

# **Noroviruksen desinfektio – geenimonistusmenetelmän luotettavuuden parantaminen**

Silvia Grönroos LK

Opiskelijanumero: 013296005

HUS medisiininen tulosyksikkö, Infektiosairauksien klinikka, Sairaalahygieniayksikkö

Helsinki 11.01.2010

Tutkielma

[silvia.gronroos@helsinki.fi](mailto:silvia.gronroos@helsinki.fi)

Ohjaaja: Veli-Jukka Anttila, LT

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty <b>Lääketieteellinen tiedekunta</b>		Laitos – Institution – Department
Tekijä – Författare – Author <b>Silvia Grönroos</b>		
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Noroviruksen desinfektio – geenimonistusmenetelmän luotettavuuden parantaminen</b>		
Oppiaine – Läroämne – Subject		
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year <b>11.01.2010</b>	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages <b>28</b>
Tiivistelmä – Referat – Abstract		
<p>Tässä työssä käytettiin pohjana aikaisemmin julkaistua työtä (Nuanualsuwan ja Cliver, 2002), ja tarkoituksena oli tutkia työssä kuvatun menetelmän soveltuvuutta noroviruksen havaitsemiseen sekä sitä, kuinka erilaiset desinfektioaineet tehoavat noroviruksen eliminoinnissa. Menetelmä perustuu esikäsittelyyn, jossa ennen reaaliaikaista RT-PCR geenimonistusta lisätään näytteisiin proteinaasi K:ta ja ribonukleaasia (RNAsi). Esikäsittelyllä on tarkoitus poistaa vaurioituneet ei-infektiiviset viruspartikkelit ja genomit näytteestä, joka helpottaisi ihmiselle vaarallisen noroviruksen tunnistamista.</p> <p>Norovirusta sisältäviä näytteitä analysoitiin reaaliaikaisella RT-PCR:llä nukleinihapposaostuksen jälkeen. Tulokset vahvistivat mm. etanolin ja kloorin tehon noroviruksen eliminoinnissa. Työssä huomattiin myös, että monet aineet jättivät jälkeensä suuren määrän inaktivoitua virusta, mikä on aikaisemmin saattanut johtaa esimerkiksi etanolin tehon aliarviointiin. Menetelmän käyttökelpoisuus sai myös vahvistuksen, mutta osoitti, että menetelmässä on vielä runsaasti kehittämisen varaa. Esikäsittelymenetelmiä tulisi kehittää spesifisemmiksi jotta niitä voisi hyödyntää käytännössä esimerkiksi epidemioiden yhteydessä ja tutkittaessa uusia desinfektioaineita.</p> <p>(128 sanaa)</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Norovirus, Disinfection, RT-PCR, Ribonucleases, Endopeptidase K</b>		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

1 Johdanto.....	1
2 Noroviruksen esikäsitelymenetelmistä.....	3
3 Aineisto.....	4
3.1 Virusnäyte.....	5
3.2 Optimointikokeiden näytteet .....	5
3.3 Suspensiossa tehtyjen desinfektiokeiden näytteet .....	7
4 Menetelmät .....	10
4.1 Standardisuora .....	10
4.2 Optimointikokeet .....	10
4.3 Suspensiossa tehtyjen desinfektiokeiden näytteiden käsittely.....	13
5 Tulokset .....	14
5.1 Optimointikokeiden tulokset .....	14
5.2 Desinfektiokeiden tulokset .....	17
6 Pohdinta.....	21
Lähteet .....	26

# 1 Johdanto

Kalikiviruksiin kuuluvat norovirukset ovat yleisimpiä vatsatautiepidemioiden aiheuttajia esimerkiksi sairaaloissa, hoitolaitoksissa ja kylpylöissä (1). Viruksista ne ovat akuuttien gastroenteriittien tavallisimpia aiheuttajia. Kansanterveyslaitoksen rekisteröimiä noroviruksen aiheuttamia epidemioita oli Suomessa vuosina 2006 - 2008 jopa 283. Epidemioissa sairastui yhteensä yli 10 000 henkilöä. Vain pieni osa epidemioista ilmoitetaan, joten todellisuudessa sairastuneiden määrä on huomattavasti suurempi. Norovirusinfektioille tyypillisiä piirteitä ovat oireiden äkillinen alkaminen, oksentelu yli puolella potilaista, lyhyt itämisaika (24 - 48 h) ja taudin lyhyt kesto (12 - 72 tuntia).

Norovirus on pieni yksijuosteinen, positiivisäikeinen vaipaton RNA-virus. Norovirukset, jotka kuuluvat genoryhmiin GI, GII ja GIV, aiheuttavat ihmisille vatsatauteja. Näitä tunnetaan tällä hetkellä jo yli 30 tyyppiä. 1990-luvun puolivälissä Yhdysvalloissa ensimmäisenä havaittu GII-genoryhmän genotyypin 4 (GII.4) aiheuttama epidemia levisi pandemian tavoin viiteen maanosaan seuraavina vuosina, ja siitä lähtien GII.4-virukset ovat olleet yleisimpiä norovirusepidemioiden aiheuttajia maailmanlaajuisesti (2). Norovirusten muuntelu on todella nopeaa, mikä estää pitkäaikaisen immunitetin synnyn taudin sairastaneilla ihmisillä.

Suurin osa tautiin sairastuneista on yli 65-vuotiaita. Vaikka norovirusinfektio on itsestään rajoittuva perusterveellä henkilöllä, aiheuttaa se kuitenkin kuolleisuutta vanhuksilla ja muissa normaalia alttiimmissa ryhmissä (immuunipuutteiset). Norovirukset ovat herkästi tarttuvia, ja ne leviävät mm. uloste-käsi-suu-reittiä kosketustartuntana sekä aerosolitartuntana oksennuksen välityksellä hengitysilmaan ja limakalvoille. Tavallisimmin tartunta saadaan syömällä sairaan tai oireettoman henkilön valmistamaa tai käsittelemää ruokaa tai juomalla ulosteen tai oksennuksen saastuttamaa vettä (3). Epidemiologiset tutkimukset hotelli- ja risteilyvieraiden norovirusepidemioissa osoittavat että norovirukset voivat säilyä kuivilla pinnoilla infektiokykyisinä jopa viikkoja (4,5). Näin ollen myös tartunta pintojen välityksellä pitkänkin ajan sisällä on mahdollista. Tartuntaan riittää hyvin pieni määrä

viruspartikkeleita. Todennäköisyys saada tartunta yhdestä viruspartikkelista on noin 0,5 (6).

Norovirukset ovat kestäviä ja näin ollen on käytettävä tarpeeksi tehokkaita desinfektioaineita jotta virusta ei levitetäisi edelleen esimerkiksi siivoojan ja puhdistusvälineiden välityksellä ja että virus saataisiin eliminoitua mahdollisimman varhaisessa vaiheessa (7-9). Viime vuosina noroviruksen merkitys sairaaloita kuormittavana tekijänä on lisääntynyt; norovirusepidemiat sairaaloissa johtavat usein osastojen sulkemiseen (10). Sairaalassa saatu norovirusinfektio täyttää hoitoon liittyvän infektion eli sairaalainfektio kriteerit, mutta näitä ei kuitenkaan aina huomata rekisteröidä sairaalainfektioirekisteriin, vaikka niiden merkitys taloudellisesti kalliiden epidemioiden aiheuttajana on kiistaton (11,12). Sairaalapintojen merkitystä infektioiden leviämässä ja pitkittymässä on pitkään aliarvioitu. Kissan kalikiviruksella tehdyissä kontaminoiduilla käsillä voitiin siirtää virusta seitsemälle seuraavalle pinnalle (13,14).

Norovirus voidaan tunnistaa ulosteesta elektronimikroskopiolla, geenimonistukseen (käänteistranskriptaasi PCR eli RT-PCR) tai antigeenin osoitukseen (ELISA) perustuvilla menetelmillä. RT-PCR on näistä herkin menetelmä. Tavallisen PCR:n ongelma on kuitenkin se, että se on kvalitatiivinen menetelmä, ja se pystyy ainoastaan sanomaan, onko näytteessä tiettyä geenisekvenssiä vai ei. Sen takia onkin kehitelty reaaliaikainen RT-PCR, koska se on nopea, kvantitatiivinen menetelmä, joka mittaa myös geenimateriaalin määrää näytteessä. Tämä tapahtuu siten, että ajettavaan näytteeseen on lisätty fluoresoivalla komponentilla merkittyjä koettimia, ja monistumisen tapahtuessa RT-PCR-laite rekisteröi fluoresenssin määrän, joka siis korreloi näytteen sisältämään RNA-määrään. Reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä on kuitenkin vielä suhteellisen isot virhemarginaalit määrien suhteen, ja jopa kaksinkertaiset heitot tuloksissa suuntaan tai toiseen ovat mahdollisia. Tämä on siis aina otettava huomioon tuloksia analysoitaessa. Uusin kehitetty menetelmä RNA:n monistamiseen on NASBA-menetelmä, jonka etuina perinteiseen RT-PCR:ään verrattuna ovat mahdollisesti nopeus ja parempi sensitiivisyys, mutta menetelmä ei ole vielä laajassa diagnostisessa käytössä sairaaloissa. Menetelmä on kuitenkin ollut olemassa jo kymmenisen vuotta, mutta se ei ole saanut jalansijaa RT-PCR-tekniikalta.

