

Essi Haltia

EGFR-geenin Thr790Met-mutaatiotestin pystyttäminen Droplet Digital PCR -menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

20.4.2017

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Essi Haltia EGFR-geenin Thr790Met-mutaatiotestin pystyttäminen Droplet Digital PCR -menetelmällä 28 sivua + 2 liitettä 20.4.2017
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Heidi Malava Sairaalageneetikko Soili Kytölä
<p>Opinnäytetyön tarkoitus oli pystyttää Droplet Digital PCR (ddPCR) -menetelmällä toimiva testi EGFR-geenin Thr790Met-mutaation ilmenemisen seurantaan. Seuranta on tarkoitettu ei-pienisoluisista keuhkosyöpä sairastaville potilaille, joita on hoidettu tyrosiinikinaasin estäjillä (TKI), jotta voidaan ennakoida hoidon myötä kehittyvää TKI-resistenssiä. Lisäksi testille laadittiin työohje.</p> <p>Testi otettiin käyttöön analysoimalla 59 parafiinileikkeistä eristettyä DNA-näytettä. Osa näytteistä oli tunnettuja Thr790Met-positiivisia näytteitä ja osa negatiivisia, suurin osa näytteistä oli eristetty keuhkokudoksesta ja jotkin vertailunäytteet myös muista kudoksista kuin keuhkoista. Referenssimenetelminä käytettiin uuden sukupolven sekvensointia (NGS) ja reaaliaikaista kvantitatiivista PCR:ää (qPCR). Tulokset analysoitiin QuantaSoft Analysis Pro -ohjelmistolla ja Microsoft Office Excel -taulukkolaskentaohjelmalla.</p> <p>Droplet Digital PCR -testillä saadut tulokset olivat toistettavia ja selkeitä ja menetelmä osoittautui kohtuullisen sensitiiviseksi ja spesifiseksi. Testi myös toimi puhtaasti, sillä lähes kaikki käytetyt vesikontrollit säilyivät puhtaina prosessin ajan. Saadut ddPCR-tulokset eivät kuitenkaan olleet aivan niin yhteneviä referenssitulosten kanssa kuin olisi voinut toivoa.</p> <p>Tuloksista voidaan päätellä, että Droplet Digital PCR on toimiva menetelmä EGFR-geenin Thr790Met-mutaation seurantaan.</p>	
Avainsanat	Droplet Digital PCR, ei-pienisoluisen keuhkosyöpä, EGFR-mutaatio

Author Title	Essi Haltia Implementation of a Droplet Digital PCR -Test for Monitoring EGFR-Gene's Thr790Met-Mutation
Number of Pages Date	28 pages + 2 appendices 20 April 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Heidi Malava, Senior Lecturer Soili Kytölä, Medical Geneticist
<p>The purpose of this study was to set up a Droplet Digital PCR -test for monitoring EGFR-gene's Thr790Met-mutation from non-small cell lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors (TKI) to predict developing TKI-resistance. As this was my final project I also wrote a working instruction for this test.</p> <p>The implementation of the test was made by examining 59 DNA-samples extracted from paraffin-embedded tissue samples, some of which were known to be positive with Thr790Met-mutation and some negative. Most samples were extracted from lung tissue but some reference samples were also extracted from other tissues than lung. I used Next Generation Sequencing (NGS) and real-time quantitative PCR (qPCR) as reference methods by comparing the results discovered with them and Droplet Digital PCR (ddPCR). I analysed the results with QuantaSoft Analysis Pro -software and Microsoft Office Excel.</p> <p>The results of this Droplet Digital PCR -test were repeatable and clear and method seemed to be quite sensitive and specific. The test also performed purely, as almost all water controls stayed clean during the process. Compared to results gained with reference methods, ddPCR-results were not always as similar as I would have hoped them to be.</p> <p>The results lead to the conclusion that Droplet Digital PCR is a suitable method for monitoring EGFR-gene's Thr790Met-mutation.</p>	
Keywords	Droplet Digital PCR, non-small cell lung cancer, EGFR-mutation

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Työn tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	2
3	EGFR-geenin mutaatiot ei-pienisoluisessa keuhkosityvässä	2
3.1	Keuhkosityvän diagnosointi ja seuranta	3
3.2	Ei-pienisoluisen keuhkosityvän hoito	4
3.3	EGFR-geenin mutaatiot	4
3.3.1	Thr790Met-mutaatio	5
4	Genetiikan tutkimuksissa käytettyjä menetelmiä	5
4.1	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR	6
4.2	Next-Generation Sequencing	7
5	Droplet Digital PCR	8
5.1	Laitteisto ja reagenssit	9
5.2	Analysointiohjelmisto	10
6	Opinnäytetyön toteutus	12
6.1	Testisarjojen suunnittelu ja käytännön työskentely	13
6.2	Tulosten analysointi	15
6.3	Työohjeen kirjoittaminen	18
7	Tulokset ja tulosten tarkastelu	19
7.1	Eri DNA-pitoisuudet ja laimennossarjat	20
7.2	Vertailu NGS- ja qPCR-tuloksiin	21
7.3	Luotettavuus ja eettisyys	22
8	Pohdinta	23
	Lähteet	26
	Liitteet	
	Liite 1. Työohje	
	Liite 2. Tulokset	

1 Johdanto

Keuhkosyöpä on maailman yleisin ja eniten kuolemia aiheuttava syöpä, jonka tärkein aiheuttaja on tupakointi (Mali 2013c). Keuhkosyövät jaetaan pienisoluisiin ja ei-pienisoluisiin syöpiin, joista ei-pienisoluiset jaotellaan lisäksi alaryhmiksi levyepiteelikarsinoomiksi, adenokarsinoomiksi ja suurisoluiseksi karsinoomaksi (Knuutila 2014b). EGFR-geenin mutaatioita tavataan keuhkojen levyepiteelisyövissä ja adenokarsinoomissa, joissa mutaatio ilmentyessään aktivoi EGF-reseptorin kiihdyttäen syövän kasvua ja kasvaimen laajenemista. Ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoitoennuste on kuitenkin hyvä, sillä kasvaimet vastaavat hyvin sekä solunsalpaajiin että tyrosiinikinaasin estäjiin. (Mali 2013a.) Hoidettaessa EGFR-geenin mutaation aiheuttamaa keuhkosyöpää tyrosiinikinaasin estäjillä kasvaimelle kehittyy kuitenkin resistenssi lääkehoitoa vastaan. Resistenssin aiheuttaa usein EGFR-geenin Thr790Met-mutaatio. (Mali 2013b.)

Tällä hetkellä EGFR-geenin mutaatioita tutkitaan HUSLABin (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriolikelaitoksen) genetiikan laboratoriossa uuden sukupolven sekvensointimenetelmällä (Next Generation Sequencing, NGS), mutta tulevaisuudessa on tarkoitus siirtyä keuhkosyövän hoidon seurannassa uuteen Droplet Digital PCR -menetelmään ainakin Thr790Met-mutaation tutkimisessa.

Droplet Digital PCR -menetelmä perustuu useisiin rinnakkaisiin PCR-reaktioihin, jotka tapahtuvat vesi-öljy-emulsion muodostamisessa pisaroissa. Reagensseina käytetään TaqMan-reagensseja, joiden värjätyt koettimet ilmaisevat etsityn mutanttigeenin ja villin tyyppin geenin esiintymisen. Reaktioiden tulokset luetaan pisaranlukijalla, joka toimii kuten virtaussytometri lukien pisaroiden lähettämän fluoresenssin aallonpituutta. Tulosten analysointi perustuu positiivisten ja negatiivisten pisaroiden määriin ja osuuksiin, joista analysointiohjelma laskee etsityn DNA:n kopiolumäärän kopioina mikrolitrassa. (Droplet Digital PCR (ddPCR) Technology.)

HUSLABin genetiikan laboratorio toimii Meilahdessa, Helsingissä, ja se on Suomen suurin diagnostinen genetiikan yksikkö. Laboratoriossa tehdään vuosittain noin 50 000 perimään liittyvää syto- ja molekyylogeneettistä tutkimusta. Näiden tutkimusten tarkoituksena on auttaa diagnosoimaan geneettisiä sairauksia tai alttiuksia ja tarvittaessa valitsemaan potilaalle sopiva, yksilöllinen lääkehoito. (HUS.) Opinnäytetyöni kuuluu syövän molekyylogeniikan osa-alueelle.

2 Työn tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyöni tarkoitus oli vertailla uuden sukupolven sekvensointia ja digitaalista PCR-menetelmää keskenään, ottaa käyttöön Droplet Digital PCR -testi EGFR-geenin Thr790Met-mutaation seurantaan ja laatia testille työohje. Tavoitteenani oli pystyttää uudella menetelmällä toimiva testi HUSLABin genetiikan laboratoriota varten. Lisäksi tavoitteenani oli kehittää ammatillista osaamistani oppimalla opinnäytetyöprosessin myötä lisää sekä genetiikan tutkimusmenetelmistä että projektityöskentelystä.

Tutkimuskysymys, johon hain opinnäytetyössäni vastausta, oli:

- Ovatko Droplet Digital PCR -menetelmällä saadut EGFR-geenin Thr790Met-mutaation tulokset luotettavia verrattaessa referenssimenetelmällä, uuden sukupolven sekvensoinnilla (NGS), saatuihin tuloksiin?

Työni tutkimusongelmia olivat:

- NGS:n ja digitaalisen PCR:n menetelmien vertailu EGFR-geenin Thr790Met-mutaation seurannassa kirjallisuuden ja omien käyttökokemusten perusteella.
- Droplet Digital PCR -menetelmällä toimivan testin käyttöönotto.
- Työohjeen laatiminen testin käyttöä varten laboratorion mallipohjan, valmistajan koulutuksen ja laiteohjeen avulla.

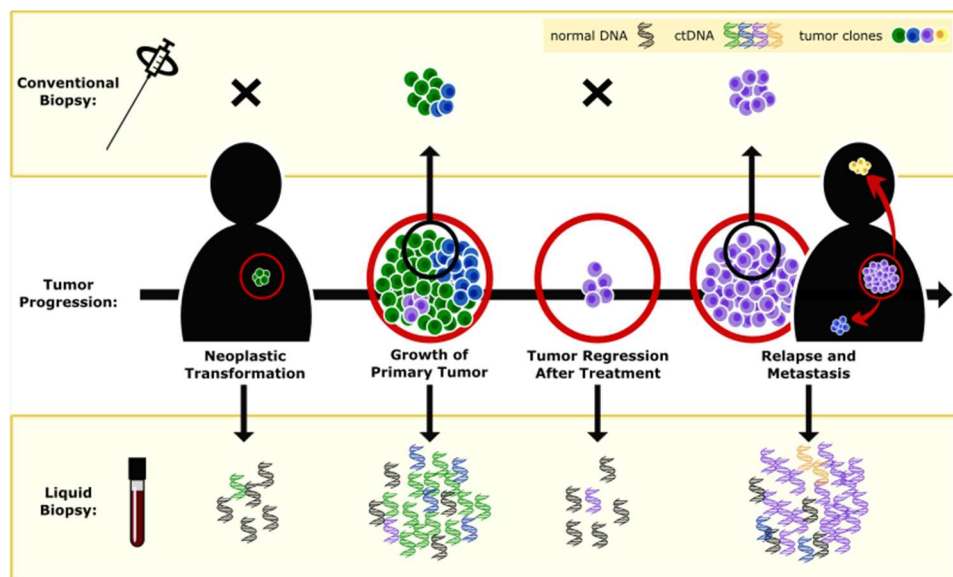
3 EGFR-geenin mutaatiot ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä

Ei-pienisoluisen keuhkosyöpä (non-small cell lung cancer, NSCLC) on yläkäsite, joka kattaa levyepiteelikarsinooman, adenokarsinooman ja suurisoluisen karsinooman (Mali 2013a). Keuhkosyövät ovat usein aluksi oireettomia ja löydettyä jo pitkälle edenneitä, jolloin potilaiden ennuste on huono (Mali – Wigren 2013a; Crino – Weder – van Meerbeeck – Felip 2010). Suurin riskitekijä on tupakointi, mutta muitakin altistavia tekijöitä, kuten asbesti ja geneettinen alttius, tunnetaan. Niiden osuutta syövän synnyssä on kuitenkin vaikeampi arvioida. Keuhkosyöpää, lähinnä adenokarsinoomaa, esiintyy myös tupakoimattomilla henkilöillä, mutta kasvainten geneettiset ja molekyylibiologiset ominaisuudet poikkeavat tupakoitsijoiden adenokarsinoomista. (Knuutila 2014a; Novello ym. 2016: 2.)

3.1 Keuhkosyövän diagnosointi ja seuranta

Keuhkosyöpädiagnosi tehdään natiiviröntgenkuvauksen, kliinisen tutkimuksen ja erilaisten tähytysten, biopsioiden ja yskösnäytteen sytologisten tutkimusten perusteella. (Jekunen ym. 2016.) Biopsioiden histologisten ja molekyylogeneettisten tutkimusten perusteella voidaan määrittää syövän alatyypin ja potilaille voidaan laatia sopivampaa ja yksilöllisempää hoitoa. (Novello ym. 2016: 2.)

Keuhkosyövän toteamisen aikaistamiseksi olisi tarvetta myös helpommin toteutettaville ja vähemmän invasiivisille tutkimuksille. Yksi tapa tähän on ctDNA, eli kiertävä kasvain-DNA, jota voidaan eristää verinäytteestä. ctDNA:ta vapautuu vereen syöpäsolujen apoptoosin ja nekroosin seurauksena sekä solunulkoisten kalvorakkuloiden eli vesikkelien mukana, joten se toimii nestebiopsiana edustaen syöpäkasvaimen genomia. (Huang ym. 2015; Heitzer – Ulz – Geigl 2015: 113.) ctDNA:n avulla voidaan myös seurata taudin etenemistä ja hoitovastetta silloin, kun primaarituumorin sijainnista ei olla varmoja, biopsiaa ei voida tehdä tai kun halutaan välttää toistuvia biopsioita (kuvio 1). Tutkimusten mukaan ctDNA:sta voitaisiin saada kustannustehokas, sensitiivinen ja spesifinen testi, jota voitaisiin käyttää esimerkiksi syövän seulontaan ja ennustamiseen laajaltikin. Tutkimusta tarvitaan vielä kuitenkin lisää, jotta siitä saadaan toimiva sovellus kliiniseen käyttöön. (Catarino – Coelho – Medeiros 2012: 443.)



Kuvio 1. Nestebiopsian ja perinteisen biopsian käyttö kasvaimen seurannassa (Clinical applications of ctDNA. 2017).

Koska ctDNA:n osuus veressä on hyvin pieni, sen havaitseminen ja eristäminen laadukkaasti on hankalaa. Myös näytteen preanalyttisellä käsittelyllä on vaikutusta DNA:n saantoon. (Heitzer – Ulz – Geigl 2015: 115-116.) Varsinaiseen analysointiin on kuitenkin jo olemassa useita sopivia menetelmiä, kuten esimerkiksi digitaalinen PCR, BEAMing, massaspektrometria ja uuden sukupolven sekvensointi (Huang ym. 2015). Suomessa EGFR-geenin mutaatiotutkimusta soluvapaasta DNA:sta tehdään ainakin Keski-Suomen keskussairaalassa (B-EGFR-fD). Myös HUSLABin genetiikan laboratorioissa on tulevaisuudessa tarkoitus siirtyä seuraamaan EGFR-geenin Thr790Met-mutaatiota juuri nestebiopsian avulla, mutta eristysmenetelmä ei ole vielä käytössä.

3.2 Ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoito

Ei-pienisoluista keuhkosyöpää hoidetaan levinneisyysasteen mukaan leikkauksella, sädehoidolla, solunsalpaajilla tai kemosaidehoidolla. Lähinnä adenokarsinoomista on tunnistettu yksittäisiä mutaatioita, jotka aktivoivat taudin. Näitä ovat EGFR-geenin mutaatiot ja ALK-geenin uudelleenjärjestymät, joiden aiheuttaman syövän hoidossa täsmälääkkeet ovat tehokkaampia kuin solunsalpaajat. Nämä alaryhmät ovat harvinaisia, mutta niiden esiintyvyys on suurinta ei-tupakoineiden tai vain vähän tupakoineiden naisten keskuudessa. (Mali – Wigren 2013b; Knuutila 2014b.)

3.3 EGFR-geenin mutaatiot

EGFR-mutaatio tarkoittaa mutaatiota epidermaalisen kasvutekijän reseptoria koodaavassa geenissä. EGFR-geenin mutatoitunut kohta koodittaa tyrosiinikinaasientsyymiä. Mutaatio kiihdyttää syövän kasvua ja leviämistä aktivoimalla EGF-reseptorin siten, että reseptori ei enää tarvitse aktivoitumiseensa ulkoista stimulaatiota ja siksi signaaliketju toimii jatkuvasti. Yleisimmät EGFR-geenin mutaatiot ovat eksonin 19 deleetio ja Leu858Arg-pistemutaatio eksonissa 21. (Mali 2013a.) EGFR-mutaation olemassaolo tutkitaan ainakin silloin, kun syöpää ei voida leikata tai parantavaa hoitoa ei ole. Yleensä tutkimus tehdään sekvensoimalla tai reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä. Potilaita, joilla on EGFR-mutaatio, hoidetaan EGFR-tyrosiinikinaasin estäjillä (TKI), joita ovat esimerkiksi erlotinibi, gefitinibi ja afatinibi. (Jekunen ym. 2016.)

