet olivat negatiivisia myös ddPCR:ssä.

Taulukko 10. Paprikoista otettujen pintanäytteiden ja jätevesinäytteiden NoV GI:n tulokset ddPCR:stä ja aikaisemmat tulokset qPCR:stä muodossa positiivinen (+) tai negatiivinen (-) sekä positiivisten ja negatiivisten tulosten lukumäärät ja ddPCR:n suhteellinen herkkyys.

Näyte	ddPCR	qPCR	ddPCR							
			+	-	yht.					
Paprika 1 1:10	+	+	qPCR	+	7	1	8			
Paprika 5 1:10	+	+						-	2	2
Paprika 2 1:10	-	+						yht.	7	3
Paprika 4 1:10	-	-	Suhteellinen herkkyys				88 %			
Jätevesi 8	+	+								
Jätevesi 9	+	+								
Jätevesi 10	+	+								
Jätevesi 11	+	+								
Jätevesi 12	+	+								
Jätevesi 13	-	-								

Osterinäytteiden ddPCR- ja qPCR-tulosten rinnakkaisista näytteistä lasketut keskiarvot on esitetty taulukossa 11. Taulukossa on myös ddPCR:llä ja qPCR:llä määritettyjen näytteiden pitoisuuksien erotukset. ddPCR:n ja qPCR:n positiiviset ja negatiiviset tulokset vastasivat toisiaan kolmen näytteen osalta. ddPCR:llä saatiin positiivinen tulos yhdestä näytteestä, joka jäi qPCR:llä negatiiviseksi ja qPCR:llä positiivinen tulos yhdestä ddPCR:ssä negatiiviseksi jääneestä näytteestä. ddPCR:llä määritetyt pitoisuudet olivat keskimäärin 1,6 kopiota/reaktio suurempia kuin qPCR:llä. Näytteiden Ct-arvot olivat qPCR:ssä standardisuoran ulkopuolella.

Taulukko 11. Osterinäytteistä määritettyjen NoV GI -pitoisuuksien keskiarvot ddPCR:llä ja qPCR:llä sekä pitoisuuksien erotus.

Näyte	ddPCR kopiota/reaktio	qPCR kopiota/reaktio	ddPCR-qPCR kopiota/reaktio
Osteri 1	0	0,02	-0,02
Osteri 2.1	3,85	0	3,85
Osteri 2.2	0,99	0,01	0,98
Osteri 2.3	3,08	0,09	3,00
Osteri 3	0	0	0

Taulukossa 12 on esitetty eri ddPCR-ajoissa mukana olleista GI pk -näytteistä mitatut pitoisuudet. Taulukosta nähdään, että mitattujen pitoisuuksien vaihtelu oli hyvin vähäistä. Kaikista genoryhmän GI ddPCR-ajoissa mukana olleista negatiivisista vesikontrolleista saatiin negatiivinen tulos.

Taulukko 12. GI pk -näytteistä mitatut pitoisuudet eri ddPCR-ajoissa.

Näyte	ddPCR-ajo	kopiota/reaktio
GI pk	1	79,2
GI pk	2	77,0
GI pk	3	79,2
GI pk	3	79,2

5.2 Noroviruksen genoryhmän GII tulokset

Kaikilla testatuilla genoryhmän GII virustyypeillä, dsDNA:lla ja EC RNA:lla saatiin positiivinen tulos ddPCR:ssä ja qPCR:ssä (liite 1). GII dsDNA -laimennossarjojen ddPCR-tuloksista lasketut keskiarvot on esitetty taulukossa 13.

Taulukko 13. ddPCR:llä määritettyjen NoV GII dsDNA -näytteiden pitoisuuksien keskiarvot.

Näyte	kopiota/reaktio
GII dsDNA 10 ⁻⁷	12100
GII dsDNA 10 ⁻⁸	888
GII dsDNA 10 ⁻⁹	86
GII dsDNA 10 ⁻¹⁰	13

ddPCR:n herkkyden arvioinnissa käytettyjen GII 413 -laimennossarjan rinnakkaisnäytteiden pitoisuuksien keskiarvot ddPCR:llä ja qPCR:llä on esitetty taulukossa 14. qPCR:ssä positiiviset laimennokset olivat positiivisia myös ddPCR:ssä ja heikoin laimennos (1:640) oli kummallakin menetelmällä negatiivinen.

Pintanäytteiden, paprikoista otettujen pintanäytteiden, vesinäytteiden ja jätevesinäytteiden genoryhmän GII tulokset ddPCR:stä on esitetty taulukossa 15. Tulokset on esitetty muodossa positiivinen (+) tai negatiivinen (-). Taulukossa on esitetty myös, onko näyte todettu aikaisemmin positiiviseksi vai negatiiviseksi qPCR:llä sekä positiivisten ja negatiivisten tulosten kokonaismäärät ja vastaavuus eri menetelmillä. qPCR:llä positiiviseksi todettuja näytteitä oli 28, joista 26:sta saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä eli ddPCR:n

suhteellinen herkkyys qPCR:ään verrattuna oli 93 %. Yhdestä qPCR:n perusteella negatiivisesta näytteestä saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä.