Koska noroviruksen viljely ei lukuisista yrityksistä huolimatta ole onnistunut laboratoriossa (15), korrelaatiota viruksen RNA:n havaitsemisen ja viruspartikkelien määrän ja niiden infektiivisyyden määrittämisen välillä on mahdotonta. Näin ollen ei RT-PCR:n keinoin voida varmasti erottaa infektiivistä ja inaktivoitua, ja näin ollen ihmisen terveydelle vaaratonta, virusta toisistaan. Voidaan siis kuitenkin olettaa, että virus-RNA:n puuttuminen tarkoittaa melko varmasti infektiivisten partikkeleiden puuttumista, mutta positiivisen tuloksen infektiivisyys on aina epävarmaa (16). Noroviruksen kestävyyttä desinfektioaineille on tutkittu lähinnä kissan kalikiviruksella (17), sekä myöhemmin myös hiiren noroviruksella (18), joiden on oletettu olevan sopiva korvike. Näiden virusten infektiokyky voidaan mitata soluviljelymenetelmällä, eli niitä voidaan, toisin kuin norovirusta, viljellä ongelmitta.

Tässä työssä oli tarkoitus tutkia menetelmää, jossa ennen RT-PCR geenimonistusta tehdään esikäsittely proteinaasi K:lla ja ribonukleasilla (RNAasi). Esikäsittelyn tarkoituksena on poistaa vaurioitunut ja näin ei-infektiivinen viruksen perintömateriaali (19). Samankaltaista inaktivaatio-menetelmää on käytetty muualla (20,21). Menetelmän avulla toivotaan saatavan tuloksia, jotka aikaisempaa paremmin korreloisivat todellisen infektiivisen materiaalin määrään. Tutkimuksessa keskeisessä osassa oli Nuanualsuwanin ja Cliverin (19) kehittämän menetelmän kokeileminen noroviruksilla, käyttökelpoisuuden arviointi reaaliaikaisen RT-PCR:n kanssa sekä kehittäminen käytännössä noroviruksen desinfektiokeiteiden avulla. Tarkoituksena oli myös samalla arvioida eri puhdistus- ja desinfektioaineiden tehoa noroviruksen eliminoinnissa ja optimoida desinfektiokeiteen suorittaminen mahdollisimman hyvin, jotta tuloksista saataisiin mahdollisimman luotettavia. Tutkimuksessa verrattiin yleisesti puhdistuksessa käytettyjen klooriyhdisteiden tehoa uudempiin aineisiin.

## **2 Noroviruksen esikäsittelymenetelmistä**

Nuanualsuwanin ja Cliverin (2002) tarkoituksena oli kehittää esikäsittelymenetelmä näytteille, jotta RT-PCR ei havaitse inaktivoituja viruksia. Malliviruksina

tutkimuksessa käytettiin hepatiitti A-, polio- ja kissan kalikivirusta noroviruksen korvikkeena. Virukset inaktivoitiin joko UV-valolla, hypokloriitilla tai 72 °C asteen lämpökäsittelyllä. Nämä inaktivoituneet virukset käsiteltiin proteinaasi K:lla ja RNAsilla 30 minuutin ajan 37 °C asteessa ennen RT-PCR-ajoa. Tällä tavoin RT-PCR:ssä ei havaittu virusta. (19) Tulokset olivat melko yksiselitteiset tutkittujen virusten osalta, mutta kissan kalikivirus saattaa kuitenkin olla epätäydellinen ihmisille vaarallisen noroviruksen korvikkeeksi, koska näiden virusten herkkyudessa ympäristön vaikutuksille on suuria eroja (20). Tätä menetelmää on myös nimenomaan kokeiltu tavanomaisen RT-PCR:n kanssa, joten se ei välttämättä sovellu sellaisenaan reaaliaikaisen RT-PCR:n kanssa käytettynä (19). Aikaisemmissa töissä (22) on myös saatu viitteitä siitä, että proteinaasi K:lla olisi RNAsia pilkkova vaikutus, ja tällä saattaa olla merkitystä tehtäessä samanaikainen käsittely proteinaasi K:lla ja RNAsilla. Näiden seikkojen takia olisikin tärkeää tehdä kokeita oikealla ihmisen noroviruksella, jotta voitaisiin välttää epävarmuustekijät käytettäessä korviketta, joka kuitenkin nimensä mukaisesti on vain korvike kiinnostuksen kohteena olevalle mikrobille.

Lamhoujeb et al. (2008) käyttivät työssään samaa esikäsittelymenetelmää, kuitenkin merkittävin muutoksin, mutta liittivät siihen reaaliaikaisen NASBA-menetelmän noroviruksen genomien monistamiseen. Kokeessa verrattiin myös kissan kalikiviruksen ja ihmisen noroviruksen kestävyyttä lämpökäsittelylle ja entsyymeille, ja selvisi, että kissan kalikivirus on ilmeisesti paljon norovirusta sensitiivisempi ympäristön vaikutuksille. (20)

### 3 Aineisto

Aineisto koostuu suspensiossa laboratorio-olosuhteissa tehdyistä virusta ja desinfektioainetta sisältävistä näytteistä. Aineiston analyysi tapahtui nukleiinihapposaostuksen ja reaaliaikaisen RT-PCR:n keinoin.

### 3.1 Virusnäyte

Tutkimuksessa käytettävä viruspitoinen näyte (07KA5755) on ulostenäyte, josta on tehty 10 % suspensio. Virusnäyte on Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriltä vuonna 2007 saatu potilasnäyte, joka on saatu etsittäessä ripuloivalta potilaalta kalikivirusta ulostetutkimuksilla. Virusnäyte sisältää GII-genoryhmän genotyypittämätöntä norovirusta. Standardisuoraa, optimointikokeita sekä desinfiointikokeita varten näytteestä tehtiin vielä 1 millilitra 10 % laimennosta.

### 3.2 Optimointikokeiden näytteet

Työ aloitettiin entsyymikäsittelyn optimointikokeilla (kolme optimointikoetta), joissa oli tarkoitus kokeilla proteinaasi K:n ja RNAsin tehoa yhdessä ja yksin sekä UV-käsittelyllä ja ilman UV käsittelyä. Kokeissa selvitettiin myös kuinka kauan UV-käsittelyä kannattaa jatkaa. UV-käsittelyn näytteen, johon on lisätty entsyymejä, tulisi reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä antaa negatiivinen tulos, koska entsyymit ovat poistaneet näytteestä UV-valon inaktivoimat infektiokykynsä menettäneet virukset (19).

Näyte nro.	Käsittelyt
1.	UV-käsittely, entsyymit*
2.	UV-käsittely, ei entsyymejä
3.	Ei UV-käsittelyä, entsyymit*
4.	Ei UV-käsittelyä, ei entsyymejä
* Entsyymit proteinaasi K (20 U in 6,6 µl, 10 % laimennos) ja RNAsi (100 ng in 5 µl, TBE puskurissa)	

**Taulukko 1. Käsittelykaava ensimmäisessä optimointikokeessa**

Optimointikokeita varten pipetoitiin 4-6 objektilasille 100 mikrolitraa 1:9 laimennettua näytettä. Kaikki näytelasit pidettiin vetokaapissa UV-käsittelyn (ei ollenkaan, 0,5 h tai 1



h) ajan, myös ne lasit jotka eivät saaneet UV-käsittelyä, pidettiin vetokaapissa kuvun alla. UV-käsittelyn jälkeen tehtiin näytelasien huuhtelu PBS-puskurilla (2 kertaa 100 µl) puhtaisiin Eppendorf-putkiin. Tämän jälkeen lisättiin myös entsyymit (proteinaasi K ja RNAsi) putkiin alla käsittelykaavojen (taulukot 1, 2 ja 3) mukaisesti. Putket siirrettiin tämän jälkeen kevyessä heilutuksessa 37 °C lämpökaappiin 30 minuutiksi.