Hoidon edetessä kasvaimelle kehittyä kuitenkin resistenssi tyrosiinikinaasin estäjiä kohtaan, vaikka hoito olisikin aluksi toiminut. Useissa tapauksissa resistenssi johtuu uudesta mutaatiosta EGFR-geenin ATP:n sitoutumisalueella, mutta joissain tapauksissa myös MET- tai HER2-onkogeenin monistumasta tai BRAF-geenin mutaatiosta. Resistenssin kehittymisen havaitsemiseksi ja oikean hoidon löytämiseksi kasvaimen seuranta ja mutaatioiden tunnistaminen on tärkeää. (Mali 2013b; Yu ym. 2013: 2240-2241; Dudek 2016.)

3.3.1 Thr790Met-mutaatio

Eräs ja yleisin TKI-resistenssiä aiheuttava geneettinen muutos EGFR-geenissä on Thr790Met-mutaatio, jossa eksonissa 20 paikalla 790 sijaitseva treoniini vaihtuu metioniiniksi, jolloin ensimmäisen ja toisen polven tyrosiinikinaasin estäjät eivät enää pysty sitoutumaan tyrosiinikinaasin ATP:tä sitovaan taskuun estääkseen EGF-reseptorin toimintaa (Dudek 2016; Mali 2013b; Novello ym. 2016: 2). Tämän vuoksi on kehitetty kolmannen polven tyrosiinikinaasin estäjiä, jotka tehoavat erityisesti Thr790Met-mutatoituneisiin kasvaimiin (Wang – Cang – Liu 2016). Thr790Met-mutaation ilmenemistä seurataan, jotta lääkehoitoa osataan vaihtaa oikeaan aikaan ja varautua myös uusiin mutaatioihin (Dudek 2016).

4 Genetiikan tutkimuksissa käytetyt menetelmät

Opinnäytetyössä näytteiden tutkimiseen käytettiin Bio-Radin Droplet Digital PCR -menetelmää. Referenssimenetelminä tunnettujen Thr790Met-mutaatiopositiivisten näytteiden osalta toimivat reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR ja uuden sukupolven sekvensointi, joilla näytteet oli tutkittu aiemmin.

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on menetelmä, jota käytetään DNA:n monistamiseen kahden tunnetun DNA-jakson välistä. PCR-reaktio koostuu kolmesta päävaiheesta, jotka toistuvat reaktion jokaisella kierroksella. Ensimmäinen vaihe on denaturaatio, jossa kaksijuosteisen DNA:n juosteet saadaan erkanemaan yksijuosteisiksi korkean lämpötilan avulla. Toisessa vaiheessa spesifiset alukkeet kiinnittyvät DNA-juosteisiin niille komplementaarisiin kohtiin. Kolmannessa vaiheessa DNA-polymeraasi alkaa toimia muodos-

taen vapaista nukleotideista vastinjuostetta alkuperäisille DNA-juosteille. Reaktion lopputuotteena syntyy siis alkuperäisen DNA-jakson kopioita. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2013: 153-154.)

Perinteisen PCR-reaktion lopputuote on vielä varsinaisen reaktion jälkeen puhdistettava ja erikseen mitattava, mutta uudemmilla menetelmillä tulos saadaan reaaliajassa reaktion edetessä (Suominen ym. 2013: 156; 167). Näitä menetelmiä ovat esimerkiksi reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR ja digitaalinen PCR.

Sekvensointi on genetiikan perusmenetelmä, jolla pyritään selvittämään tutkittavan DNA-jakson emäsjärjestys. Tämä tapahtuu kopioimalla tutkittavaa DNA-jaksoa osissa siten, että reaktio pysäytetään tiettyihin kohtiin ja tunnistetaan kyseisessä kohdassa oleva emäs. (Timmer 2009.) Perinteisin sekvensointimenetelmä on Sangerin sekvensointi, mutta sen rinnalle ja tilalle on kehitetty myös monia uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä, kuten pyro-, ligaatio-, hybridisaatio- ja nanohuokossekvensoinnit (Suominen ym. 2013: 177; 181-189).

4.1 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (qPCR) on DNA:n monistusmenetelmä, jossa reaktiotuotteen määrän mittaaminen tapahtuu perinteisestä PCR:stä poiketen jokaisen monistuskierroksen jälkeen. Tulos saadaan mittaamalla fluoresoivan väriaineen tuottamaa signaalia, josta voidaan päätellä reaktiotuotteen eli syntyneiden kopioiden määrä. Mitä runsaammin etsittyä DNA-jaksoa näytteessä on, sitä aiemmin monistuminen havaitaan. Fluoresenssia tuottava väriaine voi sitoutua kaksijuosteiseen DNA:han tai olla sitoutuneena reaktion alukkeisiin tai koettimiin. qPCR:n etuja ovat muun muassa mahdollisuus seurata reaktion etenemistä reaaliajassa, mitata monistuminen jokaisella kierroksella ja suorittaa koko prosessi yhdessä putkessa. (Life Technologies. 2012: 3-4.)

qPCR:llä on monia toimintamekanismeja, mutta yleisimmin käytettyjä ovat TaqMan- ja SYBR Green -menetelmät. TaqMan-menetelmässä reaktioon lisätään alukkeiden lisäksi koettimia, joiden toisessa päässä on vaimentaja (quencher) ja toisessa päässä fluoresoiva merkkiaine (reporter dye). Ennen koettimen sitoutumista DNA-juosteeseen vaimentaja estää merkkiaineen fluoresenssin, mutta koettimen sitoutuessa merkkiaine vapautuu ja alkaa lähettää fluoresenssia. (Life Technologies. 2012: 11.) SYBR Green -

menetelmässä fluoresoiva merkkiaine sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han ja sitouduttuaan lähettää voimakkaampaa fluoresenssia kuin vapaana ollessaan (Life Technologies. 2012: 13). qPCR-reaktion toteuttamiseen tarvitaan laitteisto, joka virittää merkkiaineet lähettämään fluoresenssia ja havaitsee näytteiden emittoiman fluoresenssin. Laitteisto huolehtii myös lämpötilan nostamisesta ja laskemisesta PCR-monistuskierrosten aikana. (Life Technologies. 2012:14.)

qPCR-määrityksen tulokset perustuvat siihen, että merkkiaineen tuottaman fluoresenssin voimakkuus suhteutuu monistuskierrosten lukumäärään, jolloin niiden avulla piirretty kuvaaja määrittää alkuperäisen DNA-templaatin määrän. qPCR:n määritysmenetelmä voi olla absoluuttinen tai suhteellinen. Absoluuttisessa määrittämisessä käytetään sisäistä tai ulkoista kalibraatiosuoraa, jonka avulla saadaan selville näytteen täsmällinen kopiolukumäärä. Suhteellisessa määrittämisessä kohdegeenin ilmaantuvuutta verrataan vertailugeenin ilmaantuvuuteen ja vertailugeenin ilmaantuvuutta taas verrataan tutkittavassa näytteessä ja vertailunäytteessä. (Yuan – Reed – Chen – Stewart 2006: 2.)

4.2 Next-Generation Sequencing

Next Generation Sequencing eli NGS kattaa useita erilaisia moderneja sekvensointimenetelmiä. Kaikissa näissä menetelmissä tutkittava DNA-jakso sekvensoidaan useita kertoja rinnakkain tutkimuksen luotettavuuden parantamiseksi. Rinnakkaisilla sekvensoinneilla saadaan myös lisää tietoa DNA:ssa esiintyvistä eroavaisuuksista, sillä Sangerin sekvensoinnista poiketen NGS:n käyttö ei vaadi täsmällistä tietoa siitä, mitä mutaatiota etsitään, vaan sen avulla voidaan etsiä ja löytää myös täysin uusia mutaatioita ja tutkia esimerkiksi mosaikismia. Syöpien diagnosoinnissa NGS:n avulla voidaan tutkia yksilön koko genomi yksittäisten tunnettujen mutaatioiden sijaan, mikä mahdollistaa potilaalle yksilöidyn hoidon. (Behjati – Tarpey 2013:236-238.)

HUSLABin genetiikan laboratoriossa uuden sukupolven sekvensointia tehdään Ion Torrent -menetelmällä, jota varten on laadittu erilaisia syöpägeenipaneeleita. Niiden avulla voidaan selvittää syöpäpotilaan näytteestä geenivirhe, jonka perusteella lääkäri voi valita hoidoksi sopivan lääkityksen.

Ion Torrent -menetelmä perustuu puolijohdesiruihin, jotka havaitsevat DNA-ketjuun liittyvän nukleotidin vapauttaman vetyionin aiheuttaman pH:n muutoksen sirua peittävässä

liuoksessa. Laite tallentaa tiedon oikeasta nukleotidista ja kokeilee taas seuraavaa huuhtomalla sirua aina kerrallaan yhtä nukleotidia sisältävällä liuoksella. (Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology.)

5 Droplet Digital PCR

Digitaalinen PCR (dPCR) -menetelmä perustuu näytteen jakamiseen erillisiin osioihin, joissa PCR-reaktiot tapahtuvat. Osioita voi olla sadoista miljooniin. Kussakin osiossa on aluksi yksi tai ei yhtään kopiota halutusta DNA-jaksosta. Kun monistuksen lopuksi verrataan positiivisten ja negatiivisten osioiden määrää, voidaan tarkkaan määrittää, montako DNA-molekyyliä alkuperäisessä näytteessä oli. Digitaalista PCR:ää on käytetty muun muassa alleelien ilmentymisen erottamiseen ja syöpägeenien määrittämiseen potilasnäytteistä. (Baker 2012.)

qPCR:ään verrattuna dPCR on sensitiivisempi ja täsmällisempi johtuen sen tuottamasta suuresta määrästä rinnakkaisia reaktioita. Se kykenee siis paremmin erottamaan esimerkiksi harvassa esiintyvät alleelit yleisempien joukosta. Digitaalinen PCR ei tarvitse kalibrointia tai sisäisiä kontroleja, kuten qPCR, vaan monistuskajojen tulokset voidaan vain laskea yhteen. qPCR on kuitenkin halvempi menetelmä ja sillä on laajempi dynaaminen alue kuin dPCR:llä. (Baker 2012.)

Droplet Digital PCR (ddPCR) on digitaalisen PCR:n sovellus, jonka QuantaLife on kehittänyt ja julkaissut vuonna 2011. Nykyään laitteistoa myy ja markkinoi Bio-Rad Laboratories. (Baker 2012.) ddPCR-menetelmä perustuu vesi-öljy-emulsioon, joka jakautuu pieniksi pisaroiksi, joissa jokaisessa tapahtuu PCR-monistuminen samaan tapaan kuin esimerkiksi qPCR:n TaqMan-menetelmässä. Eristetty DNA, ddPCR Supermix, reagenssit ja öljy annostellaan kertakäyttöiselle kasetille ja laite yhdistää ne pisaroiksi. Syntyneet pisarat pipetoidaan 96-kuoppalevyille, jolla DNA:n monistuminen tapahtuu. Tämän jälkeen kuoppalevy siirretään lukijaan, joka mittaa jokaisen pisaran fluoresenssin ja sen perusteella määrittelee, onko pisarassa tapahtunut reaktio vai ei. (Hindson ym. 2011:8604-8606; QX200 Droplet Generator. 2014: 5.)

Koska yhdessä pisarassa voi olla yksi tai useampi DNA-jakso tai ei yhtään, tulokset lasketaan Poissonin jakauman kaavalla:

Kopioiden määrä / pisara = $-\ln(1 - p)$, jossa p on positiivisten pisaroiden osuus.

Pisaroiden positiivisuus tai negatiivisuus määritellään sen mukaan, kummalle puolelle kynnyksarvoa ne sijoittuvat kuvaajalla, jonka pystyakselilla on fluoresenssin taajuus ja vaakakselilla näytekaivon numero. Pisaroiden määrien avulla lasketaan myös tutkittavien DNA-jaksojen konsentraatiot ja Poissonin 95 % luottamusvälit. (Droplet Digital PCR Applications Guide: 7.)

5.1 Laitteisto ja reagenssit

Droplet Digital PCR -laitteistoon kuuluvat Droplet Generator ja Droplet Reader. Lisäksi tarvitaan Plate Sealer, sentrifugi ja PCR-laite.

Droplet Generator -laite tekee näytteestä, reagenssimixistä ja öljystä pisaroita, joissa PCR-reaktio tapahtuu. Pisarat muodostuvat, kun kasetin peräkkäisiin kaivoihin pipetoidut nesteet imeytyvät mikrokanavia pitkin kolmanteen kaivoon. Laitteesta on olemassa kahta eri mallia, joista yksinkertaisempi tekee vain pisarat ja pipetointi tehdään käsin, ja monimutkaisempi automaattiversio (kuvio 2) hoitaa myös pipetoinnin kuoppalevyllä pisarakaseteille ja kaseteilta taas uudelle kuoppalevyllä. (QX200 Droplet Generator. 2014: 1-2; 6-11; Automated Droplet Generator. 2015: 1; 7-19.)



Kuvio 2. Automaattinen Droplet Generator -laite (Automated Droplet Generator. 2015).

Droplet Reader -laite (kuvio 3) lukee pisarat PCR-reaktion jälkeen mittaamalla kunkin pisaran lähettämän fluoresenssin aallonpituuden ja ilmoittaa, onko tutkittava geeni monistunut pisarassa vai ei. Lukulaitteen käyttö on hyvin yksinkertaista, sillä kuoppalevy, jolla pisarat ovat, laitetaan vain sisään, laite pipetoi pisarat ja lukee ne ja lopuksi tyhjä kuoppalevy otetaan pois. Pisaroiden lukemiseen laite tarvitsee öljyä (droplet reader oil) ja öljy- ja jätepullojen vaihtaminen onkin ainoa ylläpitotoimenpide, jonka käyttäjä voi lukulaitteelle tehdä. Lukijaa käytetään QuantaSoft Standard Edition -ohjelmalla, johon nimetään näytekaivot ja määritellään testin tiedot. (QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software. 2014: 4-14.)



Kuvio 3. Droplet Reader -laite.

Tarvittavat reagenssit riippuvat tehtävästä testistä, mutta tässä työssä käytettyyn Thr790Met-testiin kuuluvat Supermix ja FAM- ja HEX-väreillä leimatut koettimet. FAM-koetin ilmaisee mutanttigeenin ilmenemistä ja HEX-koetin villin tyyppin geeniä.

5.2 Analysointiohjelmisto

Testin tuloksia analysoidaan QuantaSoft Analysis Pro -ohjelmalla, jonka voi ladata valmistajan internetsivuilta. Ohjelmassa on yhdeksän välilehteä (taulukko 1), joilla voi esimerkiksi nimetä näytekaivot ja valita testin tyyppin, tarkastella testin tuloksia erilaisten kuvaajien kautta ja asettaa tuloksille kynnyksarvot. (QuantaSoft Analysis Pro Software. 2016: 3; 7-14.)

Taulukko 1. QuantaSoft Analysis Pro -ohjelman välilehdet (QuantaSoft Analysis Pro Software. 2016: 7-14).