Taulukko 14. NoV GII 413 -laimennossarjan rinnakkaisnäytteiden pitoisuuksien keskiarvot määritettynä ddPCR:llä ja qPCR:llä.

Näyte	ddPCR kopiota/reaktio	qPCR kopiota/reaktio
GII 413	975	723
GII 413 1:10	86	94
GII 413 1:40	31	38
GII 413 1:80	8	13
GII 413 1:160	4	6
GII 413 1:320	7	3
GII 413 1:640	0	0

Taulukko 15. Pintanäytteiden, paprikoista otettujen pintanäytteiden, vesinäytteiden ja jätevesinäytteiden NoV GII:n tulokset ddPCR:stä ja aikaisemmat tulokset qPCR:stä muodossa positiivinen (+) tai negatiivinen (-) sekä positiivisten ja negatiivisten tulosten lukumäärät ja ddPCR:n suhteellinen herkkyys.

Näyte	ddPCR	qPCR	Näyte	ddPCR	qPCR					
Pinta 1	+	+	Vesi 2	+	+					
Pinta 2	+	+	Vesi 2 1:10	+	+	qPCR	+	26	2	28
Pinta 3	+	+	Vesi 3	+	+		-	1	4	5
Pinta 4	+	+	Vesi 3 1:10	+	+		yht.	27	6	33
Pinta 5	+	+	Vesi 4	+	+	Suhteellinen herkkyys				
Pinta 6	+	+	Vesi 4 1:10	+	+					93 %
Pinta 7	+	+	Vesi 5	+	+					
Paprika 1	+	+	Vesi 5 1:10	-	+					
Paprika 1 1:10	-	+	Vesi 6	-	-					
Paprika 2	+	+	Vesi 6 1:10	-	-					
Paprika 3	+	+	Jätevesi 7	+	+					
Paprika 3 1:10	+	+	Jätevesi 8	+	+					
Paprika 4	-	-	Jätevesi 9	+	+					
Paprika 4 1:10	+	-	Jätevesi 10	+	+					
Paprika 5 1:10	+	+	Jätevesi 11	+	+					
Vesi 1	+	+	Jätevesi 12	+	+					
Vesi 1 1:10	-	-								

ddPCR:llä ja qPCR:llä analysoitujen jätevesinäytteiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 16. qPCR-tuloksista on esitetty rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksista lasketut keskiarvot. Taulukossa on myös ddPCR:llä ja qPCR:llä määritettyjen näytteiden pitoisuuksien erotukset. Kaikkien positiivisten näytteiden ddPCR:llä määritetty pitoisuus oli suurempi kuin qPCR:llä. Keskimääräinen ero oli 30 kopiota/reaktio. qPCR:llä määritetyt pitoisuudet olivat keskimäärin 62 kopiota/reaktio eli noin 80 % pienempiä kuin qPCR:llä vuonna 2014 määritetyt pitoisuudet (liite 1).

Taulukko 16. Jätevesinäytteistä määritetyt NoV GII -pitoisuudet ddPCR:llä ja qPCR:llä sekä pitoisuuksien erotus. qPCR-tuloksista on esitetty rinnakkaisten näytteiden keskiarvot.