Näyte nro.	Käsittelyt
1.	UV-käsittely 1 h, entsyymit*
2.	UV-käsittely 0,5 h, entsyymit*
3.	UV-käsittely 1 h, ei entsyymejä
4.	Ei UV-käsittelyä, entsyymit*
5.	Ei UV-käsittelyä, ei entsyymejä
* Entsyymit proteinaasi K (20 U in 6,6 µl, 10 % laimennos) ja RNAsi (100 ng in 5 µl, TBE puskurissa)	

**Taulukko 2. Käsittelykaava toisessa optimointikokeessa**

Näyte nro.	Käsittelyt
1.	Ei UV-käsittelyä, ei entsyymejä
2.	UV-käsittely 1 h, ei entsyymejä
3.	UV-käsittely 1 h, vain proteinaasi K*
4.	UV-käsittely 1 h, vain RNAsi*
5.	UV-käsittely 1 h, molemmat entsyymit*
6.	UV-käsittely 1 h, ensin proteinaasi K 15 minuutin ajan, sitten RNAsi 30 minuuttia
* Entsyymit proteinaasi K (20 U in 6,6 µl, 10 % laimennos) ja RNAsi (100 ng in 5 µl, TBE puskurissa)	

**Taulukko 3. Käsittelykaava kolmannessa optimointikokeessa**

### 3.3 Suspensiossa tehtyjen desinfektiokokeiden näytteet

Desinfektiokokeet tehtiin suspensiossa. Kokeissa käytettiin virusnäytettä A5755 (HUS, 2007). Viruspreparaatista tehtiin desinfektiokokeita varten 10 % laimennos jossa oli 5 µl alkuperäistä näytettä ja 45 µl PBS:ää, josta siis saadaan 50 µl näytesuspensiota.

Ensimmäisessä kokeessa käytettiin desinfektioaineina vetyperoksidipohjaista hapanta peroksygeeniä (Oxivir®, stabiloitu vetyperoksidi), denaturoitua etanolia (80 %), yleispuhdistusainetta (heikosti emäksinen, 5 % laimennos) sekä PHMG:tä (polyheksametyleeniguanidi, 0,5 % laimennos). Näytteisiin pipetoitiin 5 µl virusnäytteen laimennosta ja 5 µl desinfektioainetta. Jotta saataisiin mukaan myös näyte, joka ei sisällä mitään desinfektioainetta, tehtiin myös näyte joka sisälsi 5 µl virusnäytteen laimennosta ja 5 µl PBS:ää. Aineiden annettiin vaikuttaa 1 minuutti 15 sekuntia jonka jälkeen ne laimennettiin PBS:ään (1/100, 990 µl PBS:ää + 10 µl näytettä) nopeasti desinfektioaineiden vaikutuksen lopettamiseksi.

Näyte nro.	Näyte
1.	Stabiloitu vetyperoksidi
2.	Stabiloitu vetyperoksidi + entsyymit*
3.	Denaturoitu etanoli 80 %
4.	Denaturoitu etanoli 80 % + entsyymit*
5.	Yleispuhdistusaine
6.	Yleispuhdistusaine + entsyymit*
7.	PHMG 0,5 %
8.	PHGM 0,5 % + entsyymit*
9.	PBS
10.	PBS + entsyymit*
11.	Alkuperäinen virusnäyte 5755 1:10, 5 µl
12.	H <sub>2</sub> O (negatiivinen saostuskontrolli)
*Entsyymit proteinaasi K (20 U in 6,6 µl, 10 % laimennos) ja RNAsi (100 ng in 5 µl, TBE puskurissa)	

**Taulukko 4. Ensimmäisen desinfektiokokeen näytekäava**

Tämän jälkeen näytteet (1000 µl) jaettiin kahteen erään, joista toiselle tehtiin proteinaasi K- ja RNAsi-käsittely. Ne näytteet jotka eivät saaneet proteinaasi K- ja RNAsi-käsittelyä laitettiin jääkaappiin laimentamisen jälkeen. Proteinaasi K-käsittely annettiin ensin 15 minuutin ajan ja sen jälkeen lisättiin joukkoon myös RNAsi 30 minuutiksi. Proteinaasi K sai siis yhteensä vaikuttaa 45 minuutin ajan. Käsittely tehtiin tavalla joka optimointikokeiden perusteella osoittautui parhaimmaksi. Käsittelyn ajaksi näytteet sijoitettiin lämpöhuoneeseen (37 °C) rauhallisessa heilutuksessa. Näytteitä tehtiin 12 kappaletta taulukon 5 mukaisesti. Kaksi viimeistä näytettä otettiin mukaan nukleinihapposaostukseen.

Toisessa desinfektiokokeessa käytettiin desinfektioaineina vetyperoksidipohjaista hapanta peroksygeeniä (Oxivir®, stabiloitu vetyperoksidi), denaturoitua etanolia (80 %), yleispuhdistusainetta (heikosti emäksinen, 5 % laimennos) ja kloramiini T:tä (klooriyhdiste, 5000 ppm:n vahvuinen laimennos). Näytteisiin pipetoitiin 5 µl virusnäytteen laimennosta ja 5 µl desinfektioainetta kuten ensimmäisessäkin kokeessa. Desinfektioainetta sisältämättömäksi kontrolliksi tehtiin näyte joka sisälsi 5 µl virusnäytteen laimennosta ja 5 µl PBS:ää. Aineiden annettiin vaikuttaa aineesta ja ohjeistuksessa suositelluista vaikutusajoista riippuen 2 – 15 minuuttia (Taulukko 5), jonka jälkeen ne laimennettiin PBS:ään (1/100, 990 µl PBS:ää + 10 µl näytettä) nopeasti desinfektioaineiden vaikutuksen lopettamiseksi.

Tämän jälkeen näytteet (1000 µl) jaettiin kahteen erään, joista toiselle annettiin proteinaasi K- ja RNAsi-käsittely. Ne näytteet jotka eivät saaneet proteinaasi K- ja RNAsi-käsittelyä laitettiin jääkaappiin laimentamisen jälkeen. Proteinaasi K-käsittely annettiin ensin 15 minuutin ajan ja sen jälkeen lisättiin joukkoon myös RNAsi 30 minuutiksi. Proteinaasi K sai siis yhteensä vaikuttaa 45 minuutin ajan. Käsittelyn ajaksi näytteet sijoitettiin lämpöhuoneeseen (37 °C) rauhallisessa heilutuksessa. Näytteitä tehtiin 12 kappaletta taulukon 5 mukaisesti. Kaksi viimeistä näytettä otettiin mukaan nukleinihapposaostukseen.

PBS-kontrollinäytteen 5 minuutin lämpökäsittely 98 °C asteessa ja 2 minuutin jäähdytys jäällä tehtiin, koska edellisessä desinfektiokokeessa PBS-näyte, johon oli lisätty

entsyymit (näyte 10), antoi tulokseksi isomman PCR-yksiköiden määrän kuin PBS ilman entsyymejä. Jos syynä olisi ollut se, että lyysispuskuri ei hajotakaan kaikkia viruspartikkeleita, niin lämpökäsittelyllä taataan, että hajoaminen varmasti tapahtuu.

<b>Näyte nro.</b>	<b>Näyte</b>	<b>Aineen vaikutusaika</b>
1.	Stabiloitu vetyperoksidi	5 minuuttia
2.	Stabiloitu vetyperoksidi + entsyymit*	5 minuuttia
3.	Denaturoitu etanoli 80 %	2 minuuttia
4.	Denaturoitu etanoli 80 % + entsyymit*	2 minuuttia
5.	Yleispuhdistusaine	5 minuuttia
6.	Yleispuhdistusaine + entsyymit*	5 minuuttia
7.	Kloramiini T	15 minuuttia
8.	Kloramiini T + entsyymit*	15 minuuttia
9.	PBS	15 minuuttia
10.	PBS + entsyymit*	15 minuuttia
11.	PBS + 98 °C	15 minuuttia
12.	Alkuperäinen virusnäyte 5755 1:10, 5 µl	-
13.	H <sub>2</sub> O (negatiivinen saostuskontrolli)	-
*Entsyymit proteinaasi K (20 U in 6,6 µl, 10 % laimennos) ja RNAsi (100 ng in 5 µl, TBE puskurissa)		

**Taulukko 5. Toisen desinfektiokokeen näytekaava**

## 4 Menetelmät

### 4.1 Standardisuora

Näytteiden analysointi aloitettiin RNA-standardisuoran tekemisellä LightCycler:ille. LightCycler:illa tehdyssä standardisuorassa alkuperäistä virusnäytettä 07KA 5755 oli titrattu  $10^{-1}$  –  $10^{-9}$  laimennoksiin. Laimennoksille suoritetusta RT-PCR:stä valittiin titteri  $10^{-4}$  (CT 31,84) optimointikokeita (ensimmäinen ja toinen) ja desinfektiokeiteita varten.