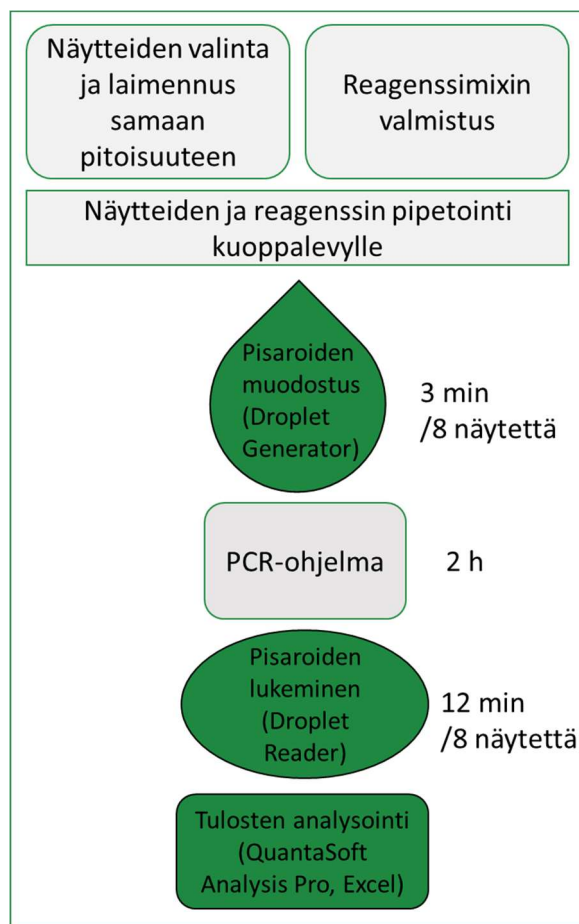
Välilehden nimi	Välilehden sisältämät tiedot
Plate Editor	Näytekaivojen tietojen muokkaus, esimerkiksi nimi, tutkimustyyppi ja tutkimusparametrit
Dashboard	Koottu näkymä testin tiedoista eri välilehdiltä
Plate View	Kaikkien näytekaivojen tiedot ja tulokset
1D Amplitude	Positiivisten ja negatiivisten pisaroiden määrät molempien kanavien suhteen, histogrammi pisaroiden jakaumasta
2D Amplitude	Yksi kuvaaja, jossa kaikki pisarat, eli mutanttigeenin suhteen positiiviset, villin tyyppin geenin suhteen positiiviset, molempien suhteen positiiviset ja molempien suhteen negatiiviset pisarat pilvinä
Concentration	Näytteiden DNA-konsentraatiokuvaaja
Copy number	Näytteiden DNA-kopioluvun kuvaaja
Ratio	Kohdegeenin ja villin tyyppin geenin ilmentymisen välinen suhde
Droplets	Hyväksytyjen pisaroiden yhteismäärä sekä positiivisten ja negatiivisten pisaroiden määrät näytekaivoittain

Kynnysarvo eli threshold asetetaan joko 1D tai 2D Amplitude -välilehdellä. Sen alapuolelle jäävät pisarat ovat arvoltaan nolla ja yläpuolella olevat pisarat yksi. Kynnysarvo määräytyy positiivisten ja negatiivisten kontrollien ja NTC:n (No Template Control) eli vesikontrollin avulla.

6 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön käytännön työskentely tapahtui HUSLABin genetiikan laboratoriossa Meilahdessa joulukuussa 2016. Ennen varsinaista työskentelyä Bio-Radin edustajat järjestivät laitekoulutuksen, jossa ajettiin yksi kahdeksan näytteen sarja Thr790Met-mutaatio-testillä. Lisäksi he kertoivat menetelmän periaatteesta ja tulosten tulkinnasta sekä muista tarjolla olevista testeistä. Opinnäytetyön käytännön työskentelyssä auttoi alussa ja tarvittaessa laboratoriohoitaja Jannike Vyhtinen.

Droplet Digital PCR -menetelmällä yhden näytesarjan tutkimisen voi tehdä yhden työpäivän aikana, kunhan DNA-näytteet on eristetty valmiiksi. Useimmat sarjat tehtiinkin analysointia vaille valmiiksi samana päivänä. Kuviossa 4 on esitetty koko prosessi päävaiheittain ja vaiheiden kestot niissä kohdissa, joissa vaiheen kesto tai kahdeksan näytteen tekemisen kesto on vakio.



Kuvio 4. ddPCR-prosessin päävaiheet.

6.1 Testisarjojen suunnittelu ja käytännön työskentely

Toteutusvaiheessa tutkittiin seitsemän sarjaa DNA-näytteitä (taulukko 2). Näytteitä oli yhteensä 59, joista jotkut ajettiin useammassa eri sarjassa. Sarjoihin tulevat näytteet valitsi ohjaajani Soili Kytölä. Näytteet olivat keuhkosyöpänäytteitä ja muita syöpänäytteitä, jotka valmiiksi oli eristetty parafiinilastuista, sekä laaduntarkkailukierrosten näytteitä ja negatiivisia kontroleja. Hiljattain eristettyjä ja useammassa sarjassa käyttämiäni näytteitä säilytettiin jääkaapissa ja muita pakastimessa.

Taulukko 2. Testisarjat.

Sarjan numero	Sarjan kuvaus	Näytteitä	Vesikontroleja
1	ddPCR-laitteiston ja analyysiohjelman käyttö	4	4
2	Tunnettujen Thr790Met-näytteiden tutkiminen	12	4
3	Tunnettujen Thr790Met-positiivisten näytteiden tutkiminen eri DNA-pitoisuuksilla	24 (6 eri näytettä 4:llä eri DNA-konsentraatiolla)	8
4	Tunnettujen Thr790Met-positiivisten näytteiden tutkiminen laimennossarjoina	18 (6 eri näytettä 3:n laimennoksen sarjana)	6
5	EGFR-mutaatioposiitivisten (muiden kuin Thr790Met) näytteiden tutkiminen	23	1
6	Menetelmän herkkyuden määrittäminen muilla kuin keuhkosyöpänäytteillä ja edellisen vaiheen heikosti positiivisilla näytteillä	14	2
7	Kynnysarvon sijoittumisen määrittäminen negatiivisella kontrollilla ja NGS:n mukaan EGFR-mutaationegatiivisten keuhkosyöpänäytteiden tutkiminen	12 ja 8 negatiivista kontrollia	4

Eri sarjoilla pyrittiin

- testaamaan prosessin puhtautta
- vertaamaan aikaisemmin NGS:llä tehtyjen näytteiden tuloksia ddPCR-tuloksiin
- selvittämään näytteiden DNA-konsentraation vaikutusta tuloksiin
- tutkimaan menetelmän kykyä erottaa pienet määrät mutantti-DNA:ta
- testaamaan testin herkkyyttä
- löytämään yhteinen kynnysarvo kaikille testisarjoille.

Koska Droplet Digital PCR -menetelmä vaatii tutkimaan kerralla aina vähintään kahdeksan näytettä ja niiden lisäksi kahdeksan monikertoja, suunniteltiin sarjat jaollisiksi kahdeksalla. Ensimmäisessä ja toisessa sarjassa oli kaksi ja kolme saraketta näytteitä, mutta koska pipetointi alkoi jo siinä vaiheessa sujua varmemmin, päätin suunnitella kolmannen ja neljännen sarjan samalle 96-kuoppalevyille, jotta nähtäisiin, miten suuremman näytemäärän tutkiminen onnistuu. Sillä kerralla sarakkeita oli yhteensä seitsemän ja lopuilla kerroilla taas kolme, kaksi ja kolme.

Työssä käytetty PCR-ohjelma on valmistajan ohjeen mukainen, testissä käytetylle Supermixille suunniteltu kahden tunnin ohjelma (taulukko 3). Lämpötila muuttuu suhteellisen hitaasti, 2 °C sekunnissa, jotta kaikki pisarat varmasti saavuttavat oikean lämpötilan.

Taulukko 3. Thr790Met-testeissä käytetty PCR-ohjelma (ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)).

Cycling Step	Temperature, °C	Time	Ramp Rate	Number of Cycles
Enzyme activation	95	10 min	2°C/sec	1
Denaturation	94	30 sec		40
Annealing/extension	60	1 min		40
Enzyme deactivation	98	10 min		1
Hold (optional)	4	Infinite		1

Työskenneltäessä molekyylibiologian menetelmien parissa, täytyy tilojen ja työskentelytapojen puhtaus huomioida erityisen tarkasti. HUSLABin genetiikan laboratoriossa on omat tilansa työvaiheille ennen PCR-reaktiota, PCR-reaktiolle ja työvaiheille PCR-reak-

tion jälkeen. Näin estetään näytteiden kontaminaatio monistustuotteilla, ja mikäli kontaminaatio pääsisi syntymään, se havaittaisiin reaktiosarjaan sisältyvillä vesikontrolleilla (Redig 2015). ddPCR-työskentelyssä tämä näkyi käytännössä niin, että näytteiden laimentaminen, pipetointi kuoppalevyille ja pisaroiden tekeminen tapahtui 2. kerroksen puhdistiloissa, kuten myös reagenssimixin valmistus omassa tilassaan. PCR-reaktio tehtiin PCR-laitehuoneessa, josta kuoppalevyä tai tutkimuksen papereita ei viety enää takaisin puhdistiloihin vaan hissillä 3. kerrokseen, jossa pisaranlukulaite sijaitsi.

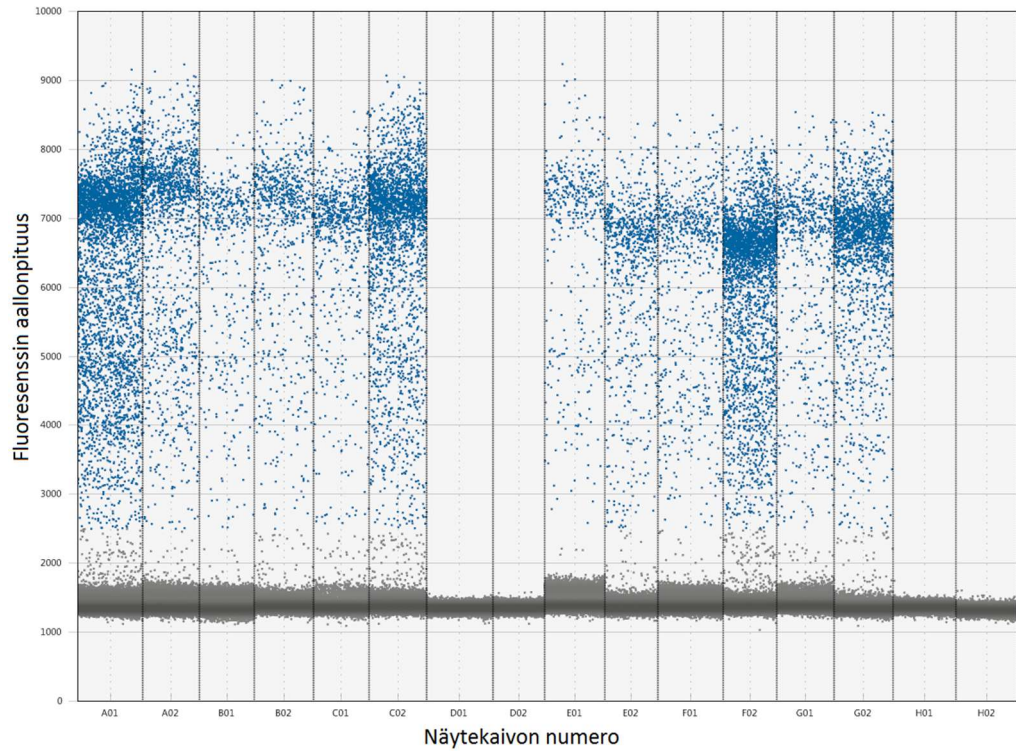
Myös työtavoissa tulee kiinnittää huomiota puhtauteen, joten kaikki PCR-pipetointi tehdään biosuojakaapeissa, käsineitä vaihdetaan eri työvaiheiden välillä ja suojakaapuja käytetään huonekohtaisesti. Myös varsinaiset työvaatteet tulee vaihtaa päivittäin, mikäli työskentelee puhdistiloissa, ja tarvittaessa myös kesken päivän, jos aikoo palata puhdistiloihin käytyään PCR-monistustuotteita sisältävissä tiloissa. (Redig 2015.)

6.2 Tulosten analysointi

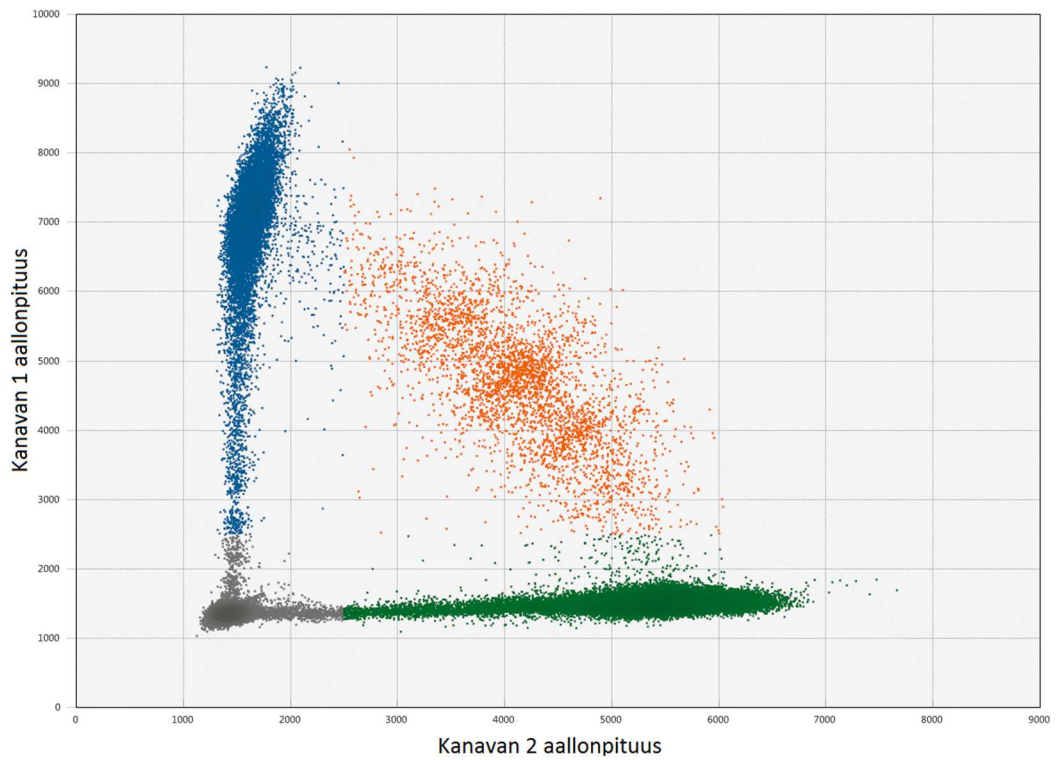
Saatuja tuloksia analysoitiin sekä laitteistoon kuuluvalla QuantaSoft Analysis Pro -ohjelmalla että Microsoftin Excel-tilukkolaskentaohjelmalla.

Analysointiohjelmassa käytetty testityyppi on Direct Quantification (DQ). Ohjelmalla analysoitiin kaikkien sarjojen tulokset kynnysarvoilla 2500 ja 3000 ja niiden avulla saatuja tuloksia analysoitiin lisää Excel-tilukkolaskentaohjelmalla. Kynnysarvojen valinnassa käytettiin pääasiassa 1D Amplitude -näkyä (kuvio 5), mutta sopivuuden arvioinnissa käytettiin myös 2 D Amplitude -näkyä (kuvio 6).

Varsinaisten tautiprosenttien ja tulosten tilastollisten lukujen laskemiseksi ja eri sarjojen tuloksien vertailemiseksi keskenään siirrettiin kaikki numeeriset tulokset Excel-tilukkolaskentaohjelmaan. Taulukossa 4 on kerrottu eri sarjojen tulosten käytännön merkityksestä työlle. Taulukossa 5 on lueteltu käytettyjä tunnuslukuja ja esimerkkejä niiden käyttökohteesta. Itse toteutusvaiheessa näytteiden nimeämiseen käytettiin niiden QPati-numeroita, mutta koska niitä ei voida käyttää julkisesti, nimettiin jokainen näyte nelinumeroisella luvulla väliltä 1001-1059 ennen tulosten analysointia Excelillä.



Kuvio 5. 1D Amplitude -näkyä sarjan 2 näytteiden Thr790Met-tuloksista kynnysarvolla 2500.



Kuvio 6. 2D Amplitude -näkyä sarjan 2 näytteiden Thr790Met-tuloksista kynnysarvolla 2500.

Taulukko 4. Eri sarjojen tulosten käytännön tarkoitus.

Sarjan numero	Tulosten käytännön tarkoitus
1	Tulokseltaan tuntemattomien keuhkonäytteiden tautiprosentit, eli villin tyyppin ja mutanttigeenin suhteet näytteissä.
2	Tunnettujen näytteiden tautiprosentit, vertailu NGS- ja qPCR-menetelmillä saatuihin tuloksiin.
3	Tunnettujen näytteiden tautiprosentit eri DNA-pitoisuuksilla, vertailu keskenään ja sarjan 2 tuloksiin.
4	Tunnettujen näytteiden tautiprosentit, muuttuminen oikeassa suhteessa laimennossarjoissa.
5	NGS:n mukaan Thr790Met-negatiivisten näytteiden tautiprosentit, mutaation erottuminen pienellä osuudella.
6	Muiden kuin keuhkosyöpänäytteiden tautiprosentit, väärin positiivisten rajan määrittäminen, sillä Thr790Met-mutaatiota ei oleteta löytyvän kuin keuhkosyöpänäytteistä.
7	Negatiivisen kontrollin tautiprosentit, testin oikean kynnysarvon määrittäminen.

Taulukko 5. Tuloksista lasketut tilastolliset tunnusluvut.

Tunnusluku	Esimerkki käyttötarkoituksesta
Keskiarvo (ka)	Sarjojen näytteiden keskimääräinen pisaramäärä tai sarjan 3 eri DNA-pitoisuuksilla saatujen tulosten keskiarvo
Keskihajonta (sd)	Sarjan 3 eri DNA-pitoisuuksilla saatujen tulosten keskimääräinen poikkeama keskiarvosta
Minimi (min)	Pienimmän pisaramäärän tai rinnakkaisten tulosten välisen eron löytäminen.
Maksimi (maks)	Suurimman pisaramäärän tai rinnakkaisten tulosten välisen eron löytäminen.