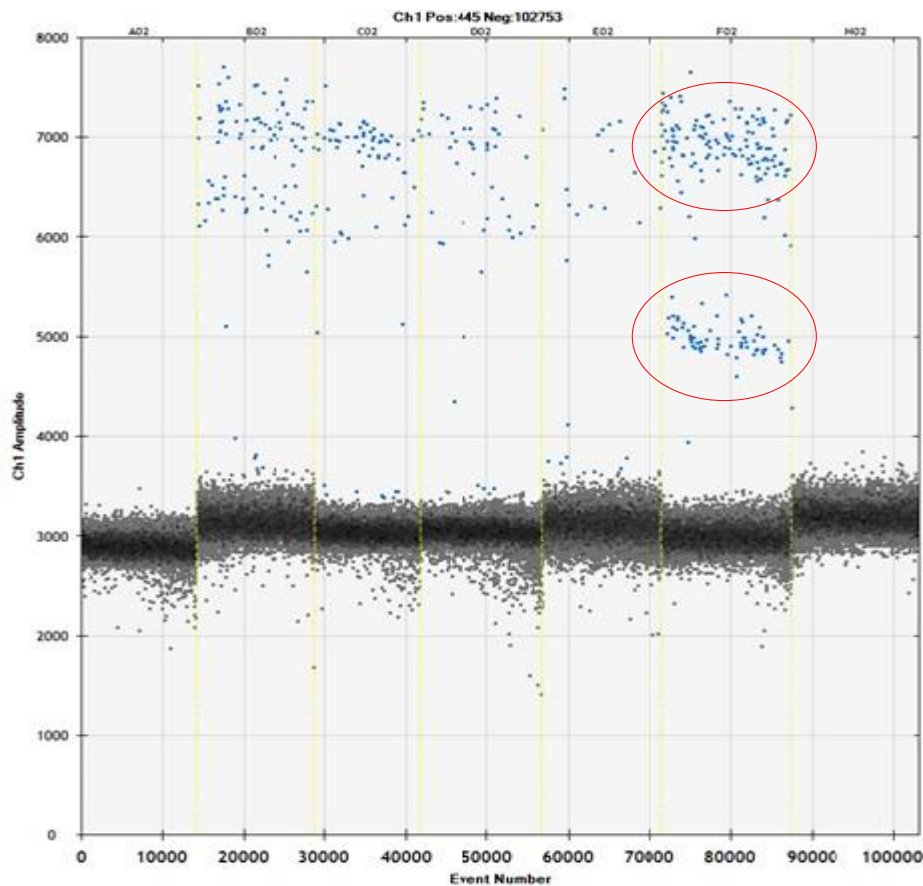
Näyte	ddPCR kopiota/reaktio	qPCR kopiota/reaktio	ddPCR-qPCR kopiota/reaktio
Jätevesi 1	10	8	2
Jätevesi 2	141	15	126
Jätevesi 3	3	1	2
Jätevesi 4	79	72	7
Jätevesi 5	42	2	40
Jätevesi 6	0	0	0

Inhibitorisen ja ei-inhibitorisen GII EC RNA -laimennossarjan tulokset ddPCR:stä ja qPCR:stä on esitetty taulukossa 17. Taulukossa on rinnakkaisista näytteistä määritettyjen pitoisuuksien keskiarvot kummallakin menetelmällä. ddPCR:ssä ei ollut selkeää eroa inhibitorisista ja ei-inhibitorisista näytteistä määritettyjen GII EC RNA -pitoisuuksien välillä. qPCR:ssä näytteistä Marja+RNA 1 ja Marja+RNA 2 määritetyt pitoisuudet olivat pienempiä kuin saman verran EC RNA:ta sisältävistä näytteistä TGBE+RNA 1 ja TGBE+RNA 2 määritetyt pitoisuudet. Näytteet Marja+RNA 3 ja Marja+RNA 4 olivat negatiivisia, mutta TGBE+RNA 3 ja TGBE+RNA 4 positiivisia.

Taulukko 17. Inhibitorisen ja ei-inhibitorisen GII EC RNA -laimennossarjan rinnakkaisnäytteiden ddPCR:llä ja qPCR:llä määritettyjen pitoisuuksien keskiarvot.

Inhibitorisuus	Näyte	ddPCR kopiota/rektio	qPCR kopiota/rektio
Inhibitorinen	Marja+RNA 1	686	72
	Marja+RNA 2	103	1,4
	Marja+RNA 3	22	0
	Marja+RNA 4	1,4	0
Ei-inhibitorinen	TGBE+RNA 1	590	139
	TGBE+RNA 2	136	13
	TGBE+RNA 3	13	3,5
	TGBE+RNA 4	1,7	0,3

Kuvassa 5 on ddPCR-laitteella analysoitujen jätevesinäytteiden fluoresenssikuvaaja. Jätevesinäytteestä 12 kuopassa F02 erottui selkeästi kaksi eri voimakkuudella fluoresoivaa positiivisten pisaroiden ryhmää, jotka on merkitty kuvaan punaisilla renkailla.



Kuva 5. ddPCR:llä mitatut pisaroiden fluoresenssit (y-akseli) jätevesinäytteistä. Kuopassa F02 (Jätevesi 12) näytteestä erottuu selkeästi kaksi eri tasolla fluoresoivaa positiivisten pisaroiden ryhmää, jotka on merkitty punaisilla renkailla.

6 Tulosten tarkastelu

ddPCR-menetelmällä tunnistettiin positiivisiksi kaikki testatut noroviruksen genoryhmien GI ja GII erityyppiset RNA- ja dsDNA-näytteet ja negatiivisina kontrolleina käytetyistä vesinäytteistä saatiin kaikista negatiivinen tulos, joten menetelmä toimi noroviruksen genoryhmien GI ja GII tunnistuksessa. ddPCR:ssä käytettiin ennestään qPCR:ssä käytössä olleita alukkeita ja probeja ja ddPCR-ohjelma suunniteltiin qPCR-ohjelman pohjalta. Myös muissa tutkimuksissa [2; 16] on saatu qPCR-analyysi toimimaan ddPCR-laitteella ilman muutoksia tai vähäisillä muutoksilla, mikä helpottaa ddPCR-menetelmän käyttöönottoa qPCR-analyysien tilalle tai rinnalle.