### 4.2 Optimointikokeet

Optimointikokeiden näytteiden analysointi aloitettiin nukleiinihapposaostuksella, ja sen jälkeen tehtiin reaaliaikainen RT-PCR-analyysi. Kaksi ensimmäistä koetta analysoitiin LightCycler 2.0:lla, mutta kolmas jouduttiin tekemään Rotorgenella LightCycler:in mentyä epäkuntoon.

#### 4.2.1 Nukleiinihapposaostus

Nukleiinihapposaostus näytteistä tehtiin käyttäen piidioksidia sisältäviä magneettisia silicahelmiä (biosidisuspensiossa), kolmea eri puskuriliuosta, eluointipuskuria (NucliSens Magnetic Extraction Reagents, bioMérieux) sekä miniMAG-laitetta (NucliSens, bioMérieux).

Tässä vaiheessa otettiin kokeisiin mukaan kaksi putkea lisää, joista toiseen laitettiin 100  $\mu$ l alkuperäistä, jääkaapissa säilytettyä näytettä ja toiseen 100  $\mu$ l vettä negatiiviseksi kontrolliksi RT-PCR:ää varten. Näytteet siirrettiin putkiin, jotka sisälsivät 2 ml lyysispuskuria ja sen jälkeen lisättiin RNAsin inhibiittori lopettamaan RNAsin toiminnan. Magneettipartikkelit vorteksoitiin ensin hyvin, ja sen jälkeen kaikkiin

putkiin lisättiin 50 µl silicahelmiä. Tämän jälkeen putket sekoitettiin nopeasti ja inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Sen jälkeen tehtiin putkien fuugaus kahden minuutin ajan 1500 g:ssa (Eppendorf Centrifuge 5810R).

Tämän jälkeen poistettiin näytteiden neste pipetillä. Putkiin lisättiin 400 µl pesupuskuria 1 (sisältää guaniditiosyanaattia) ja pipetoitiin seos seitsemään 1,5 ml miniMAG-putkeen. Näytteitä pestiin 30 sekuntia miniMAG-laitteella ja sen jälkeen poistettiin kaikki neste pipetoimalla. Putkiin lisättiin taas 400 µl pesupuskuria 1, näytteitä pestiin 30 sekuntia ja kaikki neste poistettiin. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 500 µl pesupuskuria 2 (sisältää orgaanista puskuri- ja biosidiliuosta) jonka jälkeen pesu ja nesteen poisto toistettiin. Putkiin lisättiin tämän jälkeen vielä toistamiseen pesupuskuria 2 ja pesu sekä nesteen poisto toistettiin. Tämän jälkeen siirryttiin pesupuskuriin 3 (sisältää orgaanista puskuria), jota pipetoitiin 500 µl näytteisiin, ja sitten pestiin 15 sekuntia ja poistettiin ylimääräinen neste. Pesujen jälkeen lisättiin näytteisiin 50 µl eluointipuskuria (sisältää orgaanista puskuria) ja näytteet vorteksoitiin lyhyesti. Putkia inkuboitiin 5 minuuttia lämpöblokkissa 60 °C-asteessa. Sitten putket siirrettiin takaisin magneettitelineeseen ja eluutti siirrettiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin pipetoimalla kaikki neste näyteputkista.

## 4.2.2 Kvantitatiivinen reaaliaikainen RT-PCR

Tämän jälkeen suoritettiin RT-PCR reaaliaikaisesti. RT-PCR tehtiin käyttäen kvantitatiivista reaaliaikaista yhden vaiheen QuantiTect® Probe RT-PCR-kittiä (QIAGEN). Tämän menetelmän perusteet on kuvattu aikaisemmassa artikkelissa (23). Kahden ensimmäisen optimointikokeen näytteet ajettiin LightCycler 2.0:lla ja viimeisen optimointikokeen näytteet Rotorgene:lla.

Ensimmäisessä optimointikokeessa reaktioseos sisälsi 90 µl QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix:iä (HotStarTaq® DNA Polymerase, QuantiTect Probe RT-PCR Buffer, dNTP mix, ROX, MgCl<sub>2</sub>), 39,6 µl noroviruksen genotyyppi G2 primereita ja probeja

(18 µl Primer F, 18 µl Primer R, 3,6 µl Probe), 1,8 µl QuantiTect RT-mix:iä ja 3,6 µl RNAsi-vapaata vettä.

Alukkeet tai koetin	Sekvenssi <sup>a</sup>
Aluke F (QNIF2D)	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA
Aluke R (COG2R)	TCGACGCCATCTTCATTCAACA
Koetin (QNIFS)	FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA <sup>b</sup>
<p>a R (A tai G), W (A tai T).</p> <p>b Koetin merkitty 6-karboksy fluoreseiinillä (FAM) 5'-päästä ja 6-karboksy-tetrametyylirodamiinilla (TAMRA) 3'-päästä.</p>	

**Taulukko 6. Alukkeet ja koetin joita käytettiin G2-noroviruksen havaitsemiseen RT-PCR-analyysissä (23)**

Toisessa optimointikokeessa reaktioseos sisälsi 100 µl QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix:iä (HotStarTaq® DNA Polymerase, QuantiTect Probe RT-PCR Buffer, dNTP mix, ROX, MgCl<sub>2</sub>), 44 µl noroviruksen genotyyppi G2 primereita ja probeja (20 µl Primer F, 20 µl Primer R, 4 µl Probe), 2 µl QuantiTect RT-mix:iä ja 4 µl RNAsi-vapaata vettä.

Kolmannessa optimointikokeessa reaktioseos sisälsi 120 µl QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix:iä (HotStarTaq® DNA Polymerase, QuantiTect Probe RT-PCR Buffer, dNTP mix, ROX, MgCl<sub>2</sub>), 52,8 µl noroviruksen genotyyppi G2 primereita ja probeja (24 µl Primer F, 24 µl Primer R, 4,8 µl Probe), 2,4 µl QuantiTect RT-mix:iä ja 4,8 µl RNAsi-vapaata vettä.

RT-PCR tehtiin LightCycler 2.0:lla tehtiin seuraavissa olosuhteissa: käänteiskopiointi 50 °C-asteessa 20 minuutin ajan, PCR:n aktivaatiovaihe (polymeraasin aktivaatio, käänteiskopioijan inaktivaatio) 95 °C-asteessa 15 sekunnin ajan, ja sitten 50 sykliä monistusta; denaturaatio 95 °C-asteessa 3 sekunnin ajan, annealing 54 °C-asteessa 25 sekunnin ajan, ekstensio 72 °C-asteessa 25 sekunnin ajan ja sitten jäähdytys 30 sekunnin ajan.

RT-PCR tehtiin Rotorgene:lla seuraavissa olosuhteissa: käänteiskopiointi 50 °C-asteessa 30 minuutin ajan, PCR:n aktivaatiovaihe (polymeraasin aktivaatio, käänteiskopioijan inaktivaatio) 95 °C-asteessa 15 minuutin ajan, ja sitten 50 sykliä monistusta; denaturaatio 94 °C-asteessa 15 sekunnin ajan ja kombinoitu annealing/ekstensio 60 °C-asteessa 60 sekunnin ajan.

### **4.3 Suspensiossa tehtyjen desinfektiokeiden näytteiden käsittely**

Molemmissa desinfektiokeissa kaikkiin näytteisiin (500 µl) lisättiin 2 ml lyysipuskuria. Jokaiseen putkeen lisättiin myös 1 µl RNAsin inhibiittoria. Sen jälkeen näytteitä inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen suoritettiin nukleinihapposaostus ja reaaliaikainen RT-PCR.

#### **4.3.1 Nukleinihapposaostus**

Nukleinihapposaostus näytteistä tehtiin käyttäen samaa menetelmää kuin edellä kuvatussa optimointikokeiden näytteiden nukleinihapposaostuksessa (luku 4.2.1). Ekstraktiossa käytettiin bioMérieux:in reagensseja ja miniMAG-laitetta (NucliSens).