6.3 Työohjeen kirjoittaminen

Opinnäytetyökokonaisuuteen kuului myös työohjeen kirjoittaminen testiä varten. Giordanon (2014) mukaan työohje sisältää yksityiskohtaista ja tarkkaa tietoa siinä kuvatun toiminnon suorittamiseksi. Sen on tarkoitus esittää monimutkainen työskentelyprosessi pilkottuna täsmällisiksi askeleiksi. Työohje sisältää usein kuvia, joilla tiedon ymmärtämistä voidaan tehostaa. Työohje voi perustua esimerkiksi koulutusmateriaaliin.

Gregoryn (2010) mukaan työohjetta kirjoittaessa aluksi täytyy suunnitella sen runko, eli mitä ohje sisältää. Yksittäiset askeleet jakautuvat pää- ja sivuosioihin tehden ohjeesta johdonmukaisen. Työohje ei saa sisältää liikaa tietoa tai ylen määrin yksityiskohtia, vaan sen pitäisi olla selkeä ja ymmärrettävä ja keskittyä olennaiseen. Myös kuvien tulee olla yhtenäisiä ja asiaankuuluvia. Työohjetta kannattaa myös testauttaa ja muokata saadun palautteen perusteella.

Laboratorion jo olemassa olevien työohjeiden ja valmistajan laiteohjeiden perusteella ddPCR-prosessi jaoteltiin sopiviksi osiksi kymmeneen osioon, jotka on listattu alle:

1. Sarjan suunnittelu
2. Näytelaimennosten teko
3. Reagenssien etsintä
4. Näytteiden pipetointi kuoppalevylle
5. Reagenssimixin valmistus
6. Reagenssien pipetointi kuoppalevylle ja kuoppalevyn sulku
7. Pisaroiden teko
8. PCR-ajo
9. Pisaroiden luku
10. Tulosten analysointi

Ohjeessa on pyritty kuvaamaan riittävällä tarkkuudella, mitä laitevalikoissa pitää valita ja mitkä työvaiheet on tärkeää tehdä oikeassa järjestyksessä. Työohje on jaoteltu kymmeneen osioon ja työvaiheen kesto on merkitty sinne, missä se on vakio tai laskettavissa, eli sellaisiin kohtiin, joissa jokin laite tekee työn. Myös ne kohdat, joissa näytteet voivat odottaa seuraavaa työvaihetta jonkin aikaa, on merkitty työohjeeseen. Työohjeen testaus kokonaisuudessaan tapahtui viimeisen näyteajon tekemisen yhteydessä ja ohjetta korjailtiin vielä testauksen perusteella. Työohje kokonaisuudessaan on liitteessä 1.

7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kaikki saadut tulokset on esitetty taulukkona liitteessä 2. QuantaSoft Analysis Pro -ohjelman tuottamasta tiedosta, eli DNA-kopioiden määrästä mikrolitrassa, on laskettu villin tyyppin ja mutanttigeenin välinen suhde, eli kuinka suuri osuus näytteen DNA:sta on tauti-DNA:ta. Analysoitujen näytteiden tautiprocentit vaihtelevat välillä 0 – 94 %. Kaikki tulokset on laskettu molemmilla kynnyksisarvoilla 2500 ja 3000, eikä tuloksissa ole merkittävää eroa, enimmillään noin 0,87 % ja keskimäärin noin 0,09 %.

Menetelmän toimivuutta arvioidessa tarkastellaan tulosten toistettavuutta, menetelmän sensitiivisyyttä, spesifisyyttä ja puhtautta sekä verrataan tuloksia referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin.

Tulosten toistettavuus on tärkeä kriteeri menetelmän toimivuuden arvioinnissa. Näytteitä, jotka ajettiin samalla DNA-konsentraatiolla eri sarjoissa, oli 12, ja tarkastelemalla niistä saatuja tuloksia voidaan todeta, että tulokset olivat melko hyvin toistettavia. Tulosten välinen ero oli keskimäärin 0,0034 eli 0,3 % ja suurin ero oli 0,0148 eli 1,5 % näytteellä 1008 sarjoissa kaksi ja kolme.

Menetelmän sensitiivisyydellä tarkoitetaan sitä, kuinka hyvin menetelmä löytää koko tutkimusjoukosta oikeasti positiiviset, eli moniko oikeasti sairas saa testissä positiivisen tuloksen (Terveyskirjasto 2016a). Koska oikealle sairaudelle ei tässä kohtaa ole muuta määritelmää aikaisemmin tehty NGS- tai qPCR-testi, otetaan näillä menetelmillä saadut tulokset vertailukohdaksi. Tällä tavoin laskettuna ddPCR-testin sensitiivisyys on 100 %.

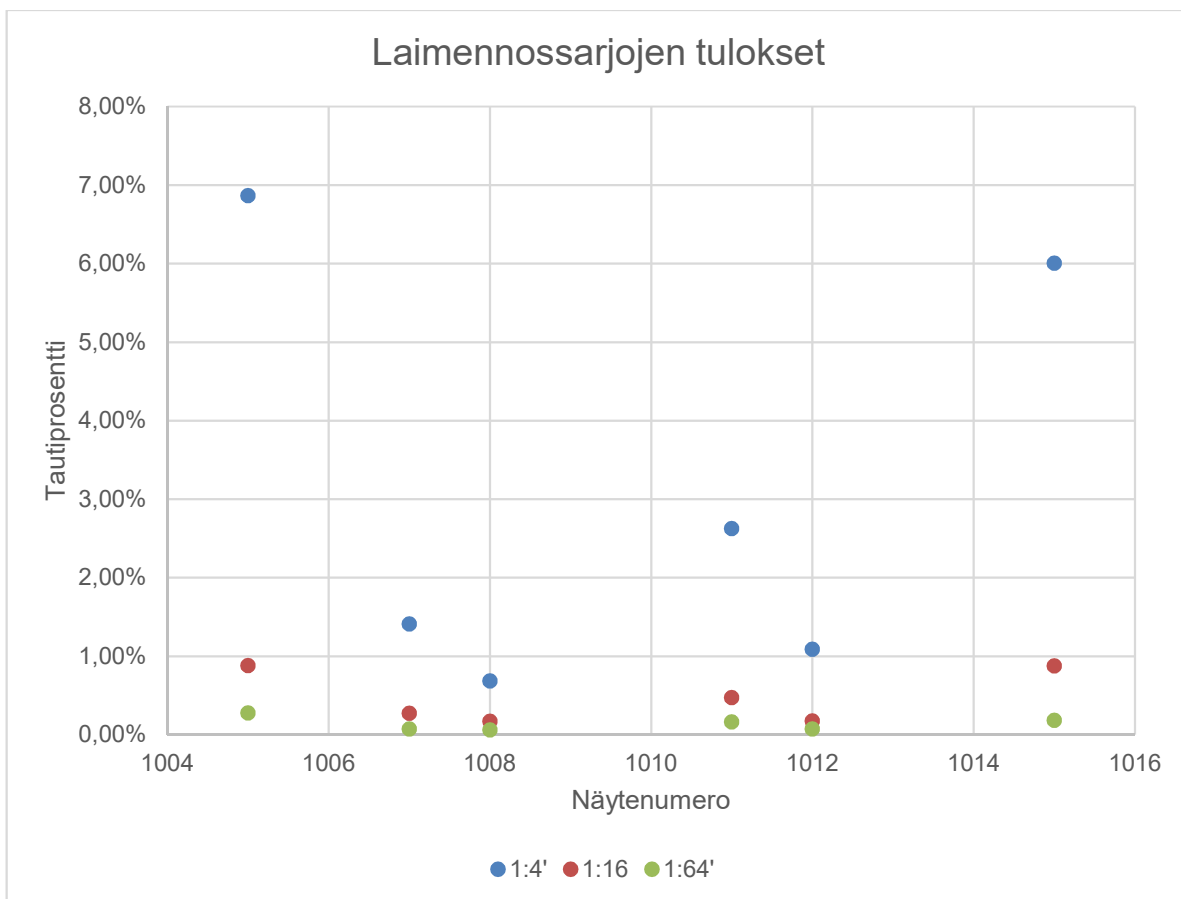
Menetelmän spesifisyydellä taas tarkoitetaan sitä, kuinka hyvin menetelmä löytää tutkimusjoukosta oikeat negatiiviset, eli moniko oikeasti terve saa testissä negatiivisen tuloksen (Terveyskirjasto 2016b). Täysi nollatulos saatiin kuudelle näytteelle, mutta koska sekä negatiiviselle kontrollille että näytteille, jotka ovat muuta kuin keuhkokudosta, tuli lähes joka kerta jonkinlainen tulos, voidaan tietyn tulostason olettaa olevan taustaa. Korkein positiivinen tulos, jonka on oltava väärä positiivinen, sillä näyte ei ole keuhkosta, on 0,0024 eli 0,24 % näytteellä 1041 sarjassa 6. Oletetaan siis tämän ja sen alle jäävien tulosten olevan taustaa ja kaikkien tämän arvon alle jäävien tuloksien olevan oikeasti negatiivisia ja korkeampien positiivisia. Näin määriteltynä näytteistä Thr790Met-mutaation suhteen negatiivisia oli 47 ja positiivisia 12, mikä on sama tulos kuin referenssimenetelmillä mitattuna. Näin määriteltynä Thr790Met-testin spesifisyys on 100 %.

Menetelmän puhtautta testattiin vesikontrolleilla (NTC) joita oli sarjasta riippuen 1-8. Koska ensimmäisten kolmen sarjan kaikki ja neljännen sarjan kaikki paitsi yksi vesikontrolli olivat olleet puhtaita, suunniteltiin viidenteen sarjaan vain yksi vesikontrolli, joka kuitenkin pääsi kontaminoitumaan. Kuudenteen ja seitsemänteen sarjaan suunniteltiin taas useampi vesikontrolli, ja ne kaikki olivat taas puhtaita. Menetelmä toimi siis näiden testien perusteella puhtaasti kahta sarjaa lukuun ottamatta ja todennäköisesti kaksi kontaminaatiota ovat tapahtuneet pipetoidessa. Ainakaan ne eivät johdu reagensseista, sillä samoja koettimia käytettiin joka sarjassa ja samoja Supermix-putkiakin useammassa eri sarjassa.

7.1 Eri DNA-pitoisuudet ja laimennossarjat

Valmistaja suosittelee käyttämään testissä DNA-konsentraatiota 100 ng/μl, kuitenkin korkeintaan 350 ng/μl. Koska DNA-eristyksen saanto vaihtelee huomattavasti, voi konsentraatio joissain näytteissä olla myös alle 50 ng/μl. Oletuksena kaikissa sarjoissa käytettiin DNA-pitoisuutta 50 ng/μl, tai mikäli alkuperäinen konsentraatio oli alle sen, ei näytettä enää laimennettu. Kolmannessa sarjassa testattiin, onko saatu lopputulos eli tautiprosentti sama DNA-konsentraatiosta riippumatta. Testatut DNA-konsentraatiot olivat 25 ng/μl, 50 ng/μl, 100 ng/μl ja 150 ng/μl. Kynnysarvolla 2500 näytteiden tautiprosenttien ero oli keskimäärin 0,010 eli 1,0 %-yksikköä ja suurimmillaan 0,049 eli 4,9 %-yksikköä. Kynnysarvolla 3000 keskimääräinen ero oli 0,010 eli 1,0 %-yksikköä ja suurin ero oli 0,040 eli 4,0 %-yksikköä. Tulosten välinen ero ei siis tällä otannalla ole kovin suuri, joten matalampikin DNA-konsentraatio kuin 100 ng/μl näyttää toimivan.

Testin kykyä erottaa näytteestä myös pienellä osuudella esiintyvä mutaatio testattiin laimennossarjoilla. Laimennossarjoissa käytettiin sarjassa 2 tutkittuja tunnettuja positiivisia näytteitä ja ne laimennettiin negatiiviseen kontrolliin suhteessa 1:4, 1:16 ja 1:64. Minkään näytteen tulos ei mennyt aivan nolnaan, mutta matalimmat tulokset menivät alle taustaksi määritellyn 0,24 % tason. Sarjojen tulokset on esitetty kuviossa 7 ja näytteet vaikuttavat laimenevan melko hyvin oikeassa suhteessa.



Kuvio 7. Laimennossarjojen tulokset.

7.2 Vertailu NGS- ja qPCR-tuloksiin

Aikaisempia Thr790Met-tuloksia oli 12 näytteellä, jotka kaikki tutkittiin ddPCR:llä sarjassa kaksi. Useimmilla näytteillä oli numeerinen tulos, mutta kahden näytteen aiemmaksi tulokseksi oli merkitty vain ”positiivinen qPCR:llä”. Eri menetelmien tulokset vastasivat toisiaan vaihtelevasti, eikä tällä perusteella voida luotettavasti määrittellä, onko vastaavuus sattumaa. ddPCR on luonnollisesti tarkempi menetelmä, joten sen voidaan olettaa löytävän suuremman määrän mutanttigeeniä, mutta osa ddPCR-tuloksista on selvästi aiempaa tulosta korkeampia. Tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. ddPCR-tulosten vertailu NGS- ja qPCR-tuloksiin.

Näytteen numero	ddPCR-tulos kyn- nysarvolla 2500	ddPCR-tulos kyn- nysarvolla 3000	NGS- tai qPCR-tu- los
1005	63 %	64 %	39 %
1006	7 %	7 %	8 %
1007	60 %	60 %	38 %
1008	9 %	9 %	5 %
1009	10 %	10 %	6 %
1010	16 %	15 %	15 %
1011	25 %	25 %	pos
1012	20 %	20 %	33 %
1013	73 %	73 %	33-36 %
1014	19 %	18 %	13 %
1015	77 %	77 %	39-41 %
1016	94 %	93 %	pos

7.3 Luotettavuus ja eettisyys

Testin virhelähteitä ovat DNA:n laadusta ja säilytyksestä johtuvat ongelmat, pipetointivirheet, reagenssien toimintavirheet, kontaminaatio toisilla näytteillä tai DNA:n monistus- tuotteilla ja tulosten tulkintavirheet. Kaikkiin näihin on mahdollisuuksien mukaan kiinnitetty huomiota, eikä minkään pitäisi olla vaikuttanut tuloksiin merkittävästi. Koska jokainen näyte tutkittiin yhdellä testikerralla tuhansina rinnakkaisina reaktioina, niiden tutkiminen rinnakkain useammassa eri näytekaivossa ei olisi tuonut enää lisäinformaatiota.

Valmistajan mukaan tavoiteltava hyväksytyjen pisaroiden yhteismäärä on 15 000 – 18 000 pisaraa / näytekaivo, mikä toteutui ajetuissa sarjoissa melko hyvin. Pisaroiden riittävän suuri määrä kertoo testiprosessin teknisestä onnistumisesta ja siten sen luotettavuudesta, sillä suuressa määrässä pisaroita pienetkin DNA-osuudet tulevat varmemmin edustetuiksi. Keskimäärin yhdessä näytettä sisältävässä näytekaivossa oli 17 119 pisaraa, mutta hajontaa eri sarjojen välillä ja sisällä on jonkin verran. Keskimäärin vähiten pisaroita oli sarjan yksi näytteissä, 14 744 pisaraa, ja eniten sarjan kuusi näytteissä, 19 348 pisaraa. Eron voisi ajatella johtuvan pipetointitekniikkani paranemisesta, mutta

nousevien pisaramäärien jälkeen seitsemännessä sarjassa saatiin taas keskimäärin vain 14 813 pisaraa. Ennen seitsemännen sarjan pisaroiden luontia Droplet Generator tosin antoi virheilmoituksen ja siitä jouduttiin sammuttamaan virta kahdesti, mutta se tuskin vaikuttaa pisaramäärään.

Opinnäytetyö toteutettiin hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti, eli kaikissa työvaiheissa noudatettiin rehellisyyttä, tarkkuutta ja huolellisuutta, käytettiin eettisesti kestäviä työskentelytapoja ja aikaisempiin tutkimuksiin viitattiin asianmukaisesti. Työssä käytetyt lähteet olivat mahdollisimman tuoreita, pääosin ammattikirjallisuutta ja tutkimusartikkeleita. Työlle myös haettiin ja saatiin HUSilta tarvittava tutkimuslupa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012: 6-7.)

8 Pohdinta

Verrattuna uuden sukupolven sekvensointiin Thr790Met-mutaation testaamisessa, ddPCR on prosessina nopeampi, yksinkertaisempi, halvempi ja tarkempi. Menetelmien tarkoitus ei olekaan aivan sama, vaan NGS on tarkoitettukin enemmän monen eri mutaation seulomiseen samalla kertaa, kun taas ddPCR tutkii tarkasti yhtä asiaa, jota halutaan seuloa tai seurata. Myös reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen PCR:ään verrattuna ddPCR on tarkempi, sillä useilla rinnakkaisilla reaktioilla havaitaan pienetkin DNA-osuudet paremmin. qPCR on kuitenkin halvempi menetelmä kuin ddPCR ja sen käyttö on tällä hetkellä vakiintuneempaa.