Noroviruksen genoryhmällä GI testattujen aluke- ja probekonsentraatioiden välillä ei ollut suurta eroa mitatuissa dsDNA-pitoisuuksissa. Mitatut pitoisuudet olivat keskimäärin hie-man suurempia reaktioseoksella 1, jossa alukkeiden ja proben pitoisuudet olivat samat kuin genoryhmällä GII, joten reaktioseosta 1 päätettiin käyttää NoV GI -analyyseissä.

ddPCR:llä analysoitiin GI pk -näytteen pitoisuus kolmessa eri ajossa, ja näytteestä mitattu pitoisuus vaihteli hyvin vähän ajojen välillä (77,0–79,2 kopiota/reaktio), mikä viittaa menetelmän hyvään toistettavuuteen. NoV GII -analyyseissä rinnakkaisista näytteistä mitatut pitoisuudet olivat melko lähellä toisiaan, mutta jonkin verran vaihtelua esiintyi (liite 1). Etenkään pienillä pitoisuuksilla GII 413 -laimennossarjasta ddPCR:llä mitatut pitoisuudet eivät noudattaneet odotettuja suhteita (taulukko 15). ddPCR:llä ei pystytty erottamaan kaksinkertaisia pitoisuseroja näytteiden välillä, vaikka laitteella pitäisi pystyä havaitsemaan 1,2-kertaiset pitoisuserot [3] ja samoista näytteistä qPCR:llä määritetyt pitoisuudet noudattivat melko hyvin odotettuja suhteita. Pienessä näytemäärässä tämä voi selittyä ainakin osittain mittausepävarmuudella. Erot ddPCR:llä mitattujen rinnakkaisnäytteiden pitoisuuksissa osoittavat, että useampien rinnakkaisnäytteiden analysoiminen on tarpeellista tarkkojen kvantitatiivisten tulosten saamiseksi.

NoV GI -analyysi oli ddPCR:llä vähemmän herkkä kuin qPCR:llä sekä GI dsDNA -laimennossarjan että paprika- ja jätevesinäytteiden perusteella arvioituna. GI dsDNA -laimennossarjan heikoin näyte jäi ddPCR:ssä negatiiviseksi, mutta saatiin qPCR:ssä positiiviseksi toisessa rinnakkaisista näytteistä. Tosin jos ddPCR:llä määritetyt pitoisuudet pitävät paikkansa ja laimennossarja oli hyvin onnistunut, niin heikoimman näytteen pitoisuus oli alle 1 kopio/reaktio, jolloin sattuma voi selittää eroa ddPCR:n ja qPCR:n välillä.

qPCR:llä positiiviseksi todetuista 8:sta paprika- ja jätevesinäytteestä 7:stä saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä eli ddPCR:n suhteellinen herkkyys qPCR:ään verrattuna oli 88 %. Näytteitä oli kuitenkin säilytetty pitkään qPCR:n jälkeen ja niissä oli alun perinkin pieni pitoisuus RNA:ta, joten ddPCR:n heikompi tulos voi johtua myös RNA:n hajoamisesta näytteissä. Tarvittaisiin siis lisää mittauksia menetelmien herkkyseron varmistamiseksi, mutta tulosten perusteella qPCR-menetelmä vaikuttaa hieman ddPCR-menetelmää herkemältä NoV GI -analyysissä.

Myös NoV GII -analyysi oli ddPCR:llä qPCR:ää vähemmän herkkä aiemmin qPCR:llä analysoitujen pinta-, paprika-, vesi- ja jätevesinäytteiden perusteella arvioituna. qPCR:llä positiiviseksi todetuista 28 näytteestä 26:sta saatiin positiivinen tulos ddPCR:llä eli ddPCR:n suhteellinen herkkyys qPCR:ään verrattuna oli 93 %. Tämänkin tuloksen luotettavuutta heikentää näytteiden pitkäaikainen säilytys ja RNA:n mahdollinen hajoaminen qPCR:n jälkeen. Yhdestä qPCR:n perusteella negatiivisesta näytteestä saatiin ddPCR:llä positiivinen tulos, mikä ei kuitenkaan välttämättä viittaa ddPCR:n parempaan NoV GII:n tunnistamiseen, vaan saattaa olla kontaminaatio, koska saman näytteen laimentamattomasta versiosta saatiin molemmilla menetelmillä negatiivinen tulos.