#### **4.3.2 Desinfektioaineiden mahdollisen inhibition testaus**

Toisessa desinfektiokeessa haluttiin selvittää, ovatko käytetyt kemikaalit mahdollisesti inhibitorisia PCR-ensyymeille. Tätä varten tehtiin jokaisesta näytteestä 1:10 laimennos RNA-saostuksen jälkeen ennen PCR-ajoa.



### 4.3.3 Kvantitatiivinen reaaliaikainen RT-PCR

RT-PCR tehtiin käyttäen kvantitatiivista reaaliaikaista yhden vaiheen QuantiTect® Probe RT-PCR-kittiä (QIAGEN). Tämä menetelmä on kuvattu aikaisemmin optimointikokeiden näytteiden käsittelyä kuvaavassa luvussa (4.2.2). Ajossa käytettiin LightCycler 2.0:llä.

PCR:ää varten valmistettava reaktioseos sisälsi QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix:iä (HotStarTaq® DNA Polymerase, QuantiTect Probe RT-PCR Buffer, dNTP mix, ROX, MgCl<sub>2</sub>), noroviruksen genotyyppi G2 primereita (Primer R ja Primer F) ja probeja, QuantiTect RT-mix:iä ja RNAsi-vapaata vettä. Alukkeet ja koetin, joita käytettiin, on kuvattu aikaisemmassa artikkelissa (23).

RT-PCR tehtiin LightCycler 2.0:lla seuraavissa olosuhteissa: käänteiskopiointi 50 °C-asteessa 20 minuutin ajan, PCR:n aktivaatiovaihe (polymeraasin aktivaatio, käänteiskopioijan inaktivaatio) 95 °C-asteessa 15 sekunnin ajan, ja sitten 50 sykliä monistusta; denaturaatio 95 °C-asteessa 3 sekunnin ajan, annealing 54 °C-asteessa 25 sekunnin ajan, ekstensio 72 °C-asteessa 25 sekunnin ajan ja sitten jäähdytys 30 sekunnin ajan.

## 5 Tulokset

### 5.1 Optimointikokeiden tulokset

Optimointikokeita tehtiin yhteensä kolme kappaletta. Näiden kokeiden tarkoitus oli proteinaasi K:n ja RNAsin käytön kokeilu ja aikaisemmin kuvaillun menetelmän optimointi (19). Näiden kokeiden perusteella voitaisiin tehdä desinfektio-kokeet, jotta löydettäisiin ihanteellisin tapa käsitellä norovirusta sisältäviä näytteitä. Näissä kokeissa UV-valo korvasi desinfektioaineen vaikutuksen, ja jos oletetaan että UV-valo on

riittävän tehokas, sen pitäisi inaktivoida kaikki geneettinen materiaali. Tämä ei kuitenkaan vielä riitä estämään PCR:ää havaitsemasta sitä, vaan inaktivoitun materiaalin pilkkomiseen tarvitaan entsyymit.

Ensimmäisessä optimointikokeessa oli tarkoitus kokeilla, jos näytteestä UV-valon ja entsyymien kombinaatiolla saataisiin negatiivinen (näyte 1, katso Taulukko 1). Tulokset olivat oikean suuntaisia, mutta edellä mainitusta näytteestä ei saatu negatiivista. UV-käsittelyllä ja entsyymeillä oli kuitenkin toivottu vaikutus, myös crossing point-arvojen (sykliä määrä RT-PCR-ajossa jolloin fluoresenssin määrä ylittää raja-arvon, josta seuraa, että ne näytteet joissa RNA:n määrä on pienempi saavat korkeammat CT-arvot) nousut entsyymeillä käsitellyissä näytteissä verrattuna ei-entsyymikäsiteltyihin näytteisiin kertovat epäkelvojen partikkelien määrän selvästä vähenemisestä. Näytteeseen 1 saatiin kuitenkin lähes 3 log<sub>10</sub> pudotus verrattuna näytteeseen, jota ei ollut käsitelty lainkaan (näyte 4). H<sub>2</sub>O saostus ja H<sub>2</sub>O PCR (näytteet 6 ja 7) olivat negatiiviset, joten sekä saostus- että RT-PCR-vaihe onnistuivat.

Näyte nro.	Näytteen käsittely	RTPCRU / 5 µl RNA:ta	Virusmäärän väheneminen (% käsittelemättömästä)	CT-arvo
1.	UV-käsittely, entsyymit	143.3	99,47	33,90
2.	UV-käsittely, ei entsyymejä	565.8	97,92	32,28
3.	Ei UV-käsittelyä, entsyymit	47040	-	27,08
4.	Ei UV-käsittelyä, ei entsyymejä	27200	64,935	27,72
5.	5755 10 <sup>-2</sup> alkuperäinen näyte	77570	-	26,49
6.	H <sub>2</sub> O saostus negatiivinen kontrolli	-	-	-
7.	H <sub>2</sub> O PCR negatiivinen kontrolli	-	-	-
8.	GII 5755 5/09 standardi	1000	-	31,61

**Taulukko 7. Ensimmäisen optimointikokeen tulokset (RT-PCR, LightCycler)**

Toisessa optimointikokeessa käytettiin uudempaa ja tehokkaampaa lamppua, ja tulokset osoittivat nyt inaktivoinnin tapahtuneen. RT-PCR:n havaitsema virusgenomin määrä

laski käsittelemättömään referenssinäytteeseen verrattuna noin 99,999 % eli 5 log<sub>10</sub> verran sekä UV-valon ja entsyymien vaikutuksesta. Ero UV-valolla ja entsyymeillä käsitellyn näytteen ja vain UV-valolla käsitellyn näytteen välillä kertoo entsyymien toiminnasta. Näiden kahden näytteen (näytteet 1 ja 3) välillä on selvä ero, joten entsyymit pienensivät RT-PCR:ssä havaittavaa virusmäärää UV-käsittelyn jälkeen vielä noin 95 % lisää. Toisaalta entsyymeillä käsitellyn ja ei-entsyymeillä käsitellyn näytteen ero kertoo kuinka paljon ei-infektiivistä epäkelvää materiaalia näyte sisältää, ja tästä materiaalista on siis tarkoitus päästä eroon, jotta RT-PCR ei sitä havaitse. Kokeessa selvisi myös, että seuraavassa kokeilussa kannattaa UV-käsittelyä jatkaa tunnin verran. Tässä kokeessa saatiin myös selvästi korkeampia CT-arvoja kuin edellisessä ajossa, mikä kertoo RT-PCR:n havaitseman genomimateriaalin määrän pienenemisestä.

Näyte nro.	Näytteen käsittely	RTPCRU / 5 µl näytettä	Virusmäärän väheneminen (% käsittelemättömästä)	CT-arvo
1.	UV-käsittely 1 h, entsyymit	2.087	100,00	39,42
2.	UV-käsittely 0,5 h, ei entsyymejä	3.594	99,99	38,78
3.	UV-käsittely 1 h, ei entsyymejä	41.38	99,87	35,90
4.	Ei UV-käsittelyä, entsyymit	64920	-	27,23
5.	Ei UV-käsittelyä, ei entsyymejä	36500	78,144	27,91
6.	5755 10 <sup>-2</sup> alkuperäinen näyte	167000	-	26,11
7.	H <sub>2</sub> O saostus negatiivinen kontrolli	-	-	-
8.	H <sub>2</sub> O PCR negatiivinen kontrolli	-	-	-
9.	GII 5755 5/09 standardi	1000	-	32,14

**Taulukko 8. Toisen optimointikokeen tulokset (RT-PCR, LightCycler)**

Kolmannessa kokeessa jouduttiin vaihtamaan PCR-laitetta LightCycler:in mentyä rikki. Tässä kokeessa kokeiltiin entsyymien lisäämistä eri aikaan, koska arveltiin että entsyymit saattaisivat inhiboida toistensa toimintaa. Tulokset osoittivatkin proteinaasi K:n hiukan inhiboivan RNAsin vaikutusta, jonka suuntaisiin tuloksiin myös Lamhoujeb

et al. artikkelissaan aikaisemmin viittasivat (20). Tästä syystä valittiin desinfektiokokeita varten näytteen 6 mukainen käsittelykaava, jolloin saatiin korkein CT-arvo. RNAsi yksinäänkin näyttäisi kuitenkin saavan aikaan suhteellisen hyvän tuloksen, joten ilmeisesti se on proteinaasi K:ta tehokkaampi pilkkoja, ainakin kyseisissä olosuhteissa. Rotorgenellä ei kuitenkaan loppujen lopuksi tehty standardisuoraa, joten kvantitatiivisista luvuista ei voi sanoa mitään, mikä tekee kolmannen kokeen tulosten vertailun muihin ajoihin mahdottomaksi.