Lääkärille ja potilaalle ddPCR-tulos kertoo siis sen, alkaako tyrosiinikinaasin estäjillä hoidettu keuhkosyöpäkasvain kehittää resistenssiä lääkkeitä kohtaan. Kun resistenssi alkaa näkyä tuloksissa, voidaan potilaan lääkitystä muuttaa. Kun kiertävän kasvain-DNA:n eristysmenetelmä saadaan käyttöön, voidaan syövän seuranta toteuttaa verinäytteillä, jolloin se on melko kivutonta ja tarvittaessa helppoa järjestää käytännössä niin tiheästi kuin seuranta halutaan.

Monien resurssien suhteen opinnäytetyön ddPCR-työskentely ei ollut kovinkaan tehokasta, sillä siihen kului vajaita kuoppalevyjä ja paljon vesikontrolleja, jolloin levyjä ja reagensseja kului melko runsaasti. Vesikontrollien määrää voidaan varmasti kuitenkin vähentää, kun testi tulee rutiinikäyttöön, sillä tutkimieni sarjojen perusteella menetelmä toimii puhtaasti eikä kontaminaatioita näytä juuri syntyvän. Myös kuoppalevyjen kulutusta voi vähentää yhdistämällä samalle levyille useamman samalla supermixillä toimivan eri

ddPCR-testin, sillä kaikissa työvaiheet ovat identtiset, vain testeissä käytettävät koetteimet vaihtelevat.

PCR-työskentelyn puhtausvaatimusten takia opinnäytetyön laboratorio-osuus vaati jonkin verran etukäteissuunnittelua. Esimerkiksi, mentyäni lukemaan pisaroita yläkertaan, en voinut enää palata alakertaan valmistelemaan seuraavan päivän sarjaa, ellen vaihtanut vaatteita välissä, joten suunnittelin sarjan yläkerrassa pipetointikaavioon ja jatkoin työtä näytteiden etsimisellä seuraavana aamuna.

Toteutusvaiheessa ja työohjeessa pyrittiin huomioimaan väkisinkin syntyvät odotteluajat, joiden aikana laitteet tekevät tai lukevat pisaroita tai PCR-reaktiota. Näihin aikoihin kannattaa tietenkin ajoittaa esimerkiksi lounas- ja kahvitauot sekä hyödyntää niitä työskentelyn jälkien siivoamiseen tai seuraavan sarjan suunnitteluun. Menetelmän ollessa rutii-nikäytössä työntekijä voi tietysti tehdä muitakin töitä kuin vain ddPCR-tutkimuksia, joten mahdollisuuksien mukaan odotteluaikoina voi valmistella myös niitä.

Työskentelyn aikana vastaan tuli joitakin haasteita, esimerkiksi analysointiohjelman asennuksen myöhästyminen sekä työssä auttavan laboratoriohoitajan sairastuminen. Itse testi toimi kuitenkin hyvin, eikä laitteiston käytössä ollut ongelmia.

QuantaSoft Analysis Pro -analysointiohjelmaa ei sinällään ollut vaikea käyttää, ainakaan kynnyksarvon asettamisen osalta. Valmistajan ohjeiden perusteella oli kuitenkin hiukan hankala saada selville, mitä ohjelmalla oikeastaan pitäisi tehdä tai mikä on testin oikea kynnyksarvo. Päädyimme kokeilemaan kynnyksarvoja 2500 ja 3000. Lopulliset tulokset laskettiin molemmilla kynnyksarvoilla, eikä tuloksilla ollut suurta eroa. Kynnyksarvon asettamista vaikeutti tuloksissa näkyvä "sade" (rain), joka johtuu DNA-templaattien pituuden vaihtelusta ja sen vuoksi joidenkin pisaroiden asettumisesta selvien positiivisten ja negatiivisten pisaroiden välille. Kuviossa 4 tätä sadetta ovat siniset pisarat, jotka sijoittuvat noin amplitudivälille 2 500-6 000. Kuitenkin, tarkasteltaessa tuloksia graafisesti 1D ja 2D Amplitude -näkymissä, vaikuttaa kynnyksarvo 2500 rajaavan selvästi negatiiviset pisarat paremmin sateesta, joten se olisi parempi valinta testin kynnyksarvoksi.

Opinnäytetyöprosessissa opin käyttämään ddPCR-laitteistoa ja analysoimaan saamiani tuloksia QuantaSoft Analysis Pro ja Microsoft Excel -ohjelmilla. Sain myös paljon harjoitusta PCR-työskentelystä ja pipetoinnista. Lisäksi opin suunnittelemaan työskentelyäni

ja arvioimaan eri työvaiheisiin kuluvaan aikaan. Työn tekeminen oli mielekästä ja kiinnostavaa, ja opin sen myötä paljon myös genetiikan työskentelymenetelmien ja EGFR-geenin mutaatioiden teoriasta.

Lähteet

Automated Droplet Generator. 2015. Bio-Rad Laboratories Inc. Käyttöohje. 1-36. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10043138.pdf>> Luettu 2.2.2017

Baker, Monya 2012. Digital PCR hits its stride. Nature Methods 9. 541-544. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.nature.com/nmeth/journal/v9/n6/full/nmeth.2027.html>> Luettu 6.11.2016

B-EGFR-fD. B-EGFR-geenin mutaatiotutkimus, solunulkoinen (free). Fimlab laboratoriot Oy. Tutkimusohjekirja. <<http://pingi.ksshp.fi/csp/labohje/labohjesubmit8.csp?TARVO&TUTKIMUS=6378>> Luettu 6.11.2016

Behjati, Sam – Tarpey, Patrick S. 2013. What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition. 98(6): 236-238. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3841808/>> Luettu 28.9.2016

Bio-Rad Laboratories Inc. 2016. QuantaSoft Analysis Pro Software. Käyttöohje. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.bio-rad.com/en-us/product/qx200-droplet-digital-pcr-system#fragment-6>> Luettu 22.12.2016

Catarino, Raquel – Coelho, Ana – Medeiros, Rui 2012. Circulating DNA and NSCLC: old findings with new perspectives. Journal of Thoracic Disease 4 (5). 442-443. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461070/>> Luettu 18.1.2017

Clinical applications of ctDNA. 2017. Wikimedia Commons. Verkkodokumentti. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Clinical_applications_of_ctDNA.png> Luettu 19.4.2017

Crino, Lucio – Weder, Walter – van Meerbeeck Jan P – Felip, Enriqueta 2010. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology 2010 (21 (lisänumero 5)). 103–115. Saatavilla myös sähköisesti <<https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdq207>> Luettu 17.1.2017

ddPCR Supermix for Probes (No dUTP). Bio-Rad Laboratories Inc. Esite. <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10026868.pdf>> Luettu 25.2.2017

Droplet Digital PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories Inc. Esite. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf> Luettu 5.2.2017

Droplet Digital PCR (ddPCR) Technology. Bio-Rad Laboratories Inc. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology>> Luettu 5.2.2017

Dudek, Arkadius Z. 2016. Management of Resistance to EGFR TKI-Targeted Therapy of Lung Cancer: Lessons in Monitoring Cancer Evolution. Oncology Journal 30 (7).

616-618. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/management-resistance-egfr-tki-targeted-therapy-lung-cancer-lessons-monitoring-cancer-evolution>> Luettu 6.11.2016

Giornado, Connie 2014. Work Instruction Template. TechWhirl. <<http://techwhirl.com/work-instruction-template/>> Luettu 5.11.2016

Gregory, Alyssa. 2010. 7 Tips for Writing an Effective Instruction Manual. Sitespoint. <<https://www.sitepoint.com/7-tips-for-writing-an-effective-instruction-manual/>> Luettu 5.11.2016

Heitzer, Ellen –Ulz, Peter – Geigl, Jochen B. 2015. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry* 61 (1). 112-123. Saatavilla myös sähköisesti <<http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/61/1/112.full.pdf>> Luettu 18.1.2017

Hindson, Benjamin J. – Ness, Kevin D. – Masquelier, Donald A. – Belgrader, Phillip – Heredia, Nicholas J. – Makarewicz, Anthony J. – Bright, Isaac J. – Lucero, Michael Y. – Hiddessen, Amy L. – Legler, Tina C. – Kitano, Tyler K. – Hodel, Michael R. – Petersen, Jonathan F. – Wyatt, Paul W. – Steenblock, Erin R. – Shah, Pallavi H. – Bousse, Luc J. – Troup, Camille B. – Mellen, Jeffrey C. – Wittmann, Dean K. – Erndt, Nicholas G. – Cauley, Thomas H. – Koehler, Ryan T. – Sp, Austin P. – Dube, Simant – Rose, Klint A. – Montesclaros, Luz – Wang, Sheglong – Stumbo, David P. – Hodges, Shawn P. – Romine, Steven – Milanovich, Fred P. – White, Helen E. – Regan, John F. – Karlin-Neumann, George A. – Hindson, Christopher M. – Saxonoz, Serge – Colston, Bill W. 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry* 83 (22). 8604-8610. Saatavilla myös sähköisesti <<http://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/ac202028g>> Luettu 28.9.2016

Huang, Wei-Lun – Wei, Fang – Wong, David T. – Lin, Chien-Chung – Su, Wu-Chou 2015. The Emergent Landscape of Detecting EGFR Mutations Using Circulating Tumor DNA in Lung Cancer. *BioMed Research International* 2015. 1-10. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/340732/>> Luettu 18.1.2017

HUS. Genetiikka ja perinnöllisyyslääketiede. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkosivu. <<http://www.hus.fi/hus-tietoa/liikelaitokset-ja-tukipalvelut/huslab/laboration-erikoisalajat/perinnollisyyslääketiede/Sivut/default.aspx>> Luettu 17.11.2016

Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology. Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>> Luettu 3.2.2017

Jekunen, Antti – Ahvonen, Jarkko – Gunn, Jarmo – Hetemaa, Tiina – Jartti, Airi – Kajander, Sami – Koivunen, Jussi – Kouri, Mauri – Lehto, Juho – Lappi-Blanco, Elisa – Saariaho, Taneli – Sioris, Thanos – Salo, Jarmo – Sihvo, Eero – Vaalavirta, Leila – Vuorela, Piia 2016. Keuhkosityöpä. Käypä hoito -suositus. Duodecim Terveyskirjasto. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=hoi06050> Luettu 3.11.2016

Knuuttila, Aija 2014a. Keuhkosityöpien etiologia. Teoksessa Kaarteenaho, Riikka – Halme, Maija – Brander, Pirkko E. (toim.): Keuhkosairaudet: diagnostiikka ja hoito. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Knuuttila, Aija 2014b. Keuhkosityöpien jaottelu. Teoksessa Kaarteenaho, Riikka – Halme, Maija – Brander, Pirkko E. (toim.): Keuhkosairaudet: diagnostiikka ja hoito. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Life Technologies. 2012. Basics of real-time PCR. Real-time PCR handbook. Ohjekirja. 3-20. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>> Luettu 6.11.2016

Mali, Pekka 2013a. Keuhkosityövän patologia ja molekyylibiologia. Teoksessa Aalberg, Veikko – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly – Joensuu, Heikki (toim.): Syöpätaudit. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Mali, Pekka 2013b. Ei-pienisoluisen keuhkosityövän lääkehoito. Teoksessa Aalberg, Veikko – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly – Joensuu, Heikki (toim.): Syöpätaudit. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Mali, Pekka – Wigren, Tuija 2013a. Keuhkosityövän ehkäisy ja seulonta. Teoksessa Aalberg, Veikko – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly – Joensuu, Heikki (toim.): Syöpätaudit. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Mali, Pekka – Wigren, Tuija 2013b. Ei-pienisoluisen keuhkosityövän hoito taudin levinneisyysasteen mukaan. Teoksessa Aalberg, Veikko – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly – Joensuu, Heikki (toim.): Syöpätaudit. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Novello, Silvia – Barlesi, Fabrice – Califano, Raffaele – Cufer, Tanja – Ekman, Simon – Gaj Levra, Matteo – Kerr, Keith M. – Popat, Sanjay – Reck, Martin – Senan, Suresh – Simo, G V – Vansteenkiste, Johan – Peters, Solange 2016. Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* 27 (lisänumero 5). 1-27. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.esmo.org/Guidelines/Lung-and-Chest-Tumours/Metastatic-Non-Small-Cell-Lung-Cancer>> Luettu 17.1.2017

QuantaSoft Analysis Pro Software. 2016. Bio-Rad Laboratories Inc. Käyttöohje. 1-29. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/QuantaSoft-Analysis-Pro-v1.0-Manual.pdf>> Luettu 5.2.2017

QX200 Droplet Generator. 2014. Bio-Rad Laboratories Inc. Käyttöohje. 1-16. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10031907.pdf>> Luettu 2.2.2017

QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software. 2014. Bio-Rad Laboratories Inc. 1-26. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10031906.pdf>> Luettu 2.2.2017

Redig, Jennifer 2015. Clean Up Your Act! How To Clean Up PCR Contamination. Bite-size Bio. Verkkodokumentti. <<http://bitesizebio.com/20773/clean-up-your-act-how-to-clean-up-pcr-contamination/>> Luettu 30.3.2017

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2013. Geeniteknikka. Turun Ammattikorkeakoulun Oppimateriaaleja 52. 2. painos. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.

Terveyskirjasto 2016a. Sensitiivisyys. Duodecim. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt03075> Luettu 13.4.2017

Terveyskirjasto 2016b. Spesifisyys. Duodecim. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt03206> Luettu 13.4.2017

Timmer, John 2009. A brief guide to DNA sequencing. Ars Technica. Verkkodokumentti. <<https://arstechnica.com/science/2009/09/a-brief-guide-to-dna-sequencing/>> Luettu 1.2.2017

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. Verkkodokumentti. <http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf> Luettu 19.4.2017

Wang, Shuhang – Cang, Shundong – Liu, Delong 2016. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology and Oncology* 9 (34). 1-7. Saatavilla myös sähköisesti <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4830020/pdf/13045_2016_Article_268.pdf> Luettu 25.1.2017

Yuan, Joshua S – Reed, Ann – Chen, Feng – Stewart, Neal C. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7 (85). 1-12. Saatavilla myös sähköisesti <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-7-85>> Luettu 3.2.2017

Yu, Helen A. – Arcila, Maria E. – Rekhtman, Natasha – Sima, Camelia S. – Zakowski, Maureen F. – Pao, William – Kris, Mark G. – Miller, Vincent A. – Ladanyi, Marc – Riely, Gregory J. 2013. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clinical Cancer Research* 19 (8). 2240-2247. Saatavilla myös sähköisesti <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/8/2240.full-text.pdf>> Luettu 25.1.2017

Työohje: Thr790Met-mutaation tutkiminen Droplet Digital PCR -menetelmällä

EGFR-geenin mutaatioita esiintyy keuhkosyövästä levyepiteelisyövissä ja adenokarsinoomissa. Ilmentyessään ne aktivoivat EGF- eli epidermaalisen kasvutekijän reseptorin, joka kiihdyttää syövän kasvua ja leviämistä toimimalla jatkuvasti. Yleisimmät EGFR-geenin mutaatiot ovat eksonin 19 deleetio ja Leu858Arg-pistemutaatio eksonissa 21. (Mali 2013a.) Mutaation aiheuttamaa keuhkosyöpää voidaan hoitaa täsmälääkkeillä, tyrosiini-kinaasin estäjillä (TKI), joille kasvain kuitenkin aikaa myöten lähes aina kehittää resistenssin (Mali 2013b).

TKI-resistenssin aiheuttaa usein uusi EGFR-geenin mutaatio, joista yleisin on Thr790Met. Tämä mutaatio syntyy, kun eksonin 20 paikalla 790 sijaitseva treoniini vaihtuu metioniiniksi muuttaen EGFR-reseptorin rakennetta siten, että ensimmäisen ja toisen polven tyrosiini-kinaasin estäjät eivät enää toimi. Thr790Met-mutaation ilmenemistä EGFR-geenin mutaatiosta johtuvaa keuhkosyöpää sairastavilla seurataan, jotta lääkitystä osataan vaihtaa kolmannen polven tyrosiini-kinaasin estäjään ajoissa. (Dudek 2016; Mali 2013b; Novello ym. 2016: 2; Wang – Cang – Liu 2016.)

Sarjan suunnittelu

- 1. Avaa** tiedosto Pipetointikaavio_ddPCR.
- 2. Suunnittele** sarjaan aina vähintään kahdeksan tutkittavaa (näyte, kontrolli tai vesi) ja lisäksi kahdeksan monikertoja, sillä Droplet Generator –laitteen kasetit ovat 8-paikkaisia eikä niitä voi jättää vajaiksi. Yhteensä sarjaan mahtuu enintään 96 näytettä. Tyhjiksi jääviin paikkoihin voi suunnitella esim. vesikontrolleja.
- 3. Nimeä** näytteet esim. GB16-1234 Sukunimi, Etunimi. Nimeä kontrollit neg ja pos ctrl ja vesikontrolli NTC.
- 4.** Koska näytteiden olisi hyvä olla platalla suunnilleen samaa konsentraatiota, pipetointikaavio laskee laimennokset konsentraatioon 50 ng/µl ja laimennoksen oletustilavuus on 10 µl.
 - a.** Mikäli näytteen alkuperäinen konsentraatio on matalampi kuin 50 ng/µl, älä laimenna näytettä vaan pipetoi platalle suoraan näytemäärä 2 µl.
 - b.** Mikäli näytteen alkuperäinen konsentraatio on korkea ja laimennokseen pipetoitavaksi DNA-määräksi tulisi alle 2 µl, kannattaa kaavoja muuttaa

siten, että tekee suuremman tilavuuden laimennosta ja DNA:ta tulee pipetoitavaksi ainakin 2 µl. HUOM. Muuta myös veden kaavaan oikea tilavuus.