NoV GII 413 -laimennossarjan perusteella arvioituna ddPCR-menetelmä oli yhtä herkkä kuin qPCR-menetelmä, koska kummallakin menetelmällä tunnistettiin yhtä heikko laimennos NoV GII -positiiviseksi. NoV GII -analyysin herkkyyttä arvioitaessa tätä tulosta voidaan pitää luotettavampana kuin vanhojen RNA-näytteiden perusteella saatua tulosta, koska näytteitä ei jouduttu säilyttämään pitkään qPCR- ja ddPCR-analyyseiden välillä.

Sekä qPCR:llä että ddPCR:llä analysoitujen jätevesien positiiviset ja negatiiviset tulokset vastasivat toisiaan. NoV GII -pitoisuudet olivat keskimäärin 30 kopiota/reaktio suurempia ddPCR:llä mitattuna, mikä vahvistaa käsitystä NoV GII -analyysin toimivuudesta ja hyvästä herkkyydestä ddPCR:llä ja voi viitata vähäisempään inhibitioon ddPCR:ssä. qPCR:llä mitatut pitoisuudet olivat keskimäärin 80 % pienempiä kuin qPCR:llä vuonna 2014 mitatut pitoisuudet, mikä voi johtua osittain erilaisesta standardien pitoisuuksien määrittämenetelmästä ja osittain näytteiden hajoamisesta. Yleensä RNA-näytteiden voidaan olettaa kestävän hajoamatta noin vuoden -80 °C:ssa säilytettynä [17], joten -70 °C:ssa 2 vuoden ajan säilytetyissä näytteissä oli luultavasti tapahtunut jonkin verran hajoamista. Näytteiden mahdollinen hajoaminen oli syynä siihen, että näytteitä, joiden qPCR-analyysi oli tehty aiemmin, tarkasteltiin vain kvalitatiivisesti.

Inhibition vaikutusta NoV GI -analyysiin qPCR:llä ja ddPCR:llä pyrittiin arvioimaan analysoimalla osterinäytteitä kummallakin menetelmällä. ddPCR:llä määritetyt pitoisuudet olivat keskimäärin hieman suurempia (1,6 kopiota/reaktio) kuin qPCR:llä, mutta menetelmien välillä ei havaittu selkeää eroa. Näytteet jouduttiin pakastamaan ja sulattamaan ddPCR:n jälkeen ennen qPCR:ää, mikä saattoi vaikuttaa näytteiden RNA-pitoisuuteen, ja näytteiden Ct-arvot olivat qPCR:ssä standardisuoran ulkopuolella, joten qPCR:llä mitattuja pitoisuuksia ei voida pitää kovin luotettavina. Koska ddPCR:llä mitatut pitoisuudet olivat suurempia, inhiboivalla näytematriisilla vaikuttaa olevan vähemmän merkitystä ddPCR:ssä, mutta tuloksista ei voi tehdä kovin luotettavia päätelmiä.

Inhibition vaikutusta NoV GII -analyysiin testattiin inhibitorisella ja ei-inhibitorisella GII EC RNA -laimennossarjalla. Tulosten perusteella ddPCR oli qPCR:ää vähemmän herkkä inhibitiolle, koska ddPCR:ssä ei ollut selkeää eroa inhibitorisista ja ei-inhibitorisista näytteistä määritettyjen GII EC RNA -pitoisuuksien välillä, toisin kuin qPCR:ssä. qPCR:ssä inhibitorisista näytteistä määritetyt pitoisuudet olivat pienempiä kuin ei-inhibitoristen näytteiden pitoisuudet ja heikoimmista inhibitorisista näytteistä saatiin negatiivinen tulos. NoV GII -analyysin inhibitiotestin tulokset vahvistavat aiempaa käsitystä siitä, että ddPCR on qPCR:ää vähemmän herkkä näytematriisin sisältämille PCR-reaktiota inhiboiville yhdisteille [2; 16].

Jätevesinäytteen 12 ddPCR-analyysissä (kuva 5) tuli esiin ddPCR-menetelmän ominaisuus, jota ei ole qPCR:ssä: yksillä alukkeilla ja probella havaittiin näytteen sisältävän kahta erilaista templaattia. Jätevesinäytteen 12 ddPCR:n fluoresenssikuvauksessa erottui kaksi eri voimakkuudella fluoresoivaa positiivisten pisaroiden ryhmää, mikä tarkoittaa sitä, että näytteessä oli kohdesekvenssin lisäksi toista kohdesekvenssistä hieman eroavaa sekvenssiä, jonka osalta reaktiotehokkuus ja siten myös fluoresenssin taso olivat heikompia kuin kohdesekvenssillä. Kyseessä voi olla esimerkiksi SNP (single nucleotide polymorphism), jossa sekvenssit eroavat yhden nukleotidin verran toisistaan. [18.] Tällaisen informaation saaminen näytteestä voi olla monissa tutkimuksissa kiinnostavaa.