Näyte nro.	Näytteen nimi	CT-arvo
1.	Ei UV-käsittelyä, ei entsyymejä	21,30
2.	UV-käsittely 1 h, ei entsyymejä	33,39
3.	UV-käsittely 1 h, vain proteinaasi K-käsittely	27,65
4.	UV-käsittely 1 h, vain RNAsi-käsittely	34,54
5.	UV-käsittely 1 h, molemmat entsyymit	33,22
6.	UV-käsittely 1 h, ensin proteinaasi K 15 minuuttia, sen jälkeen RNAsi, molemmat 30 minuuttia	36,10
7.	$5755 \cdot 10^{-2}$ alkuperäinen näyte	21,76
8.	H <sub>2</sub> O saostus negatiivinen kontrolli	-
9.	H <sub>2</sub> O PCR negatiivinen kontrolli	-

**Taulukko 9. Kolmannen optimointikokeen tulokset (RT-PCR, Rotorgene)**

## 5.2 Desinfektiokokeiden tulokset

Suspensiossa tehtyjen desinfektiokokeiden suorittaminen pohjautui optimointikoikeista saatuihin tuloksiin. Ensimmäisessä kokeessa desinfektioaineina käytettiin vetyperoksidipohjaista hapanta peroksygeeniä (Oxivir®, stabiloitu vetyperoksidi), denaturoitua etanolia (80 %), yleispuhdistusainetta ja PHMG:tä (0,5 %), sekä desinfektioaineiden negatiivisena kontrollina PBS-puskuria. Kokeessa virussuspensiota ja desinfektioainetta sisältäneet laimennetut näytteet jaettiin kahteen erään, ja vain toiseen erään lisättiin entsyymit proteinaasi K ja RNAsi. Nämä näytteet otettiin

analyysiin mukaan jotta nähtäisiin, että ne toimivat desinfektioaineiden kanssa halutulla tavalla, ja että voitaisiin nähdä, kuinka suuri osa inaktivaatiosta on desinfektioaineen vaikutusta ja kuinka suuri osa havaitun materiaalin määrän vähenemisestä johtuu entsyymeistä. Tässä mielessä tulokset olivatkin yksiselitteiset, sillä entsyymit vähensivät jokaisen aineen kohdalla PCR:än havaitsemaa epäkelvon virusgenomin määrää.

Näyte nro.	Desinfektioaine	Entsyymi käsittelyt	RTPCRU / 5 µl RNA:ta	Virusmäärän väheneminen (% PBS:stä)	CT-arvo
1.	Stabiloitu vetyperoksidi	Ei	5206	-	31,88
2.	Stabiloitu vetyperoksidi	Kyllä	2907	52,62	32,56
3.	Den. etanoli 80 %	Ei	2404	34,71	32,79
4.	Den. etanoli 80 %	Kyllä	205.6	96,65	35,68
5.	Yleispuhdistusaine	Ei	9661	-	31,15
6.	Yleispuhdistusaine	Kyllä	6002	2,168	31,71
7.	PHMG 0,5 %	Ei	136.0	96,31	36,16
8.	PHMG 0,5 %	Kyllä	70.21	98,86	36,95
9.	PBS	ei	3682	-	32,28
10.	PBS	kyllä	6135	-	31,68
11.	5755 1:10 alkuperäinen	ei	8073	-	31,36
12.	H <sub>2</sub> O saostus	ei	-	-	-
13.	H <sub>2</sub> O PCR	ei	-	-	-
14.	GII 5755 10 <sup>-4</sup> (standardi)	ei	1000	-	33,82

**Taulukko 10. Ensimmäisen desinfektiokekeen tulokset (RT-PCR, LightCycler)**

Parhaan tuloksen antanut desinfektioaine oli vain vähän norovirusilla tutkittu PHMG 0,5 % -liuoksena. Tämän desinfektioaine vähensi RNA:n määrää noin 96 %. RTPCR-yksikköjä oli 70.21 näytteessä 8, mikä vastaa noin 2 logaritmin pudotusta (99 %). Mikään tutkituista aineista ei siis 1 minuutin ja 15 sekunnin vaikutusajan kuluessa yltänyt 3 logaritmin (eli 99,9 %) pudotukseen, mikä katsotaan riittäväksi osoitukseksi desinfektioaineen tehosta. Kahdessa näytteessä näyttäisi analyysin perusteella olevan

jopa enemmän virusmateriaalia kuin referenssinäytteessä (näyte 9). Toisaalta toisessa näistä näytteistä olikin kyseessä yleispuhdistusaine, minkä sinänsä ei katsota olevan tehokas virusidinen aine. Myöskään vetyperoksidi itsessään ei näytä vähentäneen genomimäärää. Denaturoitu etanoli näyttäisi jättävän jälkeensä kaikista eniten inaktivoitua RT-PCR:n havaitsemaa materiaalia. Ero entsyymikäsittelyn saaneen näytteen (näyte 4) ja entsyymikäsittelyttä jääneen näytteen (näyte 3) välillä on jopa noin 12-kertainen ero jos verrataan RTPCR-yksikköjen määrää / 5 µl näytettä. Kokeen perusteella PHMG ja denaturoitu etanoli olisivat ainakin kyseisen vaikutusajan (1 min 15 s) puitteissa parhaat noroviruskehoavat desinfektioaineet, mutta esimerkiksi stabiloitu vetyperoksidi ei olisi ensinkään tarpeeksi tehokas yleisten standardien mukaan. Seuraavissa desinfektiokeikeissa on tarkoitus lisätä desinfektioaineiden vaikutusaikaa ja ottaa mukaan myös yleisesti käytetty kloori.

Näyte nro.	Desinfektioaine	Entsyymi käsittelyt	RTPCR U / 5 µl RNA:ta	Virusmäärän väheneminen (% PBS:stä)	CT-arvo
1.	Stabil. vetyperoksidi 5 min	ei	2771	-	32,66
2.	Stabil. vetyperoksidi 5 min	kyllä	44,91	98,20	37,51
3.	Den. etanoli 80 % 2 min	ei	596.6	78,49	34,37
4.	Den. etanoli 80 % 2 min	kyllä	1063	57,43	33,79
5.	Yleispuhdistusaine 5 min	ei	6750	-	31,61
6.	Yleispuhdistusaine 5 min	kyllä	2156	13,66	32,95
7.	Kloramin T 15 min	ei	1513	45,44	33,37
8.	Kloramin T 15 min	kyllä	0.4432	99,98	42,96
9.	PBS 15 min	ei	2773	-	32,66
10.	PBS 15 min	kyllä	2497	-	32,78
11.	PBS 15 min + 98 °C	ei	1669	-	33,25
12.	Alkuperäinen 5755 1:10	ei	368.5	-	35,03
13.	H <sub>2</sub> O saostus kontrolli	ei	-	-	-
14.	H <sub>2</sub> O PCR kontrolli	ei	-	-	-
15.	GII 5755 10 <sup>-4</sup> (standardi)	ei	1000	-	33,86

**Taulukko 11. Toisen desinfektiokeikeen tulokset (RT-PCR, LightCycler)**

Näyte nro.	Desinfektioaine (1:10 laimennokset)	Entsyymi käsittelyt	RT-PCR U / 5 µl RNA:ta	Virusmäärän väheneminen (% PBS:stä)	CT-arvo
1.	Stabil. vetyperoksidi 5 min	ei	1717	-	33,22
2.	Stabil. vetyperoksidi 5 min	kyllä	26.56	91,99	38,13
3.	Den. etanoli 80 %	ei	463.2	13,06	34,76
4.	Den. etanoli 80 %	kyllä	60.45	81,77	37,16
5.	Yleispuhdistusaine 5 min	ei	1037	-	33,82
6.	Yleispuhdistusaine 5 min	kyllä	929.3	-	33,94
7.	Kloramin T 15 min	ei	411.2	22,82	34,91
8.	Kloramin T 15 min	kyllä	35.95	89,16	37,78
9.	PBS 15 min	ei	532.8	-	34,60
10.	PBS 15 min	kyllä	331.6	-	35,16
11.	PBS 15 min + 98 °C	ei	414.6	-	34,90
12.	Alkuperäinen 5755 1:10	ei	1300	-	33,55