5. **Merkitse** reagenssimixin pipetointikaavioon kertoimeksi näyttemäärä +2 pipetointivaraksi.

Varaa PCR-laite laitehuoneesta. **Varmista**, että laitteella on tarvittava PCR-ohjelma, ddPCR-mutation.

Näytelaimennosten tekeminen

1. **Valitse** näytehuoneesta biosuojakaappi ja kerää sinne näytteet ja PCR-vesi.
2. **Numeroi** ja **nimeä** kullekin laimennokselle oma Eppendorf-putki tai pikkuputki 8-paikkaselta stripiltä. (HUOM. Matalan DNA-konsentraation näytteitä voi mennä reaktioon suoraan.)
3. **Pipetoi** vedet kaikkiin putkiin.
4. **Naputa** ja **spinnaa** DNA-näytteet. **Pipetoi** DNA-näyte sille nimettyyn putkeen pipetointikaavion mukaisesti. Laimennoksen kokonaistilavuus on oletuksena 10 µl, mutta voi olla korkeampi, jos olet itse nostanut sitä.
5. **Naputa** ja **spinnaa** laimennokset.

Reagenssien etsiminen

1. ddPCR-reagenssit löytyvät reagenssihuoneen pakastimesta ja jääkaapista ddPCR-nimetyistä laatikoista. Käytössä oleva ddPCR Supermix -putki on pakastimessa (yksi putki) ja vesi ja probet (kaksi putkea, T790M FAM ja HEX) ovat jääkaapissa. **Nosta** putket biosuojakaappiin lämpiämään siksi aikaa, kun pipetoi näytteet platalle.

Näytteiden pipetoiminen platalle

1. **Ota** näytehuoneen PCR-biosuojakaapin viereisestä laatikostosta yksi ddPCR-platta ja puhtaiden telineiden laatikosta sille värillinen muovialusta. Näytteet pipetoidaan sarakkeittain kahdeksan sarjona (esim. 1. sarake sisältää näytteet 1-8, 2. näytteet 9-16 jne.). Pipetoi kutakin näytelaimennosta pipetointikaavion mukaisessa järjestyksessä 2 µl/kuoppa.
2. Platan voi jättää biosuojakaappiin reagenssimixin valmistuksen ajaksi.

Reagenssimixin valmistus

1. **Merkitse** yksi Eppendorf-putki mixiä varten.
2. **Vorteksoi** ja **spinnaa** kaikki reagenssit (tai jos Supermix-putki on kovin täynnä, kääntele ja naputtele).
3. **Pipetoi** ddPCR Supermixiä, probeja ja vettä pipetointikaavion mukaan.
4. **Vorteksoi** ja **spinnaa** reagenssimix.
5. **Kirjaa** reagenssien lottitiedot pipetointikaavioon.
6. **Palauta** reagenssit paikoilleen jääkaappiin ja pakastimeen.
7. **Vie** mixiputki näytepuolelle.

Käy käynnistämässä ddPCR Plate Sealer –laite, jotta se ehtii lämmetä reagenssien pipetoinnin aikana.

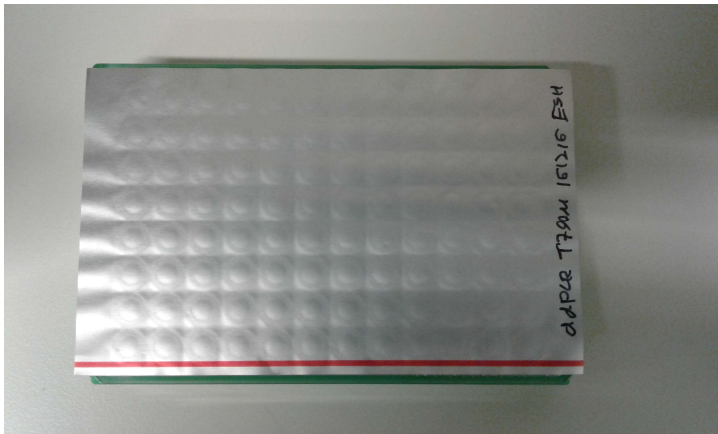
- a. Käynnistyspainike on laitteen takana oikeassa alareunassa.
- b. Kun laite käynnistyy, paina OK.
- c. Varmista, että lämpötila alkaa nousta huoneenlämmöstä ylöspäin.

Reagenssien pipetointi platalle ja platan sulkeminen

1. **Pipetoi** kuhunkin näytekaivoon 20 µl reagenssimixiä, sekoita pipetillä näytteen seen.
 - a. Jos sarjassa on paljon näytteitä, voit jakaa reagenssimixin myös stripille ja käyttää haravapipettiä, tällöin täytyy varata pipetointivaraa enemmän kuin 2.
2. **Vie** platta ddPCR Plate Sealer –laitteen luo, **tarkista** että lämpötila on 180 °C ja avaa luukku. **Aseta** platta lämpöblokkiin, **ota** yksi foliokalvo pakkauksesta laitteen päältä ja **aset**a platan päälle. **Sulje** luukku ja **valitse** Seal. Platan sulku kestää n. 5 s. Kun sulku on valmis, **avaa** luukku, **ota** platta blokilta ja **sulje** luukku. Foliokalvon pinnan pitäisi näyttää hunajakennomaiselta. Älä vielä sammuta laitetta.



Plate Sealer oikeassa lämpötilassa.

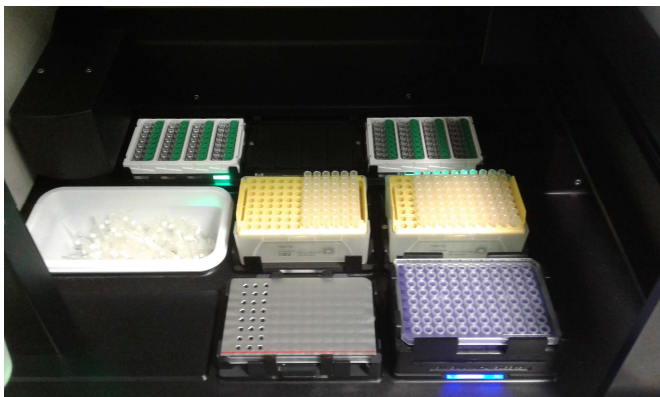


Foliokalvon hunajakennomainen pinta.

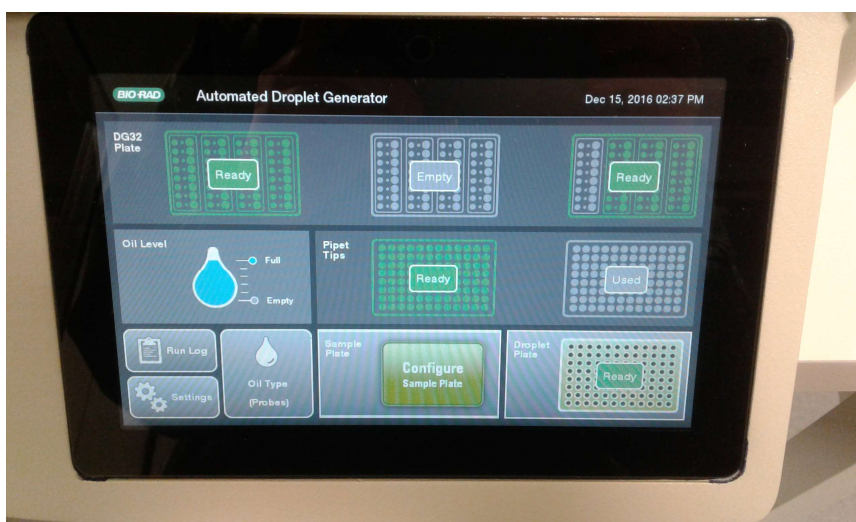
1. **Vorteksoi** platta varovasti.
2. **Spinnaa** näytteet ja reagenssit kuoppien pohjalle. (Esim. 30 s millä tahansa ohjelmalla.)

Pisaroiden tekeminen

1. **Avaa** Droplet Generator -laitteen kansi ja **tarkista** ja **täydennä** kasetit (cartridge) ja pipetinkärjet, **vertaa** niitä laitteen näytön tietoihin ja **varmista**, että ne pitävät paikkansa ja vihreät valot palavat täysien kohtien alla. Tarvikkeita on laitteen yläpuolella hyllyllä. **Tarkista**, että öljypullossa on riittävästi öljyä (näyttö kertoo öljyn määrän) ja roskiksessa tilaa.



Droplet Generator sisältä.



Droplet Generatorin perusnäyttö.

- Kasetteja kuluu yksi yhdelle riville, eli neljä riviä vaatii yhden kokonaisen kasettelineen ja täysi platta kolme kokonaista telinettä.
- Pipetinkärkeä kuluu aina kaksi yhden näytteen pipetointiin, eli yksi rivi kuluttaa 16 kärkeä ja täysi platta 192 kärkeä, jolloin laitteessa täytyy olla kaksi täyttä kärkilaatikkoa.
- Jos laitteessa on kasettelineitä, joiden kaseteista osa on käytetty, tai vajaita pipetinkärkilaatikoita, laite muistaa, mitkä kasetit tai montako kärkeä on käytetty, mutta jos lisää uusia vasempaan reunaan, se ei käytä ensin vanhoja loppuun vaan aloittaa aina vasemmanpuoleisimmasta kasetista tai kärkilaatikosta.
- Jos joudut sammuttamaan laitteen, se ei muista, mitkä kasetit tai kärjet on jo käytetty, vaan olettaa kaikki käytetyiksi, tai jos nostat telineen tai

laatikon pois ja laitot takaisin, se luulee sitä uudeksi ja käyttämättömäksi. Laitteelle ei voi itse kertoa, mitkä tavarat ovat käytettyjä ja mitkä eivät, joten vajaat kasettitelineet menevät roskeen jos laite "unohtaa" ne.



Näyttekasetti.

- 2. Aseta** foliokalvolla suljettu näyte- ja reagenssiplatta etureunan vasemmanpuoleiseen paikkaan ja **varmista**, että siihen syttyy vihreä valo.
- 3. Ota** huoneen pakastimen ylimmästä laatikosta kylmäblokki ja **laita** siihen tyhjä 96-platta (voi olla vähän hankalaa) oikeinpäin (katso miten päin blokki lukittuu laitteeseen). **Aseta** blokki laitteen etureunan oikeanpuoleiselle paikalle ja **varmista**, että vihreä valo syttyy.
- 4. Sulje** laitteen kansi. Kansi lukittuu ajon ajaksi eikä sitä saa avata väkisin.
- 5. Valitse** näytöltä "Configure sample plate", jolloin pääset nimeämään platan (esim. PPKKVV) ja valitsemaan näytteitä sisältävät rivit. Kun tämä on tehty, **paina OK**.
- 6. Valitse** näytöltä "Start Droplet Generation", jolloin laite kysyy vielä "Please Confirm Your Run". **Tarkista** ajotiedot ja **paina OK**, jolloin laite aloittaa alustuksen (kestää muutaman minuutin) ja sen jälkeen pisaroiden tekemisen (kesto lukee ruudulla). Pisaroiden teko kestää n. 3 min/8 näytettä.
- 7.** Kun pisarat ovat valmiit, laite alkaa laskea aikaa pisaroiden valmistumisesta. **Ota** uusi platta kylmäblokkista ja **sulje** se Plate Sealer-laitteella kuten edellinenkin. Platta tulisi viedä PCR-laitteeseen ja aloittaa PCR-ohjelma puolen tunnin kuluessa pisaroiden valmistumisesta.
- 8. Palauta** kylmäblokki pakastimeen ja **vaihda** käytetyt kasetit ja tarvittaessa pipetinkärkilaitikko uusiin. Laitteen käyttämät pipetinkärjet ovat Sartoriuksen 5-120

pl -kärkiä ilman laatikon kantta. Käytetyt kasetit ja käytetyn näyte- ja reagensiplatan voi heittää roskeen.

9. Jos laite antaa System Error -ilmoituksen, toimi ohjeen mukaan eli ota töpseli irti jatkojohtosta (viereisen pöydän alla), odota 30 s ja laita töpseli takaisin kiinni. HUOM. Tämän jälkeen laite ei muista, mitä tavaroita se on jo käyttänyt ja mitä ei.

PCR-ajo

1. **Vie** pisaraplattoja PCR-laitteeseen. **Valitse** ohjelmaksi ddPCR-mutation. **Anna** laitteen lämmetä lähelle 95 °C ja sitten **paina** Pause.
2. **Nimeä** plattoja merkitsemällä reunan tussilla tutkimus (esim. ddPCR T790M), päivämäärä ja nimikirjaimesi.
3. **Aseta** plattoja PCR-laitteeseen ja **sulje** kansi.
4. PCR-ohjelma kestää n. 2 h. Voit tarkistaa jäljellä olevan ajan Info-kohdasta.
5. Kun ohjelma on valmis, **lähetä** plattoja hissillä 3. kerrokseen ja **siirrä** siellä jääkaappiin odottamaan pisaroiden lukemista. Tarvittaessa plattoja säilyy jääkaapissa viikonlopun yli.

Pisaroiden lukeminen

1. **Käynnistä** Droplet Reader -laite takana oikeassa alareunassa olevasta virtanäppäimestä. Laitteen lämpiäminen kestää n. 10 min.



Droplet Reader.

2. **Käynnistä** laitteeseen kytketty kannettava tietokone. **Kirjaudu** sisään käyttäjällä User, salasana on QuantaLife. **Käynnistä** QuantaSoft-ohjelma pikakuvakkeesta.

3. Voit ladata jo aikaisemmin suunnitellun platan tiedot esim. koneen muistista tai muistitikulta tai suunnitella platan nyt.

4. **Suunnittele** platta tuplaklikkaamalla yhtä kuopista.

Täytä näytteen kohdalle:

Name: esim. QPati-numero

Experiment:

Supermix: ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)

Target 1: Name: T790M Type: Ch1 Unknown

Target 2: Name: WT Type: Ch2 Unknown

ja **paina** Apply tai OK. Yhteiset tiedot (kaikki paitsi näytteen nimi) voi kopioida kaikkiin näytekäivoihin kerralla (Ctrl tai Shift).

Täytä vesikontrollien kohdalle:

Name: NTC

Experiment:

Supermix: ddPCR Supermix (no dUTP)

Target 1: Name: T790M Type: Ch1 NTC

Target 2: Name: WT Type: Ch2 NTC

ja **paina** Apply tai OK.

Tallenna tiedot painamalla yläreunasta Template-> Save as-> **nimeä** esim. PPKKVV_nimikirjaimet

Applyn (Enter) ja OK:n ero: Apply tallentaa syötetyn tiedon kuopan kohdalle, muttei sulje valikkoa, ja jos klikkaat seuraavaksi jotain muuta näytettä, edellisen näytteen nimi kopioituu siihenkin, jos painat taas Apply. OK tallentaa syötetyn tiedon kuopan kohdalle ja sulkee valikon, jolloin se täytyy taas avata seuraavan näytteen kohdalla, mutta ei kopioi mitään mihinkään.

Kaikkia muita tietoja voi muuttaa vielä analyysivaiheessa, paitsi Supermixiä, joten varmista, että se tulee oikein.

5. Kun platan suunnittelu on valmis ja laite lämmennyt (kolme vasemmanpuoleista valoa palaa vihreinä, oikeanpuoleisin ei pala) voit siirtää platan laitteeseen.

6. **Avaa** lukijan kansi painamalla sen päällä olevasta kaksoisnuolinäppäimestä. **Ota** kannen alta teline ja avaa se nostamalla reunoilla olevat mustat vivut ylös. **Aseta** tutkittava platta telineeseen oikein päin (1A vasemmassa yläkulmassa) ja sulje

vivut painamalla ne alas. **Aseta** teline takaisin paikoilleen ja **sulje** lukijan kansi painamalla nuolinäppäintä.