NoV GII -analyysi toimi tulosten perusteella hyvin ddPCR:llä, mutta NoV GI -analyysin herkkyys jäi kyseenalaiseksi. NoV GI -analyysin toimivuuden varmistamiseksi olisi hyvä tehdä lisää mittauksia ja analysoida näytteitä sekä ddPCR:llä että qPCR:llä. Analyysissä kannattaisi selvittää ainakin optimaalinen annealing/ekstensio-lämpötila, joka voi olla ddPCR:ssä eri kuin qPCR:ssä, koska kittien reaktioseokset eroavat muun muassa suo-

lakonsentraation osalta toisistaan. NoV GI -analyysin herkkyyttä voisi selvittää analysoimalla useampia dsDNA-laimennossarjoja ddPCR:llä ja qPCR:llä. Tulosten perusteella ddPCR vaikuttaa kuitenkin lupaavalta menetelmältä noroviruksen analysoinnissa.

7 Yhteenveto

Työssä selvitettiin norovirusanalyysin toimivuutta ddPCR-laitteella. Norovirusanalyysin herkkyyttä ddPCR:llä suhteessa ennestään käytössä olleeseen qPCR-menetelmään arvioitiin erikseen noroviruksen genoryhmillä GI ja GII analysoimalla RNA- ja DNA-näytteitä. Työssä tutkittiin myös näytematriisien sisältämien PCR-inhibiittorien vaikutusta noroviruksen analysointiin ddPCR- ja qPCR-laitteilla.

Osa työssä analysoiduista näytteistä oli pakastimessa säilytettyjä näytteitä projekteista vuosilta 2013–2015. Kaikkia näytteitä ei ollut jäljellä riittävästi sekä ddPCR- että qPCR-analyysien tekemiseen, joten osa näytteistä analysoitiin vain ddPCR:llä, ja tuloksia verrattiin näytteistä aiemmin qPCR:llä saatuihin tuloksiin. Tuloksia jouduttiin vertaamaan vain kvalitatiivisesti, koska työssä määritetyt pitoisuudet eivät olleet vertailukelpoisia aiemmin määritettyjen pitoisuuksien kanssa näytteissä mahdollisesti tapahtuneen RNA:n hajoamisen takia. Tulosten kvalitatiivisesta vertaamisesta saatiin kuitenkin tietoa analyysin toimivuudesta ja herkkyydestä ddPCR:llä.

Tulosten perusteella ddPCR-analyysi toimi hyvin noroviruksen genoryhmällä GII. Menetelmän herkkyys oli dsDNA-laimennossarjan perusteella arvioituna yhtä hyvä kuin qPCR:llä. Genoryhmällä GI ddPCR:n suhteellinen herkkyys qPCR:ään verrattuna oli 88 % ja qPCR:llä tunnistettiin positiiviseksi heikompi dsDNA-laimennos kuin ddPCR:llä, mutta pienen näytemäärän ja vanhojen näytteiden takia tulokset jäivät hieman epävarmoiksi. Tulokset viittaavat kuitenkin siihen, että NoV GI -analyysiä on syytä optimoida tarkemmin ddPCR-laitteelle.

PCR-inhibiittoreilla havaittiin olevan vähemmän vaikutusta ddPCR:llä kuin qPCR:llä määritettyyn NoV GII -pitoisuuteen. NoV GII -analyysi oli siis ddPCR:llä vähemmän herkkä näytematriisin aiheuttamalle inhibitiolle kuin qPCR:llä, mikä oli odotettua muilla viruksilla aiemmin tehtyjen tutkimusten perusteella.

Kirjallisuudessa ei ollut ennestään juurikaan tietoa noroviruksen analysoinnista ddPCR-laitteella. Työssä saatiin selvitettyä, että ddPCR:ää voidaan tarvittaessa käyttää qPCR:n sijaan ainakin noroviruksen genoryhmän GII analysoinnissa ja että menetelmä toimii myös genoryhmällä GI, mutta halutun herkkyuden saavuttamiseksi NoV GI -menetelmää on syytä optimoida. Tutkimusryhmässä ei ole tarkoituksena siirtyä käyttämään ddPCR:ää rutiininomaisesti qPCR:n tilalla, mutta ddPCR:ää voidaan hyödyntää jatkossa esimerkiksi inhibitorisia näytematriiseja tutkittaessa tai noroviruksen ja referenssimateriaalien kvantitatiivisessa määrittämisessä.