**Taulukko 12. Toisen desinfektiokekeen laimennettujen näytteiden tulokset (RT-PCR, LightCycler)**

Toisessa desinfektiokekeessä tutkittavina aineina olivat stabiloitu vetyperoksidi, denaturoitu etanoli (80 %), yleispuhdistusaine ja kloramiini T (klooriyhdiste, 5000 ppm:n vahvuinen liuos). Tässä kokeessa lisättiin aineiden vaikutusaikojia edellisessä kokeeseen verrattuna. Kokeessa nähtiin selvästi, että kloramiini T oli tutkituista aineista tehokkain noroviruksen desinfektiossa. Tässä kokeessa se aiheutti lähes neljän logaritmin pudotuksen, joka riittää osoitukseksi siitä, että aine on tarpeeksi tehokas desinfektiossa. Kokeessa huomattiin myös, että entsyymit poistivat merkittävän osan kloramiini T:n inaktivoimasta materiaalista, mikä johtaa siihen, että ilman entsyymikäsittelyä kloramiini T:n teho vaikuttaa selvästi huonommalta kuin mitä se todellisuudessa on. Vetyperoksidin tulos parani myös selvästi, kun vaikutusaikaa lisättiin 1 minuutista 15 sekunnista 5 minuuttiin. Etanolin vaikutus toisaalta jäi tässä kokeessa vaatimattomaksi, mutta entsyymien toiminta tuli selvästi esille tässäkin kokeessa, joskaan ei yhtä selvästi kuin edellisessä desinfektiokekeessä. Mikään aine ei

tässäkään kokeessa saanut aikaan täysin negatiivista tulosta reaaliaikaisessa RT-PCR-ajossa.

Mahdollista desinfektioaineiden RT-PCR-entsyymeihin kohdistuvaa inhibitiota tutkittiin toisen desinfektiokokeen yhteydessä. Jokaisesta näytteestä saadusta RNA:sta tehtiin 1:10 laimennokset. Jos CT-arvo laskee korkeintaan noin 3 kierrosta laimennoksessa verrattuna laimentamattomaan, inhibitiota ei katsota tapahtuneen. Jos laimennos 1:10 antaa tätä pienemmän CT-arvon katsotaan taas, että inhibitiota on ollut. Tässä kokeessa ei kuitenkaan ollut tapahtunut merkittävää inhibitiota. Taulukossa 12 on esitetty laimennettujen näytteiden PCR-ajon tulokset.

## 6 Pohdinta

Tässä tutkielmassa oli tarkoituksena tutkia aikaisemmin kuvatun menetelmän soveltuvuutta noroviruksen havaitsemiseen ja kuinka erilaiset desinfektioaineet tehoavat noroviruksen eliminoinnissa. Tutkimuksessa käytettiin pohjana menetelmää jossa yritetään välttää positiivisia tuloksia inaktivoitujen virusten sisältämästä näytteestä (19). Reaaliaikaisen RT-PCR:än ongelma onkin ollut väärin positiivisten tulosten saaminen näytteistä jotka eivät ole infektiivisiä. Inaktivoitua ja infektiivisen näytteen erottaminen onkin tuottanut päänvaivaa, koska ei yksinkertaisesti ole ollut keinoa erottaa näitä kahta toisistaan. Koska norovirusta ei vielä ole onnistuttu laboratorioissa viljelemään (15), on tärkeää, että kehitetään menetelmiä elävien, infektiivisten virusten tunnistusta varten.

Tutkimuksessa tehtiin yhteensä kolme optimointikoetta, jotta saataisiin selville miten inaktivoitua virusgenomin pilkkominen saataisiin tehokkaimmaksi ja minkälainen olisi optimaalinen koeasetelma. Ensimmäisessä kokeessa käytettiin UV-valoa virusten inaktivointiin, jotta voitaisiin kokeilla entsyymien tehoa negatiivisen RT-PCR-tuloksen saamiseksi. Kokeessa ei kuitenkaan saatu negatiivista tulosta UV-lampun (0,5 h), proteinaasi K:n sekä RNAsin yhdistelmällä. Tässä näytteessä (näyte 1, taulukko 1)



virusmäärä väheni kuitenkin lähes kolmen logaritmin verran. Tulos todennäköisesti johtui UV-lampun iästä ja huonosta tehosta. Tulokset olivat kuitenkin oikeansuuntaisia.

Seuraavassa optimointikokeessa käytettiin uudempaa ja tehokkaampaa lamppua, ja näytteet olivat UV-käsittelyssä joko puoli tuntia tai tunnin. UV-valon (1 h) ja entsyymien yhdistelmällä saatiin virusmäärä putoamaan jo viiden logaritmin verran, ja myös jos näytteelle annettiin ainoastaan UV-käsittely puolen tunnin ajan, tulos oli samankaltainen. Kolmas koe tehtiin eri laitteella, joten CT-arvoja ei voi suoraan verrata eikä tällä laitteella tehty myöskään standardisuoraa, joten kvantitatiivisia lukuja ei ollut käytettävissä. Kokeessa kuitenkin testattiin, toisin kuin Nuanualsuwan et al. (19) jotka lisäsivät entsyymit samaan aikaan, lisätä entsyymit erikseen ja myös hiukan eri aikoihin, kuten myös Lamhoujeb et al. tekivät tutkimuksessaan (20). Näin nähtäisiin miten molemmat entsyymit toimivat erikseen, ja vaikuttavatko ne mahdollisesti toistensa toimintaan. Korkein CT-arvo, 36,10, saatiin lisäämällä 1 tunnin UV-käsittelyn jälkeen ensin proteinaasi K 15 minuutiksi, ja vasta sen jälkeen lisättiin RNAsi, jonka jälkeen entsyymien annettiin vaikuttaa vielä 30 minuuttia. Ilmeisesti siis proteinaasi K inhiboi RNAsin vaikutusta, ja lisäämällä entsyymit eri aikaan saatiin heikoin positiivinen tulos.

Optimointikokeiden perusteella valittiin desinfektiokekeisiin menetelmän soveltamiseen käytännössä yllämainittu menetelmä, jossa entsyymit lisätään erikseen 15 minuutin välein, ja sen jälkeen annetaan entsyymien vielä vaikuttaa 30 minuutin ajan. Tämän siis eroaa aikaisemmin kuvatussa menetelmästä myös sen perusteella, kuinka kauan entsyymit yhteensä saavat vaikuttaa, koska tässä tutkimuksessa proteinaasi K:n annettiin vaikuttaa yhteensä 45 minuuttia. Jatkotutkimuksissa entsyymien vaikutusaikaa voisi vielä entisestään lisätä, ja selvittää paraneeko tulos entisestään. Desinfektiokekeet suoritettiin suspensiossa, koska on tärkeää kehittää toimiva menetelmä, ennen kuin ryhdytään tutkimaan desinfektioaineiden tehoa pintojen desinfektiossa. Suspensiossa tehdyssä kokeessa on paljon vähemmän muuttujia, jotka saattaisivat sotkea kokeen tuloksia ja analysointia. Suspensiossa nähtäisiin myös helposti miten eri desinfektioaineet vaikuttavat geenimonistuksen suorittamiseen.

Ensimmäisessä desinfektiokokeessa saatiinkin selvät erot näytteiden välillä, jotka eivät saaneet proteinaasi K- ja RNAsi-käsittelyä ja niiden jotka olivat saaneet entsyymikäsittelyn. Selvästi suurin inhibitio ensimmäisessä kokeessa saatiin aikaan PHMG:llä ja entsyymeillä. Myös pelkkä PHMG aikaansai melko heikon positiivisen tuloksen. PHMG:n tehoa ei ole ilmeisesti kovin paljon ainakaan norovirusilla tutkittu, koska sen tehosta ja vaikutusajasta ei ole olemassa paljon informaatiota. Tulokset kuitenkin kertovat siitä, että aine voi olla hyvä vaihtoehto esimerkiksi kloorille, koska PHMG ei käyttöpitoisuuksina ole ihmiselle haitallista, eikä se liioin ole pintamateriaaleille haitallinen. Se tunkeutuu myös hyvin orgaanisen lian läpi toisin kuin esimerkiksi alkoholit.