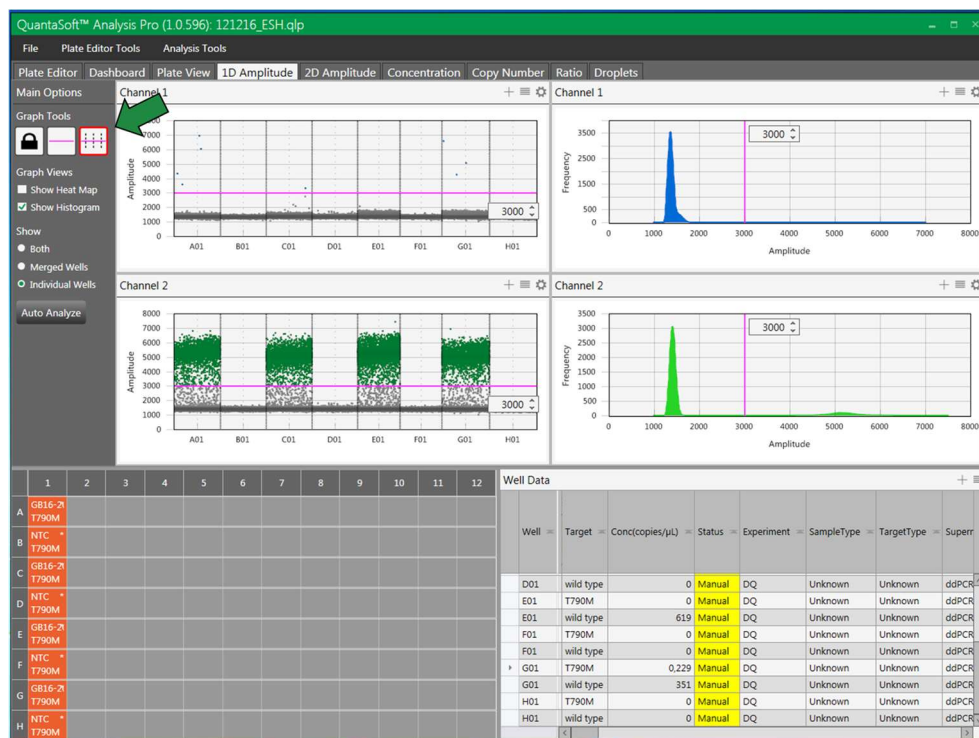
Plattateline paikoillaan.

7. **Klikkaa** tietokoneen ruudun vasemmasta laidasta kohta Run. Ohjelma avaa ikkunan Run Options, **vahvista** lukusuunta (Rows/Columns) ja käytetyt värit (FAM/HEX). **Paina** OK.
 - a. Lopputuloksen kannalta lukusuunnalla ei ole väliä, mutta jos olet esim. pipetoinut rinnakkaiset näytteet peräkkäin ja haluat vertailla niitä samantien valmistumisen jälkeen, voit valita lukusuunnaksi columns.
8. Pisaroiden lukeminen kestää n. 12 min riviltä, eli täyden platan ajamiseen kuluu aikaa n. 2,5 h, mutta kahteen riviin vajaa puoli tuntia.
9. Alustavia tuloksia voi seurata jo luennan aikana, sillä laite lukee yhden kaivon kerralla valmiiksi ja ilmoittaa kummassakin kanavassa laskettujen positiivisten pisaroiden määrän kuopan kohdalla. HUOM. Tulokset ovat automaattisen analysoinnin tuottamia ja saattavat vielä muuttua itse analysoitaessa. Laitteen vieressä ei kuitenkaan tarvitse seisoa koko aikaa.
10. Luettuaan kaikki kuopat ja viimeistelyään ajon ohjelma ilmoittaa Run complete. Klikkaa OK, ohjelma siirtyy analysointitilaan.
11. **Avaa** lukijan kansi ja **ota** teline ulos. **Avaa** vivut ja **ota** luettu platta pois, **laita** kansi takaisin päälle ja **palauta** teline lukijaan. **Peitä** platan kalvossa olevat reiät esim. teipillä tai muovikalvolla ja **hävitä** platta sekajätteen mukana. **Sammuta** lukija.

12. Talleta ajotiedot kannettavalle ja ddPCR-muistitikulle samalla nimellä kuin aieminkin (tiedostomuodot ovat erilaiset) ja **analysoi** tulokset tietokoneella, jolla on QuantaSoft Analysis -ohjelmisto.

Tulosten analysointi

- 1. Mene** tietokoneelle, jolle on asennettu QuantaSoft Analysis Pro -ohjelma.
- 2. Liitä** muistitikku ja **avaa** ajotiedosto ohjelmiston Browse-näppäimen kautta.
- 3. Mene** 1D Amplitude -välilehdelle, **valitse** vasemmasta sivupalkista Graph tools -osiosta lukon sijaan kuva, jossa on pinkki viiva ja paljon pisteitä (ks. kuva).



1D Amplitude -välilehti.

- 4. Klikkaa** molempien kanavien kuvaajaa; kynnsarvon osoittava viiva ilmestyy näkyviin. Viivan voi joko vetää tai liikuttaa nuolilla oikeaan kynnsarvoon tai kirjoittaa sen viivan vieressä olevaan laatikkoon. **Valitse** kynnsarvoksi 2500 molempiin kuvaajiin. **Lukitse** kynnsarvot valitsemalla Graph tools -osiosta taas lukon kuva.
- 5. Siirrä** tulokset Excel-tiedostoksi klikkaamalla alareunan Well data -osion valikko auki ja **valitse** "Export to excel". **Nimeä** Excel-tiedosto esim. PPKKVV_ddPCR_nimikirjaimet.

6. **Tarkista**, että vesikontrollit näyttävät nolaa molempien kanavien suhteen, ja että negatiivinen kontrolli on negatiivinen T790M-kanavalla. **Laske** näytteiden tautiprosentit jakamalla Thr790Met-konsentraatio (copies/ μ l) villin tyypin geenin konsentraatiolla ja **muuta** tulos prosenteiksi.

Lähteet:

Dudek, Arkadius Z. 2016. Management of Resistance to EGFR TKI-Targeted Therapy of Lung Cancer: Lessons in Monitoring Cancer Evolution. *Oncology Journal* 30 (7). 616-618. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/management-resistance-egfr-tki-targeted-therapy-lung-cancer-lessons-monitoring-cancer-evolution>> Luettu 6.11.2016

Mali, Pekka 2013a. Keuhkosyövän patologia ja molekyylibiologia. Teoksessa Aalberg, Veikko – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly – Joensuu, Heikki (toim.): *Syöpätaudit*. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Mali, Pekka 2013b. Ei-pienisoluisen keuhkosyövän lääkehoito. Teoksessa Aalberg, Veikko – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly – Joensuu, Heikki (toim.): *Syöpätaudit*. Sähköinen oppikirja. Duodecim.

Novello, Silvia – Barlesi, Fabrice – Califano, Raffaele – Cufer, Tanja – Ekman, Simon – Gaj Levra, Matteo – Kerr, Keith M. – Papat, Sanjay – Reck, Martin – Senan, Suresh – Simo, G V – Vansteenkiste, Johan – Peters, Solange 2016. Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* 27 (lisänumero 5). 1-27. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.esmo.org/Guidelines/Lung-and-Chest-Tumours/Metastatic-Non-Small-Cell-Lung-Cancer>> Luettu 17.1.2017

Wang, Shuhang – Cang, Shundong – Liu, Delong 2016. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology and Oncology* 9 (34). 1-7. Saatavilla myös sähköisesti <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4830020/pdf/13045_2016_Article_268.pdf> Luettu 25.1.2017

Tulokset

Sarjan 1 tulokset kynnysarvolla 2500

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1001	209,57	0,31	0,15 %	4191,40	6,27
1002	396,82	0,16	0,04 %	7936,38	3,18
1003	630,50	0,00	0,00 %	12610,08	0,00
1004	357,85	0,23	0,06 %	7156,93	4,57

Sarjan 1 tulokset kynnysarvolla 3000

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1001	204	0,313	0,15 %	4076,00	6,27
1002	389	0,0794	0,02 %	7788,00	1,59
1003	619	0	0,00 %	12377,00	0,00
1004	351	0,229	0,07 %	7027,00	4,57

Sarjan 1 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1001	2450	12565	4	15011	15015
1002	4241	10572	2	14811	14813
1003	5690	8025	0	13715	13715
1004	4047	11384	3	15428	15431

Sarjan 1 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1001	2388	12627	4	15011	15015
1002	4174	10639	1	14812	14813
1003	5610	8105	0	13715	13715
1004	3984	11447	3	15428	15431

Sarjan 2 tulokset kynnysarvolla 2500

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1005	516,00	325,00	62,98 %	10 322,00	6 500,00
1006	497,00	36,20	7,28 %	9 948,00	725,00
1007	97,80	58,50	59,82 %	1 955,00	1 170,00
1008	374,00	32,50	8,69 %	7 489,00	650,00
1009	499,00	49,00	9,82 %	9 981,00	979,00
1010	332,00	51,50	15,51 %	6 632,00	1 029,00
1011	441,00	110,00	24,94 %	8 821,00	2 207,00
1012	281,00	55,10	19,61 %	5 616,00	1 102,00
1013	289,00	211,00	73,01 %	5 779,00	4 216,00
1014	363,00	67,30	18,54 %	7 256,00	1 346,00
1015	361,00	276,00	76,45 %	7 218,00	5 511,00
1016	162,00	152,00	93,83 %	3 248,00	3 039,00

Sarjan 2 tulokset kynnysarvolla 3000

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1005	502	319	63,55 %	10034	6380
1006	491	35,2	7,17 %	9818	705
1007	95,1	57,1	60,04 %	1902	1143
1008	374	32,2	8,61 %	7485	644
1009	494	48	9,72 %	9871	959
1010	328	49,9	15,21 %	6561	999
1011	435	109	25,06 %	8703	2178
1012	275	54,2	19,71 %	5507	1083
1013	282	207	73,40 %	5646	4144
1014	355	64,9	18,28 %	7104	1299
1015	351	270	76,92 %	7017	5397
1016	159	150	94,34 %	3179	3002

Sarjan 2 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1005	6132	11136	4168	13100	17268
1006	5036	9570	443	14163	14606
1007	1179	13607	717	14069	14786
1008	4365	11647	436	15576	16012
1009	6013	11381	709	16685	17394
1010	3747	11508	653	14602	15255
1011	4721	10380	1352	13749	15101
1012	3351	12430	722	15059	15781
1013	3339	11993	2515	12817	15332
1014	3750	10382	786	13346	14132
1015	3770	10501	2980	11291	14271
1016	2024	13673	1902	13795	15697

Sarjan 2 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1005	5995	11273	4101	13167	17268
1006	4983	9623	431	14175	14606
1007	1148	13638	701	14085	14786
1008	4363	11649	432	15580	16012
1009	5960	11434	695	16699	17394
1010	3712	11543	634	14621	15255
1011	4669	10432	1335	13766	15101
1012	3293	12488	710	15071	15781
1013	3271	12061	2476	12856	15332
1014	3683	10449	759	13373	14132
1015	3680	10591	2925	11346	14271
1016	1984	13713	1880	13817	15697

Sarjan 3 tulokset kynnysarvolla 2500

näytenumero ja DNA-pitoisuus	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1005 25 ng/μl	248,00	155,00	62,50 %	4 963,00	3 098,00
1005 50 ng/μl	531,00	333,00	62,71 %	10 620,00	6 650,00
1005 100 ng/μl	1 075,00	653,00	60,74 %	21 509,00	13 062,00
1005 150 ng/μl	1 428,00	854,00	59,80 %	28 554,00	17 080,00
1008 25 ng/μl	218,00	17,70	8,12 %	4 363,00	355,00
1008 50 ng/μl	361,00	26,00	7,20 %	7 224,00	520,00
1008 100 ng/μl	757,00	68,40	9,04 %	15 146,00	1 367,00
1008 150 ng/μl	1 166,00	96,80	8,30 %	23 319,00	1 937,00
1011 25 ng/μl	296,00	65,90	22,26 %	5 913,00	1 319,00
1011 50 ng/μl	492,00	120,00	24,39 %	9 847,00	2 391,00
1011 100 ng/μl	964,00	222,00	23,03 %	19 282,00	4 440,00
1011 150 ng/μl	1 498,00	337,00	22,50 %	29 955,00	6 739,00
1012 25 ng/μl	139,00	27,80	20,00 %	2 790,00	556,00
1012 50 ng/μl	289,00	56,30	19,48 %	5 774,00	1 126,00
1012 100 ng/μl	558,00	106,00	19,00 %	11 151,00	2 124,00
1012 150 ng/μl	880,00	153,00	17,39 %	17 592,00	3 066,00
1013 25 ng/μl	145,00	115,00	79,31 %	2 908,00	2 298,00
1013 50 ng/μl	298,00	215,00	72,15 %	5 957,00	4 310,00
1013 100 ng/μl	550,00	401,00	72,91 %	11 003,00	8 014,00
1013 150 ng/μl	835,00	612,00	73,29 %	16 709,00	12 234,00
1014 25 ng/μl	245,00	46,40	18,94 %	4 893,00	927,00
1014 50 ng/μl	425,00	78,10	18,38 %	8 491,00	1 563,00
1014 100 ng/μl	827,00	150,00	18,14 %	16 534,00	2 999,00
1014 150 ng/μl	1 220,00	214,00	17,54 %	24 410,00	4 277,00

Sarjan 3 tulokset kynnysarvolla 3000

näytenumero ja DNA-pitoisuus	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1005 25 ng/μl	243	154	63,37 %	4865	3071
1005 50 ng/μl	521	328	62,96 %	10416	6560
1005 100 ng/μl	1046	638	60,99 %	20911	12759
1005 150 ng/μl	1371	821	59,88 %	27424	16413
1008 25 ng/μl	218	17,7	8,12 %	4359	355
1008 50 ng/μl	361	25,8	7,15 %	7212	516
1008 100 ng/μl	756	67,9	8,98 %	15127	1358
1008 150 ng/μl	1164	95,1	8,17 %	23281	1901
1011 25 ng/μl	293	65	22,18 %	5867	1299
1011 50 ng/μl	486	118	24,28 %	9726	2369
1011 100 ng/μl	949	218	22,97 %	18980	4354
1011 150 ng/μl	1471	327	22,23 %	29429	6540
1012 25 ng/μl	137	27,5	20,07 %	2745	549
1012 50 ng/μl	283	55,2	19,51 %	5656	1103
1012 100 ng/μl	547	103	18,83 %	10935	2063
1012 150 ng/μl	856	148	17,29 %	17120	2952
1013 25 ng/μl	144	113	78,47 %	2874	2267
1013 50 ng/μl	291	211	72,51 %	5828	4213
1013 100 ng/μl	534	391	73,22 %	10690	7825
1013 150 ng/μl	803	591	73,60 %	16065	11830
1014 25 ng/μl	241	45,7	18,96 %	4819	913
1014 50 ng/μl	415	76,5	18,43 %	8300	1529
1014 100 ng/μl	806	145	17,99 %	16122	2907
1014 150 ng/μl	1187	204	17,19 %	23731	4082

Sarjan 3 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näytenumero ja DNA-pitoisuus	pos pisa- roita WT	neg pisa- roita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1005 25 ng/μl	3486	14844	2261	16069	18330
1005 50 ng/μl	6692	11732	4536	13888	18424
1005 100 ng/μl	11033	7382	7845	10570	18415
1005 150 ng/μl	11780	4980	8650	8110	16760
1008 25 ng/μl	3234	15872	286	18820	19106
1008 50 ng/μl	4908	13657	406	18159	18565
1008 100 ng/μl	9417	10423	1120	18720	19840
1008 150 ng/μl	12758	7531	1603	18686	20289
1011 25 ng/μl	4314	15099	1058	18355	19413
1011 50 ng/μl	6966	13405	1968	18403	20371
1011 100 ng/μl	11138	8775	3424	16489	19913
1011 150 ng/μl	13770	5354	4763	14361	19124
1012 25 ng/μl	2167	17215	453	18929	19382
1012 50 ng/μl	4362	15683	937	19108	20045
1012 100 ng/μl	7172	11830	1640	17362	19002
1012 150 ng/μl	9717	8738	2255	16200	18455
1013 25 ng/μl	2179	16565	1744	17000	18744
1013 50 ng/μl	4239	14714	3172	15781	18953
1013 100 ng/μl	6984	11714	5397	13301	18698
1013 150 ng/μl	9174	8870	7316	10728	18044
1014 25 ng/μl	3517	15216	724	18009	18733
1014 50 ng/μl	5464	12574	1159	16879	18038
1014 100 ng/μl	8251	8096	1956	14391	16347
1014 150 ng/μl	11959	6564	3079	15444	18523