Lähteet

- 1 Carter, M.J. (2005), Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1354–1380.
- 2 N. Rački, D. Morisset, I. Gutierrez-Aquirre & M. Ravnikar. 2013. One-step RT-droplet digital PCR: A breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(3):661-7.
- 3 Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) Technology. Verkkoteksti. <<http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology>> Luettu 30.9.2016.
- 4 Lucy G. Thorne & Ian G. Goodfellow. 2014. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 95: 278–291.
- 5 Roger. I. Glass, Umesh. D. Parashar & Mary. K. Estes. 2009. Norovirus Gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 361(18), 10.
- 6 Pixion. Free images. 2014. Verkkosivu. <<http://www.pixnio.com/science/microscopy-images/norovirus-infection/transmission-electron-micrograph-revealed-some-of-the-ultrastructural-morphology-displayed-by-norovirus-virions>> Luettu 5.11.2016.
- 7 Jukka Lumio. 2012. Norovirus. Verkkoteksti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00738>. Luettu 6.10.2016.
- 8 Aron J. Hall, Roger I. Glass & Umesh D. Parashar. 2016. New insights into the global burden of noroviruses and opportunities for prevention, *Expert Review of Vaccines*, 15:8, 949–951.
- 9 Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One*. 2015;10(12):e0142927.
- 10 Norovirus. 12.5.2014. Diagnostic Methods. Verkkoteksti. <<http://www.cdc.gov/norovirus/lab-testing/diagnostic.html>>. Luettu 10.10.2016.
- 11 Baylor College of Medicine. Solving a 48 year old mystery: Scientists grow noroviruses in human intestinal cell cultures. *ScienceDaily*, 25 August 2016. Verkkoteksti. <www.sciencedaily.com/releases/2016/08/160825172254.htm>. Luettu 10.10.2016.
- 12 ISO/TS 15216-1:2013(E). Microbiology of the food chain – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantification. Tekninen spesifikaatio.

- 13 Bio-Rad Laboratories. Droplet Digital™ PCR Applications Guide. Pdf-tiedosto. <www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf> Luettu 13.10.2016.
- 14 Bio-Rad Laboratories. Absolute Quantification of PCR Targets with the Droplet Digital™ PCR System. Verkkoteksti. <<http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/absolute-quantification-pcr-targets-with-droplet-digital-pcr-system#Poisson>> Luettu 13.10.2016.
- 15 Thermo Fisher Scientific. qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR. Verkkoteksti. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html>> Luettu 18.10.2016.
- 16 Morisset D., Štebih D., Milavec M., Gruden K., Zel J. 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. PLoS ONE 8:e62583 10.1371/journal.pone.0062583.
- 17 Thermo Fisher Scientific. Technical Bulletin #159: Working with RNA. Verkkoteksti. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/ambion-tech-support/nuclease-enzymes/general-articles/working-with-rna.html>> Luettu 25.10.2016.
- 18 Larshammar, Pelle. 2016. Instrument & Application Specialist. Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg. Sähköposti 10.8.2016.

Mittaustulokset ja aiemmin mitatut qPCR-tulokset

NoV GI						
Näyte	ddPCR		qPCR		qPCR vuodelta 2013–2015 kopiota/reaktio	Huom.
	kopiota/reaktio	Pisaroiden lkm	Ct	kopiota/reaktio		
GI dsDNA 10 ⁻⁶	44660	11764	21,18			Reaktioseos 1
GI dsDNA 10 ⁻⁷	4642	11702	24,66			
GI dsDNA 10 ⁻⁸	468,6	14524	27,55			
GI dsDNA 10 ⁻⁹	35,2	12756	31,02			
GI dsDNA 10 ⁻¹⁰	7,92	13136	33,06			
GI dsDNA 10 ⁻¹¹	0	11739	35,88			
GI pk	79,2	10589	32,35			
GI dsDNA 10 ⁻⁷	4180	13941	24,61			Reaktioseos 2
GI dsDNA 10 ⁻⁸	464,2	16958	27,88			
GI dsDNA 10 ⁻⁹	44	14405	31,32			
GI dsDNA 10 ⁻¹⁰	1,98	12895	33,76			
GI dsDNA 10 ⁻¹¹	0	14373	neg			
GI pk	72,6	16339	32,72			
Paprika 1 1:10	1,54	16948			4,13	
Paprika 5 1:10	10,56	14861			15,69	
Paprika 2 1:10	0	15527			5,84	
Paprika 4 1:10	0	15282			0	
Jätevesi 8	79,2	14790			23,15	
Jätevesi 9	39,6	13595			5,5	
Jätevesi 10	39,6	12947			17,25	
Jätevesi 11	19,8	9639			19,4	
Jätevesi 12	26,4	11209			2,15	
Jätevesi 13	0	7748			0	
Osteri 1	0	7845	neg	0		
Osteri 1	0	11365	40,97	0,04		
Osteri 2.1	1,98	12821	neg	0		
Osteri 2.1	5,72	13392	neg	0		
Osteri 2.2	0	9820	neg	0		
Osteri 2.2	1,98	13172	42,13	0,02		
Osteri 2.3	6,16	12629	40,02	0,09		
Osteri 2.3	0	11389	40,23	0,08		
Osteri 3	0	12540	neg	0		
Osteri 3	0	12551	neg	0		