Myös etanolin teho norovirusia vastaan sai vahvistuksen desinfektiokokeista. Näyttäisi kuitenkin siltä, että ainakin 80 % etanoli jättää jälkeensä suuren määrään inaktivoituja viruksia, mikä on voinut johtaa siihen, että aikaisemmissa tutkimuksissa etanolin tehoa on aliarvioitu. Nyt kuitenkin, kun tutkimuksessa on tehty entsyymikäsittelyt näytteille, voidaan todeta, että infektiivisen materiaalin väheneminen on huomattavaa, ja tässä tutkimuksessa tehdyissä kokeissa huomattiin, että etanolikäsittelyn jälkeen yli 90 % ilman esikäsittelyä tehdyn reaaliaikaisen RT-PCR:än havaitsemasta materiaalista onkin itse asiassa ei-infektiivistä ja siten vaaratonta ihmisen terveydelle. Toisessa desinfektiokokeessa tosin etanolin teho oli heikompi, mikä todennäköisesti kertoo reaaliaikaisen RT-PCR:n suurista virhemarginaaleista, mikä onkin sen suurin heikkous. Tulokset voivat vaihdella hyvinkin paljon, ja tämä osoittaa, että jotta tuloksista saataisiin todella luotettavia, on kokeita toistettava useita kertoja, mikä ei kuitenkaan tämän tutkimuksen puitteissa ollut mahdollista. Tässä kokeessa käytettiin 80 % etanolia, mutta olisi syytä tutkia laajemmin myös erivahvuisia liuoksia, koska esimerkiksi erilaisissa käsihuuhteissa etanolin ja muiden käytettyjen alkoholien pitoisuudet poikkeavat toisistaan. Jatkotutkimuksissa olisi syytä selvittää myös muiden käsihuuhteissa käytettyjen alkoholien, kuten isopropanolin teho noroviruksen eliminoinnissa.

Vetyperoksidipohjainen hapan peroksygeeni (Oxivir®), jota käytetään mm. laboratorioissa pintojen puhdistukseen, ei ensimmäisessä suspensiokokeissa

osoittautunutkaan olevansa tehokas noroviruksen inaktivoinnissa. Kun vaikutusaika oli 1 min 15 s, vähensi aine infektiivisten partikkelien määrää vain 53 %, joka ei läheskään yllä tehokkaaksi laskettavan desinfektioaineen tasolle. Toisessa kokeessa 5 minuutin vaikutusajalla vetyperoksidin teho parani, ja ilmeisesti sen pitäisikin vaikuttaa jopa 15 minuutin ajan jotta se ehtisi tehot. Tätä ainetta käytettäessä olisikin tärkeää antaa aineen todella vaikuttaa tarpeeksi kauan, koska muuten infektiivistä virusmateriaalia saattaa käsittelyn jälkeen jäädä sekä pinnalle että puhdistukseen käytettyihin välineisiin.

Kloramiini T:n teho noroviruksen eliminoinnissa on tiedetty jo kauan, ja myös tässä koeasetelmassa se kävi selvästi ilmi. Myös kloramiini T:n tehoa on kuitenkin saatettu aliarvioida, sillä entsyymien poistaman inaktivoitun materiaalin määrä oli huomattava, ja ilman entsyymikäsittelyä genomimäärä ei vähentynyt läheskään tehokkaan desinfektioaineen vaatimusten mukaisen osuuden verran.

Tämän tutkimuksen puitteissa tehtiin vain muutamia desinfektiokokeita, koska tarkoitus oli lähinnä tutkia menetelmän sopivuutta ja toimivuutta. Tämän työn puitteissa tehdyt kokeet osoittivat, että työn pohjana olleen menetelmän (19) periaate on toimiva, vaikkakin menetelmän lisäkehittelyä kaivataan useampien samankaltaisten kokeiden muodossa. Tutkimuksen tulokset kertovat kuitenkin yksiselitteisesti siitä, että nykyisellään käytettävät noroviruksen havaitsemiseen tarkoitetut menetelmät ovat liian herkkiä, sillä ihmisen terveydelle vaarallisen infektiivisen noroviruksen määrä voidaan helposti yliarvioida, eikä niistä ole hyötyä eroteltaessa infektiivisiä ja ei-infektiivisiä viruksen osia toisistaan. Esikäsittelymenetelmät ovat osoittautuneet lupaaviksi ongelman ratkaisussa, mutta toisaalta se tosiasia, että reaaliaikainen RT-PCR mittaa genomimäärää, ja tässä yhteydessä sitä sovelletaan infektiivisyyden mittaamiseen (mitä se ei oikeasti mittaa), tekee asiasta monipolvisemmän ja hankalamman. Esikäsittelymenetelmät ovat kuitenkin osoittautuneet toimiviksi esimerkiksi havaitsemaan infektiivistä norovirusmateriaalia elintarvikkeista, jos ne kombinoidaan NASBA-menetelmän kanssa (20). Esikäsittelyn heikoin lenkki onkin mahdollisesti itse reaaliaikainen RT-PCR, jota pitäisi kehittää spesifisemmäksi esimerkiksi parempien alukkeiden avulla. Tällä on suurta merkitystä siinä, että tulevaisuudessa desinfektioaineiden testauksissa saataisiin tarkkaa tietoa siitä, toimiiko aine todella ihmisen terveyden

kannalta riittävällä tavalla ja ovatko siivousmenetelmät tarpeeksi tehokkaita eliminoimaan ihmisen terveydelle vaaralliset partikkelit. Uusiakin aineita olisi syytä tutkia laajemmin juuri noroviruksen eliminoinnissa, esimerkiksi juuri PHMG:tä, sillä monesti aineita on tutkittu nimenomaan vain bakteereilla tai norovirusta sensitiivisemmällä viruksilla.

## Lähteet

- (1) Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr.Opin.Infect.Dis.* 2006 Oct;19(5):467-474.
- (2) Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J.Clin.Microbiol.* 2006 Feb;44(2):327-333.
- (3) Dawson DJ, Paish A, Staffell LM, Seymour IJ, Appleton H. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. *J.Appl.Microbiol.* 2005;98(1):203-209.
- (4) Cheesbrough JS. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiology and Infection* 2000;125(01):93.
- (5) Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *J.Infect.Dis.* 2004 Jul 1;190(1):27-36.
- (6) Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it?. *J.Med.Virol.* 2008 Aug;80(8):1468-1476.
- (7) Urakami H, Ikarashi K, Okamoto K, Abe Y, Ikarashi T, Kono T, et al. Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Appl.Environ.Microbiol.* 2007 Sep;73(17):5679-5682.
- (8) Malik YS, Maherchandani S, Goyal SM. Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Am.J.Infect.Control* 2006 Feb;34(1):31-35.
- (9) Kampf G, Grothier D, Steinmann J. Efficacy of three ethanol-based hand rubs against feline calicivirus, a surrogate virus for norovirus. *J.Hosp.Infect.* 2005 Jun;60(2):144-149.
- (10) Kanerva M, Maunula L, Lappalainen M, Mannonen L, von Bonsdorff C-, Anttila V-. Prolonged norovirus outbreak in a Finnish tertiary care hospital caused by GII.4-2006b subvariants. *J.Hosp.Infect.* 2009 3;71(3):206-213.

- (11) Johnston CP, Qiu H, Ticehurst JR, Dickson C, Rosenbaum P, Lawson P, et al. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin.Infect.Dis.* 2007 Sep 1;45(5):534-540.
- (12) Said MA, Perl TM, Sears CL. Healthcare epidemiology: gastrointestinal flu: norovirus in health care and long-term care facilities. *Clin.Infect.Dis.* 2008 Nov 1;47(9):1202-1208.
- (13) Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, Chapin AR, Gibson K, Schwab E, et al. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 2005 Oct;26(10):802-810.
- (14) Poschetto LF, Ike A, Papp T, Mohn U, Bohm R, Marschang RE. Comparison of the sensitivities of noroviruses and feline calicivirus to chemical disinfection under field-like conditions. *Appl.Environ.Microbiol.* 2007 Sep;73(17):5494-5500.
- (15) Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J.Gen.Virol.* 2004 Jan;85(Pt 1):79-87.
- (16) Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J.Hosp.Infect.* 2004 Sep;58(1):42-49.
- (17) Taku A, Gulati BR, Allwood PB, Palazzi K, Hedberg CW, Goyal SM. Concentration and detection of caliciviruses from food contact surfaces. *J.Food Prot.* 2002 Jun;65(6):999-1004.
- (18) Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinje J. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J.Food Prot.* 2006 Nov;69(11):2761-2765.
- (19) Nuanualsuwan S, Cliver DO. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J.Virol.Methods* 2002 Jul;104(2):217-225.
- (20) Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl.Environ.Microbiol.* 2008 Jun;74(11):3349-3355.
- (21) Topping JR, Schnerr H, Haines J, Scott M, Carter MJ, Willcocks MM, et al. Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed

quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *J.Virol.Methods* 2009 Mar;156(1-2):89-95.

(22) Yang HJ, Tsou CL. Inactivation during denaturation of ribonuclease A by guanidinium chloride is accompanied by unfolding at the active site. *Biochem.J.* 1995 Jan 15;305(Pt 2):379-384.

(23) Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommeputy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J.Virol.Methods* 2005 Jan;123(1):1-7.