Sarjan 3 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näytenumero ja DNA-pitoisuus	pos pisa-roita WT	neg pisa-roita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1005 25 ng/μl	3424	14906	2243	16087	18330
1005 50 ng/μl	6590	11834	4483	13941	18424
1005 100 ng/μl	10843	7572	7708	10707	18415
1005 150 ng/μl	11535	5225	8417	8343	16760
1008 25 ng/μl	3231	15875	286	18820	19106
1008 50 ng/μl	4901	13664	403	18162	18565
1008 100 ng/μl	9409	10431	1113	18727	19840
1008 150 ng/μl	12746	7543	1575	18714	20289
1011 25 ng/μl	4284	15129	1043	18370	19413
1011 50 ng/μl	6897	13474	1951	18420	20371
1011 100 ng/μl	11025	8888	3364	16549	19913
1011 150 ng/μl	13649	5475	4641	14483	19124
1012 25 ng/μl	2134	17248	447	18935	19382
1012 50 ng/μl	4283	15762	918	19127	20045
1012 100 ng/μl	7063	11939	1595	17407	19002
1012 150 ng/μl	9540	8915	2176	16279	18455
1013 25 ng/μl	2155	16589	1722	17022	18744
1013 50 ng/μl	4158	14795	3107	15846	18953
1013 100 ng/μl	6827	11871	5290	13408	18698
1013 150 ng/μl	8928	9116	7130	10914	18044
1014 25 ng/μl	3469	15264	713	18020	18733
1014 50 ng/μl	5362	12676	1135	16903	18038
1014 100 ng/μl	8108	8239	1900	14447	16347
1014 150 ng/μl	11767	6756	2950	15573	18523

Sarjan 4 tulokset kynnyksarvolla 2500

näytenumero ja laimennussuhde	WT (kopioita/ μ l)	Thr790Met (kopioita/ μ l)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μ l)	Thr790Met (kopioita/20 μ l)
1005 1:4	858,00	58,90	6,86 %	17 159,00	1 179,00
1005 1:16	967,00	8,52	0,88 %	19 346,00	170,00
1005 1:64	989,00	2,73	0,28 %	19 786,00	54,50
1007 1:4	879,00	12,40	1,41 %	17 570,00	249,00
1007 1:16	1 082,00	2,93	0,27 %	21 644,00	58,70
1007 1:64	1 086,00	0,81	0,07 %	21 711,00	16,20
1008 1:4	952,00	6,51	0,68 %	19 044,00	130,00
1008 1:16	1 085,00	1,84	0,17 %	21 704,00	36,70
1008 1:64	1 120,00	0,67	0,06 %	22 395,00	13,50
1011 1:4	968,00	25,40	2,62 %	19 367,00	508,00
1011 1:16	1 150,00	5,43	0,47 %	23 003,00	109,00
1011 1:64	1 119,00	1,84	0,16 %	22 386,00	36,90
1012 1:4	945,00	10,30	1,09 %	18 896,00	207,00
1012 1:16	1 037,00	1,82	0,18 %	20 749,00	36,30
1012 1:64	1 102,00	0,82	0,07 %	22 035,00	16,50
1015 1:4	796,00	47,80	6,01 %	15 915,00	956,00
1015 1:16	916,00	8,03	0,88 %	18 319,00	161,00
1015 1:64	964,00	1,75	0,18 %	19 281,00	35,00

Sarjan 4 tulokset kynnyksarvolla 3000

näytenumero ja laimennussuhde	WT (kopioita/ μ l)	Thr790Met (kopioita/ μ l)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μ l)	Thr790Met (kopioita/20 μ l)
1005 1:4	854	57,8	6,77 %	17078	1155
1005 1:16	965	8,21	0,85 %	19299	164
1005 1:64	989	2,47	0,25 %	19771	49,3
1007 1:4	876	12	1,37 %	17522	241
1007 1:16	1081	2,73	0,25 %	21623	54,6
1007 1:64	1084	0,74	0,07 %	21684	14,8
1008 1:4	950	6,27	0,66 %	19005	125
1008 1:16	1083	1,65	0,15 %	21660	32,9
1008 1:64	1118	0,538	0,05 %	22350	10,8
1011 1:4	966	24,7	2,56 %	19325	494
1011 1:16	1149	5,19	0,45 %	22975	104
1011 1:64	1117	1,72	0,15 %	22349	34,3
1012 1:4	943	9,46	1,00 %	18854	189
1012 1:16	1036	1,49	0,14 %	20715	29,8
1012 1:64	1100	0,618	0,06 %	21996	12,4
1015 1:4	792	46,4	5,86 %	15840	928
1015 1:16	913	7,97	0,87 %	18260	159
1015 1:64	963	1,57	0,16 %	19262	31,4

Sarjan 4 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näytenumero	pos pisa- roita WT	neg pisa- roita WT	pos pisa- roita Thr790Met	neg pisa- roita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1005 1:4	9282	8646	876	17052	17928
1005 1:16	10717	8402	138	18981	19119
1005 1:64	10316	7824	42	18098	18140
1007 1:4	9760	8792	195	18357	18552
1007 1:16	10386	6883	43	17226	17269
1007 1:64	10537	6950	12	17475	17487
1008 1:4	10550	8464	105	18909	19014
1008 1:16	11202	7392	29	18565	18594
1008 1:64	10743	6755	10	17488	17498
1011 1:4	10692	8369	407	18654	19061
1011 1:16	12191	7352	90	19453	19543
1011 1:64	11373	7156	29	18500	18529
1012 1:4	9784	7939	155	17568	17723
1012 1:16	10635	7514	28	18121	18149
1012 1:64	10424	6721	12	17133	17145
1015 1:4	8441	8731	684	16488	17172
1015 1:16	10421	8844	131	19134	19265
1015 1:64	10913	8598	29	19482	19511

Sarjan 4 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näytenumero	pos pisa- roita WT	neg pisa- roita WT	pos pisa- roita Thr790Met	neg pisa- roita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1005 1:4	9252	8676	859	17069	17928
1005 1:16	10700	8419	133	18986	19119
1005 1:64	10311	7829	38	18102	18140
1007 1:4	9742	8810	189	18363	18552
1007 1:16	10380	6889	40	17229	17269
1007 1:64	10529	6958	11	17476	17487
1008 1:4	10536	8478	101	18913	19014
1008 1:16	11188	7406	26	18568	18594
1008 1:64	10730	6768	8	17490	17498
1011 1:4	10677	8384	396	18665	19061
1011 1:16	12182	7361	86	19457	19543
1011 1:64	11362	7167	27	18502	18529
1012 1:4	9770	7953	142	17581	17723
1012 1:16	10624	7525	23	18126	18149
1012 1:64	10413	6732	9	17136	17145
1015 1:4	8413	8759	664	16508	17172
1015 1:16	10399	8866	130	19135	19265
1015 1:64	10906	8605	26	19485	19511

Sarjan 5 tulokset kynnysarvolla 2500

näyte- numero	WT (kopioita/ μ l)	Thr790Met (kopioita/ μ l)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μ l)	Thr790Met (kopioita/20 μ l)
1017	802,00	0,58	0,07 %	16 041,00	11,60
1018	857,00	0,69	0,08 %	17 147,00	13,90
1019	57,50	0,06	0,10 %	1 151,00	1,16
1020	314,00	0,12	0,04 %	6 289,00	2,43
1021	570,00	0,13	0,02 %	11 398,00	2,60
1022	458,00	0,31	0,07 %	9 168,00	6,25
1023	237,00	0,00	0,00 %	4 734,00	0,00
1024	1 058,00	0,51	0,05 %	21 157,00	10,20
1025	247,00	0,24	0,10 %	4 945,00	4,79
1026	218,00	0,32	0,15 %	4 366,00	6,47
1027	389,00	0,34	0,09 %	7 780,00	6,76
1028	1 190,00	0,34	0,03 %	23 805,00	6,73
1029	395,00	0,20	0,05 %	7 897,00	3,91
1030	128,00	0,00	0,00 %	2 566,00	0,00
1031	179,00	0,20	0,11 %	3 572,00	4,04
1032	195,00	0,12	0,06 %	3 907,00	2,47
1033	121,00	0,06	0,05 %	2 413,00	1,30
1034	87,70	0,00	0,00 %	1 755,00	0,00
1035	132,00	0,07	0,05 %	2 639,00	1,32
1036	250,00	0,33	0,13 %	5 005,00	6,58
1037	479,00	0,37	0,08 %	9 571,00	7,47
1038	120,00	0,13	0,11 %	2 393,00	2,66
1039	31,50	0,00	0,00 %	630,00	0,00

Sarjan 5 tulokset kynnysarvolla 3000

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1017	790	0,322	0,04 %	15793	6,43
1018	840	0,694	0,08 %	16808	13,9
1019	56,6	0,0582	0,10 %	1132	1,16
1020	308	0,0607	0,02 %	6162	1,21
1021	562	0,13	0,02 %	11235	2,6
1022	451	0,312	0,07 %	9030	6,25
1023	232	0	0,00 %	4636	0
1024	1051	0,509	0,05 %	21020	10,2
1025	243	0,239	0,10 %	4859	4,79
1026	216	0,324	0,15 %	4311	6,47
1027	383	0,203	0,05 %	7660	4,05
1028	1165	0,269	0,02 %	23303	5,39
1029	391	0,195	0,05 %	7817	3,91
1030	125	0	0,00 %	2506	0
1031	175	0,135	0,08 %	3497	2,69
1032	193	0,124	0,06 %	3856	2,47
1033	119	0,0649	0,05 %	2377	1,3
1034	86,3	0	0,00 %	1727	0
1035	130	0,0662	0,05 %	2590	1,32
1036	242	0,329	0,14 %	4835	6,58
1037	466	0,311	0,07 %	9315	6,22
1038	118	0,0665	0,06 %	2351	1,33
1039	30,7	0	0,00 %	613	0

Sarjan 5 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1017	9042	9252	9	18285	18294
1018	9657	9004	11	18650	18661
1019	965	19252	1	20216	20217
1020	4547	14840	2	19385	19387
1021	6958	11164	2	18120	18122
1022	6077	12755	5	18827	18832
1023	3516	15776	0	19292	19292
1024	10967	7524	8	18483	18491
1025	3727	15937	4	19660	19664
1026	3078	15098	5	18171	18176
1027	4903	12511	5	17409	17414
1028	11120	6353	5	17468	17473
1029	5152	12918	3	18067	18070
1030	1782	15468	0	17250	17250
1031	2461	15012	3	17470	17473
1032	2915	16136	2	19049	19051
1033	1768	16369	1	18136	18137
1034	1292	16687	0	17979	17979
1035	1886	15890	1	17775	17776
1036	3427	14457	5	17879	17884
1037	6319	12588	6	18901	18907
1038	1710	15976	2	17684	17686
1039	458	16884	0	17342	17342

Sarjan 5 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1017	8944	9350	5	18289	18294
1018	9526	9135	11	18650	18661
1019	950	19267	1	20216	20217
1020	4467	14920	1	19386	19387
1021	6880	11242	2	18120	18122
1022	6002	12830	5	18827	18832
1023	3450	15842	0	19292	19292
1024	10923	7568	8	18483	18491
1025	3669	15995	4	19660	19664
1026	3043	15133	5	18171	18176
1027	4839	12575	3	17411	17414
1028	10983	6490	4	17469	17473
1029	5108	12962	3	18067	18070
1030	1743	15507	0	17250	17250
1031	2413	15060	2	17471	17473
1032	2880	16171	2	19049	19051
1033	1743	16394	1	18136	18137
1034	1272	16707	0	17979	17979
1035	1853	15923	1	17775	17776
1036	3322	14562	5	17879	17884
1037	6181	12726	5	18902	18907
1038	1682	16004	1	17685	17686
1039	446	16896	0	17342	17342

Sarjan 6 tulokset kynnysarvolla 2500

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1019	66,60	0,19	0,28 %	1 331,00	3,70
1026	464,00	0,37	0,08 %	9 277,00	7,33
1035	135,00	0,12	0,09 %	2 705,00	2,36
1036	225,00	0,31	0,14 %	4 509,00	6,10
1040	639,00	0,31	0,05 %	12 785,00	6,11
1041	237,00	0,58	0,24 %	4 735,00	11,60
1042	586,00	0,12	0,02 %	11 728,00	2,41
1043	361,00	0,54	0,15 %	7 223,00	10,90
1044	505,00	1,00	0,20 %	10 105,00	20,10
1045	925,00	0,60	0,07 %	18 510,00	12,10
1046	913,00	0,37	0,04 %	18 267,00	7,46
1047	612,00	0,18	0,03 %	12 243,00	3,60
1048	531,00	0,85	0,16 %	10 626,00	17,10
1049	565,00	0,85	0,15 %	11 291,00	16,90

Sarjan 6 tulokset kynnysarvolla 3000

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1019	65,1	0,185	0,28 %	1302	3,7
1026	456	0,366	0,08 %	9127	7,33
1035	133	0,118	0,09 %	2655	2,36
1036	217	0,183	0,08 %	4350	3,66
1040	630	0,244	0,04 %	12597	4,89
1041	233	0,58	0,25 %	4667	11,6
1042	581	0,0603	0,01 %	11623	1,21
1043	356	0,544	0,15 %	7121	10,9
1044	500	0,944	0,19 %	9997	18,9
1045	917	0,542	0,06 %	18346	10,8
1046	904	0,373	0,04 %	18079	7,46
1047	605	0,12	0,02 %	12098	2,4
1048	527	0,731	0,14 %	10542	14,6
1049	557	0,785	0,14 %	11136	15,7

Sarjan 6 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1019	1050	18035	3	19082	19085
1026	6277	12988	6	19259	19265
1035	2162	17743	2	19903	19905
1036	3362	15917	5	19274	19279
1040	8077	11190	5	19262	19267
1041	3328	14931	9	18250	18259
1042	7664	11861	2	19523	19525
1043	5144	14317	9	19452	19461
1044	6963	12980	17	19926	19943
1045	10634	8891	10	19515	19525
1046	10217	8706	6	18917	18923
1047	7958	11659	3	19614	19617
1048	7020	12298	14	19304	19318
1049	7431	12066	14	19483	19497

Sarjan 6 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1019	1027	18058	3	19082	19085
1026	6194	13071	6	19259	19265
1035	2124	17781	2	19903	19905
1036	3254	16025	3	19276	19279
1040	7987	11280	4	19263	19267
1041	3285	14974	9	18250	18259
1042	7611	11914	1	19524	19525
1043	5082	14379	9	19452	19461
1044	6903	13040	16	19927	19943
1045	10572	8953	9	19516	19525
1046	10147	8776	6	18917	18923
1047	7886	11731	2	19615	19617
1048	6976	12342	12	19306	19318
1049	7351	12146	13	19484	19497

Sarjan 7 tulokset kynnyksarvolla 2500

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1001	137,00	0,14	0,10 %	2 739,00	2,84
1003	700,00	0,08	0,01 %	13 993,00	1,63
1050	405,00	0,08	0,02 %	8 109,00	1,53
1051	149,00	0,18	0,12 %	2 975,00	3,58
1052	110,00	0,00	0,00 %	2 196,00	0,00
1053	216,00	0,07	0,03 %	4 326,00	1,38
1054	64,30	0,07	0,11 %	1 286,00	1,43
1055	322,00	0,08	0,03 %	6 431,00	1,67
1056	432,00	0,15	0,03 %	8 634,00	2,98
1057	855,00	0,28	0,03 %	17 100,00	5,52
1058	673,00	0,34	0,05 %	13 452,00	6,72
1059	431,00	0,47	0,11 %	8 613,00	9,47

Sarjan 7 tulokset kynnyksarvolla 3000

näyte- numero	WT (kopioita/μl)	Thr790Met (kopioita/μl)	tautiprosentti	WT (kopioita/20 μl)	Thr790Met (kopioita/20 μl)
1001	133	0,142	0,11 %	2651	2,84
1003	688	0	0,00 %	13763	0
1050	397	0,0767	0,02 %	7945	1,53
1051	145	0,0894	0,06 %	2902	1,79
1052	108	0	0,00 %	2161	0
1053	211	0,0689	0,03 %	4215	1,38
1054	62,5	0,0713	0,11 %	1250	1,43
1055	312	0,0837	0,03 %	6244	1,67
1056	428	0,149	0,03 %	8553	2,98
1057	845	0,276	0,03 %	16903	5,52
1058	658	0,252	0,04 %	13162	5,04
1059	423	0,474	0,11 %	8454	9,47

Sarjan 7 pisaramäärät kynnysarvolla 2500

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1001	1820	14742	2	16560	16562
1003	6464	7956	1	14419	14420
1050	4472	10868	1	15339	15340
1051	1563	11596	2	13157	13159
1052	1173	11992	0	13165	13165
1053	2866	14199	1	17064	17065
1054	877	15616	1	16492	16493
1055	3362	10697	1	14058	14059
1056	4847	10933	2	15778	15780
1057	6609	6186	3	12792	12795
1058	6101	7910	4	14007	14011
1059	4569	10337	6	14900	14906

Sarjan 7 pisaramäärät kynnysarvolla 3000

näyte- numero	pos pisaroita WT	neg pisaroita WT	pos pisaroita Thr790Met	neg pisaroita Thr790Met	pisaroita yhteensä
1001	1765	14797	2	16560	16562
1003	6386	8034	0	14420	14420
1050	4396	10944	1	15339	15340
1051	1527	11632	1	13158	13159
1052	1155	12010	0	13165	13165
1053	2799	14266	1	17064	17065
1054	853	15640	1	16492	16493
1055	3277	10782	1	14058	14059
1056	4809	10971	2	15778	15780
1057	6557	6238	3	12792	12795
1058	6003	8008	3	14008	14011
1059	4499	10407	6	14900	14906