NoV GII					
Näyte	ddPCR		qPCR		qPCR vuodelta 2013–2015 kopiota/reaktio
	kopiota/reaktio	Pisaroiden lkm	Ct	kopiota/reaktio	
GII 5755	1423,4	15856	26,36	1049,55	
GII dsDNA 10 ⁻⁷	11814	12077			
GII dsDNA 10 ⁻⁸	948,2	12361			
GII dsDNA 10 ⁻⁹	92,4	14192			
GII dsDNA 10 ⁻¹⁰	12,32	16745			
GII dsDNA 10 ⁻⁷	12386	15060			
GII dsDNA 10 ⁻⁸	827,2	16151			
GII dsDNA 10 ⁻⁹	79,2	14580			
GII dsDNA 10 ⁻¹⁰	14,08	14733			
GII 413	974,6	12543	26,8	723,09	
GII 413 1:10	85,8	13196	29,82	93,46	
GII 413 1:40	30,8	13273	31,15	38,22	
GII 413 1:80	10,34	12621	32,34	17,04	
GII 413 1:80	5,28	14722	33,34	8,66	
GII 413 1:160	1,76	14583	33,51	7,71	
GII 413 1:160	5,94	13056	34,32	4,45	
GII 413 1:320	9,46	13683	34,85	3,12	
GII 413 1:320	3,52	15050	35,03	2,76	
GII 413 1:640	0	17762	neg	0	
GII 413 1:640	0	15928	neg	0	
Marja+RNA 1	688,6	8199	29,56	89,6	
Marja+RNA 1	684,2	15500	30,26	54,7	
Marja+RNA 2	112,2	13511	35,12	1,7	
Marja+RNA 2	94,6	14446	35,77	1,1	
Marja+RNA 3	26,4	11773	neg	0	
Marja+RNA 3	17,6	13870	neg	0	
Marja+RNA 4	0	15247	neg	0	
Marja+RNA 4	2,86	17911	neg	0	
TGBE+RNA 1	554,4	11695	29,91	69,7	
TGBE+RNA 1	624,8	16209	28,36	208,6	
TGBE+RNA 2	134,2	15790	32,4	12	
TGBE+RNA 2	138,6	15263	32,13	14,6	
TGBE+RNA 3	12,76	16214	33,67	4,9	
TGBE+RNA 3	13,42	15463	34,96	2	
TGBE+RNA 4	1,76	14841	neg	0	
TGBE+RNA 4	1,54	15921	36,58	0,6	

NoV GII					
Näyte	ddPCR		qPCR		qPCR vuodelta 2013-2015 kopiota/reaktio
	kopiota/reaktio	Pisaroiden lkm	Ct	kopiota/reaktio	
Pinta 1	3,52	14729	34,7		
Pinta 2	1287	12916	26,0		
Pinta 3	121	13025	29,5		
Pinta 4	9,68	15867	35,2		
Pinta 5	189,2	14292	30,9		
Pinta 6	2948	13868	22,4		
Pinta 7	468,6	13890	28,5		
Paprika 1	4,18	12529			18,3
Paprika 1 1:10	0	13918			2,4
Paprika 2	17,6	13100			69,0
Paprika 3	99	14020			307,6
Paprika 3 1:10	7,92	13545			43,1
Paprika 4	0	16138			0
Paprika 4 1:10	15,4	13213			0
Paprika 5 1:10	1,76	14892			11,7
Vesi 1	6,6	15432			71,59
Vesi 1 1:10	0	15062			0
Vesi 2	7,7	16802			155,16
Vesi 2 1:10	1,54	15784			2,16
Vesi 3	61,6	15612			1395,75
Vesi 3 1:10	33	13942			199,63
Vesi 4	211,2	18743			1371,10
Vesi 4 1:10	26,4	15933			321,13
Vesi 5	26,4	12632			400,19
Vesi 5 1:10	0	16050			28,59
Vesi 6	0	13304			0
Vesi 6 1:10	0	15026			0
Jätevesi 1	10,12	15294	33,49	7,81	23,5
Jätevesi 2	140,8	15253	32,3/32,81	14,965	86,5
Jätevesi 3	3,3	15683	35,96/neg	0,735	0
Jätevesi 4	79,2	15626	30,2	72,26	296
Jätevesi 5	41,8	15717	34,31/neg	2,245	27
Jätevesi 6	0	14355	neg	0	39,5
Jätevesi 7	7,04	14814			245
Jätevesi 8	171,6	14566			346,35
Jätevesi 9	123,2	12893			154,55
Jätevesi 10	81,4	15116			178,85
Jätevesi 11	30,8	14641			109,05
Jätevesi 12	323,4	15985			388,3